

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA INTERLEUCINA 31 E
FILAGRINA E SUA RELAÇÃO COM O GRAU DE PRURIDO E
RESTAURAÇÃO DA BARREIRA CUTÂNEA, ANTES E APÓS USO DE
SOLUÇÃO REPOSITORA DE LIPÍDIOS NA EPIDERME DE CÃES COM
DERMATITE ATÓPICA

LAURA CAROLINA BARBOSA

BOTUCATU-SP

Setembro/2015

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA INTERLEUCINA
31 E FILAGRINA E SUA RELAÇÃO COM O GRAU DE PRURIDO E
RESTAURAÇÃO DA BARREIRA CUTÂNEA, ANTES E APÓS USO
DE SOLUÇÃO REPOSITORA DE LIPÍDIOS NA EPIDERME DE
CÃES COM DERMATITE ATÓPICA

LAURA CAROLINA BARBOSA

Dissertação apresentada junto ao programa
de pós graduação em Medicina Veterinária da
Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia, Universidade Estadual Paulista –
UNESP, campus Botucatu, para obtenção do
título de Mestre

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

Botucatu-SP
Setembro/2015

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Barbosa, Laura Carolina.

Análise imunohistoquímica da proteína Interleucina 31 e filagrina e sua relação com o grau de prurido e restauração da barreira cutânea, antes e após uso de solução repositora de lipídios na epiderme de cães com dermatite atópica / Laura Carolina Barbosa. - Botucatu, 2015

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

Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado

Capes: 50501062

1. Cão - Doenças. 2. Dermatite atópica. 3. Pele - Inflamação. 4. Interleucinas. 5. Imuno-histoquímica.

Palavras-chave: Cães; Dermatite atópica; Filagrina; Imunohistoquímica; Interleucina 31.

Autor: Laura Carolina Barbosa

Título: ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA INTERLEUCINA 31 E FILAGRINA E SUA RELAÇÃO COM O GRAU DE PRURIDO E RESTAURAÇÃO DA BARREIRA CUTÂNEA, ANTES E APÓS USO DE SOLUÇÃO REPOSITORA DE LIPÍDIOS NA EPIDERME DE CÃES COM DERMATITE ATÓPICA

COMISSÃO EXAMINADORA

Profº. Ass. Drº. Luiz Henrique de Araújo Machado
Presidente e Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP - Botucatu

Prof. Adjunto Marconi Rodrigues de Farias
Membro
Medicina Veterinária
PUC-Paraná

Profª. Priscylla Tatiana Chalfun Guimarães-Okamoto
Membro
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Data da defesa: 29 de setembro de 2015

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Lourdes Silvia Silvério Barbosa, por ter me apoiado nesse sonho, pela compreensão; paciência e por ter acreditado em mim desde o início, por ser meu alicerce e minha inspiração;

Ao meu pai, Nilton Santo Barbosa, que mesmo não estando presente fisicamente, com certeza está sempre comigo, me protegendo, me guiando e me iluminando;

Ao meu orientador, Prof.^o Dr.^o Luiz Henrique de Araújo Machado, por ter me dado essa oportunidade, pelos ensinamentos passados e por ser um exemplo na área da dermatologia veterinária;

Aos meus verdadeiros amigos pelo apoio e carinho;

À todos os profissionais da área que de alguma forma acrescentaram para meu aprendizado profissional.

ABREVIATÖES

C3	Complemento 3
CL	Corpo Lamelar
DA	Dermatite Atópica
DAPE	Dermatite Alérgica a Picada de Ectoparasitas
Fc	Fração
FHNE	Fator de Hidratação Natural da Epiderme
FLG	Filagrina
IAE	Imunoterapia Alérgeno-Específica
IgE	Imunoglobulina E
IHQ	Imunohistoquímica
IL-31	Interleucina-31
IL-31R α	Receptor α de Interleucina-31
JAK	Enzima Janus Quinase
LL	Lamela Lipídica
OSMR	Receptor β de Oncostatina
PATE	Perda de Água Transepidérmica
PRP	Proteínas Ricas em Prolina
Th2	Linfócito Helper Tipo 2

SUMÁRIO

RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
OBJETIVOS.....	1
CAPÍTULO 1	
Manuscrito 1: Dermatite Atópica.....	3
CAPÍTULO 2	
Manuscrito 2: Barreira Epidérmica.....	33
CAPÍTULO 3	
Manuscrito 3: IL-31.....	49
CAPÍTULO 4	
Manuscrito 4: Filagrina	65
CONCLUSÕES GERAIS.....	79
CAPÍTULO 5	
Manuscrito 5: Normas da Revista	81

BARBOSA, LAURA CAROLINA. **Análise imunohistoquímica da proteína interleucina 31 e filagrina e sua relação com o grau de prurido e restauração da barreira cutânea, antes e após uso de solução repositora de lipídios na epiderme de cães com dermatite atópica.** Botucatu, 2015. 81p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A dermatite atópica é uma doença de pele alérgica, inflamatória e pruriginosa que acomete cães geneticamente predispostos. A característica mais comum é o prurido que exerce impacto significativo na qualidade de vida do animal bem como do seu proprietário. A interleucina-31 (IL-31) é uma citocina envolvida com o grau de prurido nas alergopatias, enquanto a filagrina (FLG) é uma proteína relacionada com a adequada queratinização e hidratação do estrato córneo. O intuito desse estudo foi padronizar e quantificar a técnica de imunohistoquímica (IHQ) para IL-31 e filagrina e associa-las ao grau de prurido e restauração de barreira cutânea na dermatite atópica antes e após o tratamento tópico com repositores de lipídeos na epiderme. Todos os cães foram provenientes do atendimento clínico do Hospital Veterinário da FMVZ- Unesp Botucatu-SP. Sobre a IL-31 não houve diferença significativa entre sua expressão quando comparadas as regiões dorsal e axilar de cães normais. Quando comparamos a expressão da IL-31 entre cães com dermatite atópica e saudáveis foi possível notar maior expressão de IL-31 em cães com dermatite atópica. Quando comparamos os cães com dermatite atópica antes e após aplicação do repositores de lipídeos na epiderme a expressão da IL-31 diminuiu significativamente após a aplicação. Em se tratando da proteína filagrina não foi encontrada diferença significativa entre sua expressão quando comparadas a região axilar e cervical de cães saudáveis, o mesmo ocorreu entre essas regiões em cães com dermatite atópica antes do tratamento e após o tratamento, quando comparados de maneira isolada. Quando comparamos as regiões axilar e cervical dos cães com dermatite atópica antes e após o tratamento não houve o aumento da expressão da proteína filagrina como o esperado. Houve diferença significativa entre as regiões cervical e axilar de cães com dermatite atópica quando comparados com os cães saudáveis, os níveis da filagrina nos cães saudáveis eram maiores do que nos cães com dermatite atópica. Com os resultados da IL-31 podemos concluir que essa citocina provavelmente esteja envolvida na fisiologia do prurido atópico e que a restauração da barreira cutânea é primordial para que consigamos controlar o prurido e a hiper-reatividade do sistema imunológico. Já os resultados da proteína filagrina abrem um leque de discussões sobre a real importância dessa proteína na dermatite atópica canina, apontando a necessidade de novos estudos para compreensão da sua real função na fisiologia da DA.

Palavras chave: Prurido, dermatite atópica, interleucina 31, filagrina, imunohistoquímica, cães.

BARBOSA, L.C. **Analysis immunohistochemistry protein interleukin 31 and filaggrin and its relationship with cutaneous barrier level and restore skin before and after solution of use of lipid repositora in dogs epidermis with atopic dermatitis.** Botucatu, 2015. 81p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Atopic dermatitis is an allergic, inflammatory and pruritic skin disease affecting genetically predisposed dogs. The most common feature is cutaneous rash that significantly impacts the animals' and owners' quality of life. Interleukin-31 (IL-31) is a cytokine involved in the degree of itching in allergies, while filaggrin (FLG) is a protein associated with adequate hydration and keratinization of the stratum corneum. The purposes of this study were to standardize the technique of immunohistochemistry (IHC) for IL-31 and filaggrin and to quantify and associate them to the degree of itching and skin barrier recovery in dogs with atopic dermatitis before and after topical treatment for lipids restitution in the epidermis. All dogs came from the clinical care of the Veterinary Hospital of FMVZ-Unesp Botucatu. There was no significant difference on the expression of IL-31 between samples obtained either from the dorsal or axillary regions of healthy dogs. When atopic dermatitis and healthy animals were compared, expression of IL-31 was noticeable higher in atopic dermatitis animals. IL-31 quantification in the atopic dermatitis animals evidenced significantly lower expression after the use of skin lipids complex in the epidermis. In the case of filaggrin protein, there was no significant difference between its expression when the axillary and cervical sites were compared both in healthy dogs and atopic dermatitis dogs and also when atopic dermatitis dogs were compared before and after treatment. Nevertheless significant difference in fillagrin levels was observed between the cervical and axillary regions of atopic dermatitis dogs when compared to healthy dogs; filagrina levels in healthy animals were larger than in atopic dermatitis dogs. IL-31 results suggest that this cytokine is involved in the physiology of atopic pruritus and that restitution of the skin epidermal barrier is essential so that we can control the pruritus and immunological hyperresponsiveness. On the other hand, the results regarding filaggrin protein open up a range of discussions about the real importance of this protein in the pathophysiology of canine atopic dermatitis, pointing to the need for further studies to understand its real role in the physiology of AD.

Keywords: pruritus, atopic dermatitis, interleukin-31, filaggrin, immunohistochemistry, dogs

Objetivos

- Geral:

O projeto possui como objetivo geral avaliar a existência de correlação entre IL-31 e filagrina com prurido e lesões tegumentares em cães com dermatite atópica.

Nossa hipótese é que com a restauração da barreira cutânea através da solução repositora de lipídeos, a expressão da IL-31 diminua e a expressão da proteína filagrina aumente nos cães com dermatite atópica tratados.

- Específicos:

1. Padronizar a técnica para quantificação da IL-31 e proteína filagrina por meio da imunohistoquímica;
2. Avaliar os efeitos da reposição lipídica na expressão cutânea de IL-31 e de filagrina, e nos índices de prurido e lesões tegumentares em cães com dermatite atópica.
3. Avaliar se a expressão da IL-31 e filagrina altera em dois pontos diferentes da coleta após a reposição lipídica

Capítulo 1

Manuscrito 1

Dermatite Atópica Canina

Artigo de investigação segundo as normas da Ciência Rural

Título: Dermatite atópica em cães: atualidades na fisiologia e tratamento

Autores: Laura Carolina Barbosa, Amanda Dias Tadeu, Caroline Martins Biancardi, Fabíola Soares Zahn, Luiz Henrique de Araújo Machado

RESUMO

A dermatite atópica (DA) também conhecida como atopia, doença atópica ou dermatite inalante alérgica, é uma doença genética em que o paciente se torna sensível a antígenos ambientais. Clinicamente apresenta-se como uma doença de pele pruriginosa, compartilhando muitas características com a dermatite atópica humana, como uma predisposição hereditária. A DA supostamente afeta entre 3% a 15% da população canina, embora a real prevalência e incidência na população geral sejam desconhecidas. É classificada como uma reação de hipersensibilidade do tipo 1. Essas reações inflamatórias agudas são mediadas pela imunoglobulina E (IgE) conjugada com mastócitos e basófilos e é assim conhecida por desenvolver-se muito rapidamente após a exposição ao antígeno, sabe-se que a dermatite atópica nem sempre é mediada por IgE, e em alguns pacientes não é possível comprovar o seu envolvimento. Outros mecanismos envolvidos na sua patogenia são a diminuição da função na barreira epidérmica, redução da produção de peptídeos antimicrobianos por células epidérmicas, função das toxinas secretadas por microrganismos, identificação de polimorfismos genéticos e a influência das condições ambientais no desenvolvimento da alergia em indivíduo geneticamente predispostos. O objetivo foi fazer uma revisão geral sobre as atualidades e descobertas na dermatite atópica da fisiologia ao tratamento dessa doença que continua sendo um desafio ao clínico veterinário.

Fisiopatologia da dermatite atópica com ênfase na barreira cutânea

A dermatite atópica é classificada como uma reação de hipersensibilidade do tipo 1 (MILLER et al., 2013), mediada pela IgE conjugada com mastócitos e basófilos, e por se desenvolver rapidamente após a exposição ao antígeno. Indivíduos com dermatite atópica fabricam IgE constantemente e possuem níveis excepcionalmente altos dessa classe de imunoglobulinas (TIZARD, 1998).

Esses indivíduos podem ter seus sinais agravados ou desencadeados por outros alérgenos, como os alimentares e de artrópodes, e muitas vezes a clássica separação entre hipersensibilidade alimentar e alergia à alérgenos de artrópodes nem sempre é possível (MILLER et al., 2013).

Atualmente existe uma outra classificação para dermatite atópica, na qual é denominada dermatite atópica *like*. Esta doença apresenta características idênticas às apresentadas na dermatite atópica, porém não foi possível documentar o envolvimento da IgE frente a alérgenos ambientais e outros (OLIVRY et al., 2010). Diante dessa afirmação podemos concluir que existem cães com dermatite atópica alérgicos e não alérgicos.

Esta nova definição reconhece o fato da IgE não ser necessária para a manifestação da doença e que mecanismo alternativos podem levar a uma dermatite clinicamente indistinguível da DA (MILLER et al., 2013). Tais mecanismos que se mostraram importantes na dermatite atópica humana e estão sob investigação na dermatite atópica em cães incluem: a- diminuição da função na barreira epidérmica; b- redução da produção de peptídeos antimicrobianos por células epidérmicas; c- o papel das toxinas secretadas por microrganismos; d- a identificação de polimorfismos genéticos e o reconhecimento de que as condições ambientais podem alterar o desenvolvimento de alergia em indivíduo geneticamente predispostos (DEBOER, 2010).

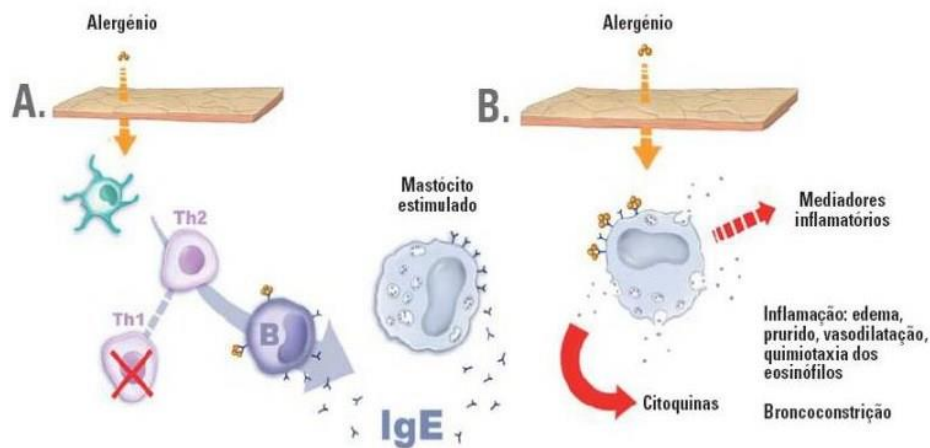
Sua fisiopatologia não foi totalmente elucidada, porém torna-se importante compreendê-la a fim de concluir seu diagnóstico e estabelecer protocolos de tratamento (DEBOER, 2010).

A dermatite atópica é descrita como uma doença multifatorial, crônica, inflamatória e pruriginosa da pele, no qual mutações genéticas e a hiper-reatividade cutânea a estímulos ambientais são pontos desencadeantes da doença.

Sabe-se que somente as mutações genéticas não são suficientes para causar as manifestações clínicas da DA e uma nova perspectiva sobre a importância da disfunção da barreira lipídica da epiderme, em indivíduos geneticamente predispostos, tem sido proposta. As anomalias da barreira cutânea promovem a ruptura prematura dos corneócitos o que resulta no aumento do contato de alérgenos com células epidérmicas do sistema imunológico, direcionando à resposta Th2 (INMAN et al., 2001; CORK et al., 2006; FARIAS, 2007; OLIVRY et al., 2010; CORNEGLIANI et al., 2011).

Com a diminuição da barreira tegumentar, inúmeros irritantes primários, alérgenos ambientais e antígenos microbianos são difundidos por via transepidérmica, reconhecidos, fagocitados e apresentados pelas células de Langerhans aos linfócitos Th2 (Figura 1). Em seguida, um estímulo a proliferação dos linfócitos B, formação de plasmócitos e produção de IgE alérgeno-específica.

A IgE se distribui pela superfície das células de Langerhans e dos mastócitos, originam imunocomplexos, o realce da capacitação e apresentação antigênica, e a desgranulação mastocitária, o que amplifica a resposta imune, a inflamação e o prurido associado a dermatite atópica.



Segundo M. Day, 1999

Figura 1: A e B: Fatores imunológicos na DA clássica (M.Day, 1999 apud Dethioux, F., 2006)

Um ciclo contínuo de liberação de quimiocinas levam ao influxo e ativação de leucócitos e a liberação de outros mediadores pró-inflamatórios se inicia. Isso gera um mecanismo seguido por autoperpetuação da inflamação cutânea (OLIVRY et al., 2005; AKDIS et al., 2006; CORK et al., 2006; MORAR et al., 2006).

É importante salientar que a histamina parece não provocar prurido em cães, como acontece em camundongos e seres humanos. A hipótese atual seja que o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias, estímulos neuronais e o comportamento pruriginoso estabeleçam um ciclo vicioso o qual perpetua o prurido, exacerbando as lesões (OLIVRY et al, 2010; COSGROVE et al., 2013).

A Interleucina-31 vem sendo apontada como a grande responsável pelo estado pruriginoso. Ela é produzida pelos linfócitos T *helper* tipo 2 e por linfócitos cutâneos antígeno positivo, os quais são células T tegumentares e encontra-se elevada em condições pruriginosas (GONZALES et al., 2013).

No tecido cutâneo, a IL-31 se liga a receptores que podem ser encontrados em queratinócitos, macrófagos e eosinófilos, além de participarem da regulação da resposta imune nesses tipos celulares (MARSELLA et al., 2012). Após a ligação ocorre ativação da enzima Janus Quinase (JAK) que é responsável por transmitir os sinais para o núcleo da célula,

desencadeando o estímulo do prurido através de receptores encontrados nas terminações nervosas.

Distúrbios na maturação dos CLs foram demonstrados na pele de humanos com dermatite atópica, caracterizados por uma diminuição na liberação de ácidos graxos, lipídeos, enzimas e componentes do estrato córneo, levando a uma função prejudicada da barreira cutânea. Um distúrbio no mecanismo de extrusão dos lipídeos lamelares resulta em um decréscimo de lipídeos contidos no estrato córneo (CORK et al., 2006).

Em outro estudo para avaliar a estrutura da barreira epidérmica em cães com dermatite atópica e saudáveis por meio da microscopia eletrônica, realizado por Marsella et al. (2009), foi possível notar mudanças graves e focais que incluíram desorganização das LLs, aumento da largura entre corneócitos, CLs dentro de corneócitos, além de grandes quantidades de lipídeos amorfos intercelulares em cães com dermatite atópica, antes e depois do desafio antigênico.

As estimulações alergênicas acentuaram as anomalias estruturais de cães com dermatite atópica, enquanto cães normais não foram afetados. Essas alterações encontradas neste estudo estão de acordo com outros relatos da literatura humana, os quais descrevem que a resposta ao desafio com alérgenos foi incapaz de aumentar a produção de ceramidas.

Em humanos, a integridade da barreira cutânea pode ser avaliada por métodos não invasivos como, por exemplo, a mensuração da perda de água transepidérmica (PATE). Embora limitações sejam relatadas, a mensuração da PATE tem sido apresentada como um método adequado para avaliar indiretamente a função da barreira lipídica. Cornegliani et al. (2011) conseguiram mostrar diferença significativa da PATE entre cães saudáveis e cães com dermatite atópica. Além disso, a PATE foi menor em cães com dermatite atópica cuja doença estava em remissão devido ao tratamento. Estes valores provavelmente estejam relacionados com as anormalidades lipídicas encontradas na barreira epidérmica de cães com dermatite atópica. É

111 postulado que a diminuição de lipídeos da epiderme pode levar a um aumento dos valores da
112 PATE (INMAN et al., 2001; CORK et al., 2006).

113 Uma das mais importantes proteínas que tem sido relatada atualmente é a filagrina. Ela é
114 responsável pela diferenciação final da epiderme, pela formação da barreira cutânea e,
115 juntamente com a queratina, forma uma matriz lipo-proteica, formando o envelope celular
116 córneo, responsável por proteger o organismo de agressões externas (PALMER et al., 2006;
117 JUNGERSTED et al., 2010). Além disso é a partir da sua degradação que se forma o fator de
118 hidratação natural da epiderme (FHNE), que são polímeros de filagrina responsáveis pela
119 hidratação da mesma (McGRATH e UITTO, 2007). Estudos apontam que mutações genéticas
120 nessa proteína podem levar a uma diminuição da mesma, o que levaria a uma barreira de pele
121 prejudicada.

122 **Epidemiologia da dermatite atópica**

123 Supostamente a dermatite atópica acomete de 3 a 15% da população canina. A
124 predileção racial é bem relatada na literatura, porém as variações regionais existentes podem
125 mudar essa predileção ao longo do tempo. (JAEGER et al., 2010). Alguns autores relatam uma
126 maior incidência de dermatite atópica em fêmeas, embora a predisposição sexual não tenha sido
127 comprovada (MILLER et al., 2013).

128 A idade de acometimento da dermatite atópica em cães varia de seis meses a sete anos,
129 com 70% dos cães apresentando os sinais clínicos entre 1 a 3 anos de idade. Há relatos de
130 animais que desenvolvem a dermatite atópica antes de 1 ano de idade, isto pode refletir
131 parcialmente o ambiente onde os filhotes vivem, a carga alérgica do ambiente, ou quando
132 ambos os genitores são animais com dermatite atópica (MILLER et al., 2013).

Características Clínicas:

As manifestações clínicas da dermatite atópica foram inicialmente descritas a mais de 60 anos (DETHIOX, 2006). A lesão inicial é o prurido em áreas sem lesão visível ou com máculas ligeiramente eritematosas. Este se inicia de forma moderada, porém com a cronicidade da doença tende a se intensificar, sendo responsiva a corticoterapia, pelo menos no início (HILLIER, 2008). Na dermatite atópica não há uma lesão dermatológica com prurido e sim um prurido que antecede a lesão. As lesões primárias comumente vistas são eritema, máculas, manchas e pequenas pápulas (FARIAS, 2007; OLIVRY et al., 2010).

A maioria dos pacientes apresentam lesões secundárias que ocorrem devido ao auto traumatismo: escoriações, alopecia auto induzida, liquenificação, hiperpigmentação, inflamação crônica e piodermite bacteriana secundária estafilocócica ou dermatite por *Malassezia* podem resultar em alopecia parcial ou completa, pigmentação salivar, pápulas, pústulas e liquenificação (HILLIER, 2008; OLIVRY et al., 2010).

As infecções estafilocócicas tendem a envolver a região do tronco, ao passo que as infecções causadas por *Malassezia* são constatadas com maior frequência na parte ventral do pescoço, espaços interdigitais e dobras de unhas, podendo ambas se generalizar (HILLIER, 2008).

Não é incomum observar vários tipos de alergias e infecções em um animal atópico, por isso é importante reconhecer as características clínicas da doença e a conduta a ser tomada diante disso (MILLER et al., 2013)

Dermatite ou foliculite piotraumática, dermatite acral por lambedura, conjuntivites, rinites, espirros e a hiperidrose podem também ser observados em cães com dermatite atópica. Outras manifestações clínicas são asma, catarata, distúrbios urinários e gastrointestinais e hipersensibilidade hormonal (HILLIER, 2002; MILLER et al., 2013).

Na dermatite atópica crônica a pele é eritrodérmica e disqueratótica, sendo caracterizada pela presença de xerose, hiperqueratose, hiperpigmentação e liquenificação tegumentar, geralmente associada à seborréia seca laminar e furfurácea (HILLIER, 2002).

O prurido pode inicialmente ser sazonal ou não; a forma sazonal está presente em aproximadamente 32-75% dos cães e irá depender do alérgeno envolvido, da integridade da barreira epidérmica e das condições climáticas, este geralmente é contínuo e diurno, podendo apresentar intensificações sazonais nas estações mais quentes (HILLIER, 2002; FAVROT et al, 2009; MILLER et al., 2013). É possível que os sinais clínicos, assim como a predisposição racial variem entre as diferentes áreas geográficas (JEAGER et al.; 2010).

As áreas do corpo apontadas como as mais acometidas em cães são a face, parte côncava da pila, região ventral do pescoço, axilas, virilha, abdômen, períneo, parte ventral da cauda e aspectos mediais das extremidades. A região periocular e perinasal podem refletir a coexistência do prurido atópico refletindo a conjuntivite e rinite, respectivamente. A otite externa também é um achado comumente visto, no início é notado apenas eritema na região do pavilhão auricular e com o progredir da doença pode ocorrer hiperplasia do epitélio e exsudação ceruminolítica (Figura 2) (HILLIER, 2008; OLIVRY et al.; 2010).

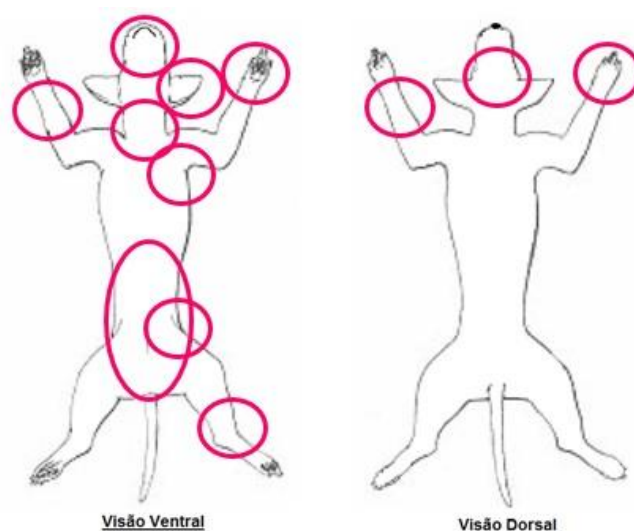


Figura 2. Topografia lesional na dermatite atópica canina

Diagnóstico

O diagnóstico da dermatite atópica é subsidiado pelo histórico e pelo exame clínico do animal, e só deve ser estabelecido após a exclusão de outras dermatopatias pruriginosas (FARIAS, 2007).

O diagnóstico diferencial é longo, considerando-se a ampla variação de sinais presentes e as complicações secundárias que podem ocorrer. As considerações mais comuns como diagnóstico diferencial são dermatite alérgica a picada de ectoparasitas (DAPE), hipersensibilidade alimentar, escabiose, hipersensibilidade a insetos, dermatite de contato, hipersensibilidade a parasitas intestinais, foliculite bacteriana e dermatite por *Malassezia*. Cada diagnóstico diferencial deve ser excluído com procedimentos adequados, exames complementares e/ou tratamentos (MILLER et al., 2013).

Para a maioria dos cães com dermatite atópica, a hipersensibilidade alimentar é um diagnóstico diferencial que deve ser considerado. A única maneira confiável de identificar esses pacientes é através da dieta de eliminação, seguida de reexposição alimentar. Da mesma forma, a DAPE pode levar ao prurido na região lombo-sacra e nas coxas, essas duas dermatoses devem ser excluídas antes do diagnóstico final da DA ser firmado (MUELLER, 2008).

Um dado importante e muitas vezes ignorado pelo clínico é que aproximadamente 75% dos cães com dermatite atópicas apresentam DAPE concomitante e podem apresentar hipersensibilidade alimentar. OLIVRY et al. (2007) defende a ideia de que componentes alimentares podem desencadear crises atópicas em animais predispostos a tais alérgenos. No entanto, é importante enfatizar, a dermatite atópica pode ser exacerbada por alérgenos alimentares, mas nem todos os cães com dermatite atópica terão a doença exacerbada pela dieta. Todo cão com diagnóstico de dermatite atópica não sazonal deve ser submetidos a uma ou mais restrições, provocações e desafios alimentares, ou seja, dietas de eliminação, para em seguida

200 determinar e eliminar qualquer alérgeno alimentar que possa causar crises atópicas (OLIVRY
201 et al, 2010).

202 Há um consenso que o uso de testes intradérmicos ou sorologia específica para alérgenos
203 IgE não podem ser usados como diagnóstico inicial na dermatite atópica em cães. Muitos cães
204 normais e cães com dermatite atópica apresentam reações positivas para esses testes,
205 diminuindo assim a especificidade de ambos. Nenhum tipo de teste provou ser mais preciso do
206 que o outro, embora o teste intradérmico seja considerado como “padrão-ouro” (HILLIER,
207 2008; OLIVRY et al, 2010).

208 O teste alérgico intradérmico detecta a presença de IgE alérgeno específico na superfície
209 de mastócitos da pele. Os ácaros comumente relatados como importantes, e que devem estar
210 presentes, são ácaros de poeira doméstica, resíduos humanos, penas, paina, bolores, sementes,
211 gramíneas e árvores, e essa classificação tende a mudar conforme a região geográfica. Uma
212 reação positiva ao teste cutâneo significa apenas que o animal possui anticorpos sensibilizados
213 na pele, mastócitos que degranulam à exposição antigênica e tecido alvo que responde aos
214 mediadores liberados e não necessariamente alergia aos antígenos injetados. Portanto, se torna
215 essencial que reações positivas ao teste sejam interpretadas com vistas à história do paciente. O
216 mesmo é válido para reações negativas, pois de 10 a 30% dos cães com dermatite atópica são
217 negativos ao teste (HILLIER, 2002; MILLER et al., 2013).

218 Os testes alérgicos sorológicos mais utilizados são o radioalergossorvente (RAST),
219 ensaio imunoabsorvente ligado a enzima (ELISA) e o ensaio imunoenzimático de fase líquida
220 (VARL). A presença de anticorpos contra um alérgeno-específico indica que o animal sofreu
221 exposição anterior a determinado alérgeno, no entanto não fornece provas de que a alergia
222 realmente exista. Isso só pode ser afirmado em conjunto com a história clínica cuidadosa do
223 paciente. Além disso, em alguns pacientes a dermatite atópica pode não ser mediada por IgE
224 (AKDIS et al., 2006; TIZARD, 2008; DEBOER, 2010; MILLER et al., 2013).

Deve ser enfatizado que os testes alérgicos nunca devem substituir a história detalhada, completo exame físico e a cuidadosa eliminação de outros diagnósticos e problemas concomitantes (MILLER et al., 2013).

Pode-se notar que os testes intradérmicos ou sorológicos não são adequados para o diagnóstico da atopia, no entanto podem ser utilizados após a doença ser confirmada. Por exemplo, para determinar os alérgenos envolvidos e formular um extrato de alérgenos para a imunoterapia específica, ou ainda documentar se a doença está associada com IgE alérgeno-específico (MARSELLA, 2006; MUELLER, 2008; OLIVRY et al, 2010).

Os critérios mais atuais para diagnóstico de DA são os critérios de Favrot (2010), eles foram desenvolvidos com o intuito de distinguir os sinais clínicos e características da dermatite atópica. No entanto esses critérios não devem substituir um exame clínico adequado e deve ser utilizado após a exclusão de ectoparasitas, doenças bacterianas e fúngicas, além disso a dieta de eliminação deve ser realizada para determinar se alérgenos alimentares desempenham um papel importante ou não no desenvolvimento da DA (Quadro 1).

Quadro 1. Critérios de Favrot (2010).

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)
Patas torácicas afetadas
Pavilhões auriculares afetados
Margens de orelhas não afetadas
Área lombosacra não afetada

Interpretação:

- 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 seja determinado seis critérios a especificidade aumenta para 89%, mas com queda de sensibilidade para 58%

250 **Tratamentos**

251 A dermatite atópica canina é uma doença que exige controle ao longo de toda vida, com
252 várias modalidades de tratamentos, projetado de acordo com cada caso (YASUKAWA et al.,
253 2009).

254 Devido à complexidade da cascata inflamatória que conduz a doença, o sucesso e
255 controle terapêutico exigem a manutenção da hidratação cutânea, o reconhecimento e a
256 minimização da exposição e/ou eliminação dos fatores exacerbadores da inflamação e do
257 prurido atópico, tais como: agentes infecciosos, ectoparasitas, irritantes, alérgenos e fatores
258 emocionais, além da modulação da resposta imunológica (FARIAS, 2007).

259 De modo geral, acima de 90% dos cães com dermatite atópica podem ser
260 satisfatoriamente controlados. O cliente deve estar consciente, entretanto, de que o tratamento
261 geral é necessário para toda a vida e que as modificações terapêuticas por toda a vida do cão
262 são esperadas (MILLER et al., 2013).

263 **Medidas de controle e minimização de fatores desencadeantes**

264 Inúmeras são as medidas que podem ser tomadas na tentativa de diminuir a quantidade
265 e a exposição dos cães aos alérgenos ambientais, cabe ao clínico orientar e ao proprietário
266 analisar a viabilidade para implementá-las. Atualmente os fatores desencadeantes das crises
267 incluem pulgas, alimentos e alérgenos ambientais como poeira, ácaros, pólen (HILLER, 2002;
268 OLIVRY, 2010). A diminuição da carga de alérgenos ambientais é possível com medidas de
269 higiene introduzidas no ambiente do animal: colchão antipulgas, aspiradores com filtros e
270 acaricidas. Aparelhos de ar condicionado e os desumidificadores também são utilizados para
271 diminuir a pressão alérgênica (DETHIOX, 2006).

272 Os alérgenos alimentares podem ser a causa em cães que apresentem dermatite atópica
273 com sinais clínicos perenes. Mesmo que a tentativa de controlar a dieta tenha sido feita no início
274 do tratamento, ela deve ser reconsiderada em casos de crise, principalmente quando a terapia

com glicocorticoides não esteja sendo eficaz. É importante salientar que cães com dermatite atópica frequentemente adquirem novos hipersensibilizantes e desenvolvem novas alergias, por esse motivo devem ser feitos um ou mais ensaios de restrições-provocações alimentares nesses cães (OLIVRY, 2007).

A implantação de um regime eficaz no controle de pulga também se faz necessário. Há evidências de que o estado atópico predispõe os cães a desenvolverem hipersensibilidade a antígenos salivares da pulga se expostos repetidamente a estes. O controle deve ser feito através de adulticidas durante todo o ano, combinado com manejo ambiental correto (SOUSA, 2001; OLIVRY, 2010).

Cuidados de higiene e melhoria da pele e pelagem

A perda de água transepidérmica na dermatite atópica está associada à xerose, à inflamação, ao prurido e à perda da função da barreira, o que favorece a penetração epicutânea de aeroalérgenos. Dessa forma, a hidratação da pele representa a peça fundamental no controle da doença. Para que essa hidratação seja feita frequentemente é usada uma combinação de hidratantes, emolientes e umectantes (FARIAS, 2007).

Os banhos semanais provavelmente são benéficos, pois causam um efeito calmante direto na pele, eliminação física dos alérgenos superficiais e microrganismos, e aumentam a hidratação da pele. Até o momento não há evidências de qualquer produto e protocolo em especial que atinja os objetivos referidos (OLIVRY, 2010).

Muitas vezes somente princípios hidratantes não são suficientes, pois há contaminação na pele do animal, por isso a associação com um antisséptico se faz necessário. Nestes casos xampus ou soluções contendo antibacterianos como clorexidine, lactato de etila, triclosan e/ou medicamentos antifúngicos como miconazol, ou cetoconazol, são benéficos. Esses produtos devem ser adicionados a substâncias emolientes e hidratantes, com o intuito de recompor a

barreira. Em alguns casos, os hidratantes podem aliviar a xerose que ocorre após os banhos (AKDIS et al., 2006; OLIVRY, 2010).

A água utilizada nos banhos não deve ser quente, a pele não deve ser intensamente friccionada e o tempo do banho deve ser curto. Deve-se evitar o uso de secadores quentes após os banhos e a secagem do animal deve ser feita preferencialmente, em temperatura ambiente ou com o uso de sopradores. O uso de substâncias irritantes não específicas, como sabões, perfumes, tintas e talcos devem ser evitados (FARIAS, 2007).

Formulações tópicas repositoras de lipídeos

As formulações tópicas de lipídeos são bastante eficientes no tratamento de dermatite atópica em humanos. Nos cães foi demonstrado que suas propriedades são capazes de restaurar anomalias lipídicas ultra estruturais pré-existentes na dermatite atópica (OLIVRY, et al., 2010).

Com a finalidade de avaliar quantitativamente, por meio da microscopia eletrônica, a expressão de lipídeos na epiderme de cães e o efeito de um novo complexo lipídico tópico contendo ceramidas, ácidos graxos e colesterol na pele atópica, Piekutowska et al. (2008), realizaram um estudo com 5 cães com dermatite atópica, comparando a pele não lesionada (antes e após o tratamento) com a pele de cães saudáveis (controle). Neste estudo, as LLs ocupavam 89,5% do espaço intercelular total da pele de cães saudáveis e nos cães com dermatite atópica não tratados ocupavam 31,8%. Quando os cães com dermatite atópica eram tratados com esse complexo lipídico, as LLs ocuparam 74%. Estes resultados sugerem que o tratamento com o complexo lipídico tópico estimula a produção e secreção de lipídeos endógenos.

Em humanos o uso de emolientes com ceramidas, uma das mais importantes classes de lipídeos que compõem a barreira epidérmica, é indicado para recuperar sua função e diminuir a PATE. Esse emoliente reduz significativamente os sinais clínicos da DA humana e restaura a barreira epidérmica, como foi visualizado com o uso de microscopia eletrônica (REITER et al.,

2009). Esse estudo em humanos reforça as conclusões acima, nas quais uma solução lipídica tópica seria capaz de restaurar uma barreira cutânea prejudicada.

Esses resultados são animadores, porém assim como em humanos, nos cães essas pesquisas são escassas e requerem mais estudos.

Suplementação com ácidos graxos essenciais

Em cães normais, a suplementação dietética ou a alimentação com dietas ricas em ácidos graxos essenciais, geralmente resultam em melhoria na qualidade do revestimento e brilho da pele e associada redução da perda de água transepidérmica. Os ácidos graxos mais utilizados são ômega 3, que incluem o α -ácido linolênico, ácido eicosapentaenóico e ácido docosahexaenóico e ômega 6 que incluem o γ -ácido linoléico e o ácido linoléico (DETHIOX, 2006; STEHLE et al., 2009).

Essas suplementações têm como objetivo proporcionar os recursos necessários à pele para permitir que a função da barreira afetada pela dermatite atópica seja reestabelecida e combater a inflamação através da passagem da produção de mediadores pró-inflamatórios (Prostaglandinas E2 e leucotrienos B4) para a produção de prostaglandinas e leucotrienos não inflamatórios. Os ácidos graxos essenciais competem com o ácido araquidônico que serve como substrato para a lipoxigenase e cicloxigenase, dessa forma converte esses ácidos em prostaglandinas e os leucotrienos não inflamatórios (DETHIOX, 2006; STEHLE et al., 2009).

Os efeitos positivos só serão visíveis após 3 a 6 meses de suplementação, pois se faz necessário sua incorporação à membrana celular. Esse período justifica-se quando consideramos a fisiologia cutânea e o tempo necessário para renovação celular (OLIVRY et al., 2010).

No presente momento, não há nenhuma evidência de superioridade de determinada combinação de ácidos graxos essenciais, a dose, a razão ou formulação (incluindo dietas enriquecidas) que melhoraram a qualidade da pelagem e da pele de cães com dermatite atópica.

Em geral, as dietas enriquecidas com ácidos graxos essenciais fornecer maiores quantidades destes do que sua administração como suplementos orais (OLIVRY et al., 2010).

Terapia anti-infecciosa tópica e sistêmica: antibióticos e antifúngicos

A colonização estafilocócica tegumentar está geralmente associada a secreção de toxinas capazes de funcionar como superantígenos e exacerbar a inflamação e o prurido, por isso o tratamento antimicrobiano é fundamental para o controle da dermatite atópica (FARIAS, 2007).

As infecções secundárias são frequentes e podem causar surtos de piodermite superficial ou profunda. A piodermite, dermatite piotraumática ou dermatite acral por lambadura pode ser encontrada em até 68% dos cães com dermatite atópica (SIMOU et al., 2005; DETHIOX, 2006).

Infecções causadas por leveduras do gênero *Malassezia sp.* são frequentemente implicadas na piora do prurido atópico, principalmente em regiões intertriginosas (axila, virilha e interdigital), perilabiais, perianais e nos condutos auditivos (HILLIER, 2002).

Na presença de lesões de pele causadas por infecções bacterianas ou fúngicas localizadas as pomadas, cremes, géis com antissépticos (clorexidina), antibióticos (mupirocina, ácido fusídico, clindamicina) ou medicamentos antifúngicos (miconazol, clotrimazol, cetoconazol, terbinafina) são indicados (OLIVRY et al., 2010).

Apesar da epiderme ser relativamente avascular, estudos sobre infecções cutâneas demonstraram que a via sistêmica de tratamento é melhor que a tópica para todas, menos para as infecções mais superficiais (MILLER et al., 2013).

As combinações entre os antibióticos geralmente são desnecessárias. Os antibióticos devem ser administrados pelo menos por 14 a 21 dias para infecções superficiais e por 30 a 60 dias em infecções mais complexas. Quando se fala em tratamento de infecções cutâneas por via oral, é sempre melhor administrar uma superdosagem do que subdosagem. Os antibióticos mais

utilizados são cefalexina (30mg/kg, a cada 12 horas), enrofloxacina (10mg/kg, a cada 24 horas) e amoxicilina com clavulonato de potássio (22mg/kg a cada 12 horas) (MILLER et al., 2013).

Em casos de infecções fúngicas recomenda-se o uso do itraconazol na dosagem de 5-10mg/kg/ a cada 24hs (DETHIOX, 2006).

Terapia tópica e sistêmica com glicocorticoides

Por se tratarem de moléculas lipossolúveis, os corticoides estão distribuídos por todo organismo. Administrados por via oral ou através de aplicação local são rapidamente absorvidos pelo organismo e dispersam-se pela totalidade dos tecidos (DETHIOX, 2006). Quer sob a forma oral ou tópica (dermocorticoides), são sempre parte integrante do tratamento da dermatite atópica (OLIVRY, SOUSA, 2001).

Os glicocorticoides bloqueiam a liberação do ácido araquidônico e a formação dos eicosanóides (prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanos e prostaciclinas), inibem a transcrição de citocinas, quimiocinas, fator de proliferação vascular, moléculas de adesão e de fatores de crescimento; diminuem a ativação das células de Langerhans, linfócitos T e estabilizam as membranas dos mastócitos (RHEN e CIDLOWSKI, 2005).

Glicocorticoides tópicos são indicados para lesões de pele localizada e de curta duração. Os clínicos devem adequar a frequência e a duração das aplicações de acordo com a gravidade dos sinais clínicos (OLIVRY et al., 2010).

Há fortes evidências da alta eficácia dos sprays de triancinolona a 0,015% e do aceponato de hidrocortisona a 0,0584% utilizados, respectivamente, duas vezes ao dia e uma vez ao dia no local das lesões (OLIVRY et al., 2010). O spray de aceponato de hidrocortisona a 0,0584% é conhecido por sua alta potência, boa penetração, rápida inativação na derme e pouca ação sistêmica (BIZIKOVA et al., 2010).

Estes tratamentos são destinados apenas durante um período limitado, recomenda-se cautela com uso a longo prazo, devido aos efeitos adversos possíveis de ocorrer (DETHIOX, 2006; OLIVRY et al., 2010).

No caso de sinais muito graves ou extensos para ser controlados com formulações tópicas, os glicocorticoides orais podem ser necessários. Os efeitos satisfatórios no controle do prurido e dos sinais clínicos têm sido observados em 57 a 100% dos cães com dermatite atópica, sendo sua eficácia clínica estimada entre 58 e 86% (OLIVRY, 2003; OLIVRY, 2010).

Os glicocorticoides como a prednisona ou prednisolona na dose de 0,5mg/kg a 1mg/kg a cada 24 horas podem ser indicados no controle da exacerbação aguda da inflamação e do prurido relacionados a dermatite atópica, até a minimização dos sinais clínicos. Seu uso prolongado deve ser restrito aos casos de dermatite atópica crônica, após a instituição da dose 0,5mg/kg/24h, deve ser espaçado a cada 48 horas e, em seguida, para cada 72 horas. Sua dose então deve ser reduzida e espaçada, até se encontrar um equilíbrio entre ausência de sinais clínicos e de efeitos colaterais da corticoideterapia (FARIAS, 2007).

Terapia tópica e sistêmica com inibidores da calcineurina (macrolídeos imunossupressores)

Os inibidores da calcineurina têm a capacidade de bloquear a maioria das reações alérgicas pela inibição da produção de citocinas, modulação da proliferação de células T e ativação e apresentação de antígenos. A ciclosporina também inibe a função e sobrevivência dos eosinófilos, diminui o número de células de Langerhans na epiderme, e inibe as funções de ativação de linfócitos pelas células apresentadoras de antígenos (MARSELLA, 2006).

A pomada tacrolimus 0,1% tem-se mostrado eficaz, especialmente em cães com dermatite atópica localizada. A eficácia da pomada parece maior quando utilizado duas vezes por dia por uma semana, com consequente redução da aplicação, para o controle dos sinais (OLIVRY et al., 2010). Nesta concentração diminuiu o escore das lesões clínicas, após 4-6

semanas, em 60 a 63% e o prurido avaliado pelos proprietários em 58%, quando aplicados de uma a duas vezes por dia (MUELLER, 2008).

A ciclosporina em cães é utilizada na dose de 5mg/kg a cada 24 horas, por via oral. Essa dose tem sido associada a diminuição significativa do prurido e da inflamação relacionados a dermatite atópica em 40 a 86% dos casos, logo que o animal evidencie melhora, pode passar para uma dosagem de manutenção, quer pela redução da dose diária quer pelo aumento do intervalo de administração (DETHIOX, 2006). Os efeitos satisfatórios do tratamento com ciclosporina só são observados após 30 dias de uso contínuo, devendo ser inicialmente associadas a anti-histamínicos e glicocorticoides orais (GUAGUÈRE et al. 2004).

Maleato de Oclacitinib (Apoquel®)

O Maleato de Oclacitinib é um inibidor da janus quinase. A janus quinase desempenha um importante papel na sinalização de citocinas que estão envolvidas em funções pró-inflamatórias, pró-alérgicas e pruridogênicas (COSGROVE et al. 2013).

A IL-31 é uma citocina recentemente identificada por induzir o prurido em cães, e a janus quinase tem a capacidade de inibir a função dessa citocina e consequentemente reduzir significativamente o prurido (COSGROVE et al, 2013).

Oclacitinib foi recentemente aprovado nos EUA e EU para controle e tratamento do prurido de cães com DA. Sua ação não se restringe somente aos efeitos antipruriginosos, além disso possui importantes propriedades anti-inflamatórias, como determinado pela sua capacidade em inibir a função pró-inflamatória e pró-alérgica das citocinas, tais como IL-2, IL-4, IL-6 e IL-13 (GONZALES et al, 2014).

Um estudo duplo cego, randomizado e controlado com placebo foi realizado a campo com o objetivo de avaliar a eficácia e segurança do Oclacitinib para controle da DA. Nesse estudo ficou comprovado que a dose de 0,4-0,6mg/kg utilizado a cada 12 horas por um período inicial de 14 dias e após essa mesma dose utilizada a cada 24 horas para manutenção do

tratamento apresentou controle rápido, eficaz e seguro do prurido, inclusive na dose de manutenção, proporcionando uma margem sólida de segurança e eficácia para sua utilização em casos crônicos (COSCROVE et al., 2013).

A eficácia e segurança do Oclacitinib foi comparada com a ciclosporina para tratamento e controle da DA, nesse estudo ficou comprovado que o oclacitinib apresentou um efeito de ação mais rápido e menor frequência de efeitos colaterais, como por exemplo os gastrointestinais, em comparação com a ciclosporina (LITTLE et al., 2015).

Diante de todos esses estudos vemos um novo aliado para controle da dermatite atópica, porém ainda não disponível no Brasil.

Imunoterapia alérgeno-específica (Dessensibilização)

A imunoterapia alérgeno específica (IAE) é um tratamento biológico tipicamente usado para pacientes com dermatite atópica, o qual envolve a administração por via parenteral de crescentes doses múltiplas de antígenos (alérgenos) aos quais o animal é sensível. A dessensibilização é indicada em animais que apresentam prurido de moderado a intenso e não sazonal, que não respondem adequadamente a terapia sintomática e à exclusão ambiental, ou que manifestam efeitos colaterais inaceitáveis (HILLIER, 2002; MILLER et al., 2013).

O mecanismo exato é desconhecido, uma avaliação comparativa publicada recentemente apresentou as hipóteses mais atuais. Muitos aspectos da resposta imune, incluindo produção de anticorpos, secreção de citocinas, degranulação de mastócitos e ativação de células T são significativamente alterados na IAE (MILLER et al., 2013).

Em cães a verdadeira eficácia da imunoterapia alérgeno-específica é desconhecida. Como se trata de terapia a longo prazo muitos pacientes necessitam de medicação adicional, e como cada paciente tem seu conjunto único de alérgenos, bem como eventualmente um protocolo único de administração, maximizar a taxa de sucesso, em uma avaliação científica é difícil. Estima-se que cerca de 50% a 80% dos animais com duração do tratamento de 6 a 12

470 meses apresentem uma melhora nos sinais e/ou diminuição no uso da medicação
471 antiinflamatórias ou antipruriginosas (FARIAS, 2007; MUELLER, 2008; OLIVRY, et al.,
472 2010).

473 As vacinas manipuladas devem conter o mínimo de alérgenos possível, pois se trata de
474 terapia alérgeno-específica. Na fase inicial a concentração de alérgeno é de 200 a 2.000
475 PNU/ml, devendo ser aplicada em regime de doses ascendentes. Geralmente após a fase inicial
476 estabelece-se uma concentração de manutenção de 10.000 a 20.000 PNU/ml, a qual é a
477 administrada a cada uma ou duas semanas. A duração mínima do tratamento é de um ano,
478 podendo no caso de eficácia se estender pelo resto da vida do animal (HILLIER, 2002;
479 GRIFFIN, 2006).

480 Normalmente a via escolhida para aplicação é subcutânea e existem três formas da
481 preparação dos alérgenos. Os alérgenos aquosos, os precipitados em alumínio e os em emulsão
482 (MILLER et al., 2013).

483 A frequência da aplicação e a quantidade devem ser adaptadas a cada paciente,
484 dependendo da clínica, melhora observada e a presença de efeitos adversos como, por exemplo,
485 aumento de prurido após cada injeção (OLIVRY et al., 2010).

486 **Outras terapias**

487 O interferon γ mostrou-se bastante eficaz no controle da dermatite atópica. Ele reduz a
488 relação IL-4/IFN- γ mRNA em células mononucleares do sangue periférico, reduz a espessura
489 epidérmica e o número de mastócitos em amostras de biópsia, e reduz significativamente a
490 quantidade de IgE no soro total. A dose utilizada é de 10.000 unidades/kg administrada por via
491 subcutânea três vezes por semana durante 4 semanas, e após uma vez por semana. Porém, um
492 estudo recente realizado no Japão mostrou que doses de 5.000 unidades/kg com 8 semanas de
493 tratamento é tão eficaz quanto 10.000 unidades/kg (YASUKAWA, 2009; OLIVRY et al.,
494 2010).

As medicações antidepressivas ou ansiolíticas têm sido indicadas como coadjuvante no controle da dermatite atópica, em pacientes cuja doença é agravada por fatores psicossomáticos e doenças psicogênicas. As drogas que são mais usadas são hidroclorido de doxepina (0,5 a 2mg/kg/VO/a cada 12hs), amitriptilina (2mg/kg/VO/ a cada 12hs) e a fluoxetina (1mg/kg/VO/a cada 24hs) (FARIAS, 2007).

O misoprostol é um análogo da PGE1 é utilizado na dose de 5 µg/kg, a cada 8 horas, possui eficácia moderada e custo relativamente alto (DETHIOX, 2006).

A pentoxifilina pertence à classe dos inibidores da fosfodiesterase possui eficácia moderada e custo relativamente alto. Por possuir meia vida plasmática curta, talvez seu uso a cada 8 horas possa ser mais eficaz. Este fármaco age em sinergismo com os glicocorticoides na inibição da produção de citocinas, podendo ser utilizada para reduzir a dose dos glicocorticoides (FARIAS, 2007; OLIVRY et al., 2010).

CONCLUSÃO

Por se tratar de doença multifatorial, a combinação de vários protocolos terapêuticos se faz necessário. A análise individualizada da história clínica e os fatores desencadeantes para crise em cada paciente é muito importante para que se possa estabelecer uma terapia adequada.

O tratamento precisa ter o intuito de minimizar a exposição a alérgenos ambientais (pólen, ácaros de poeira domésticas) e fatores que podem desencadear a crise (pulgas, alérgenos alimentares), restaurar a barreira cutânea, diminuir o risco de infecções secundárias, minimizar as lesões e o prurido e prevenir a recorrência dos sinais após sua remissão.

A conscientização do proprietário quanto a etiologia da doença é muito importante. A sua preferência deve ser levada em conta quando se pensa em um tratamento e principalmente quando se fala em disponibilidade e custos, pois muitas vezes é necessário mudar a terapia estipulada a fim de melhorar a qualidade de vida do paciente

REFERÊNCIAS

- AKDIS, C.A. et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. **Journal of allergy and clinical immunology**, v.61, p.969-897, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1398-9995.2006.01153.x/epdf>>. Acesso em: 10 ago. 2015. doi: 10.1111/j.1398-9995.2006.01153.x.
- BIZIKOVA, P. et al. Effect of a novel topical diester glucocorticoid spray on immediate- and late-phase cutaneous allergic reactions in Maltese-beagle atopic dogs, a placebo-controlled study. **Veterinary dermatology**, v.21, p.71-80, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2009.00782.x/epdf>>. Acesso em 10 ago. 2015. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00782.x.
- CORK, M. J. et al. 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. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0091674906011390/1-s2.0-S0091674906011390-main.pdf?_tid=6b088798-4e8c-11e5-b279-00000aab0f26&acdnat=1440880250_8146544b9c6065c99949979fbc3a4c2b>. Acesso em 10 ago. 2015. doi: 10.1016/j.jaci.2006.04.042
- CORNEGLIANI, L. et al. Transepidermal water loss in healthy and atopic dogs, treated and untreated: a comparative preliminary study. **Veterinary dermatology**, v.23, n.01, p. 41-e10, 2012. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2011.01003.x/full>>. Acesso em 10 dez. 2014.
- COSGROVE, S.B. 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.06, p.587-e142, 2013.

545 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674905025303>>.

546 Acesso em 12 jan. 2015.

547 DeBOER, D.J. Skin barrier repair and canine atopic dermatitis. In: INTERNATIONAL

548 CONGRESS OF THE ITALIAN ASSOCIATION OF COMPANION ANIMAL

549 VETERINARIANS, 65., 2010, Italy. **Proceedings...** Italy: SCIVAC, 2010. p. 90-91.

550 DETHIOUX, F. A dermatite atópica canina, um desafio para o clínico. **Revista focus**, [s.n],

551 2006. Acesso em: 12 ago. 2015.

552 FARIAS, M.R. Dermatite atópica canina: da fisiopatogênia ao tratamento. **Clínica**

553 **veterinária**, n.69, p.48-62, 2007. Acesso em 11 ago. 2015.

554 FAVROT, F.; STEFFAN, W.S.; PICCO, F.; A prospective study on the clinical features of

555 chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. **Veterinary dermatology**. v.21, n.01, p. 23-

556 31, 2010. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2009.00758.x/full)

557 [3164.2009.00758.x/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2009.00758.x/full)>. Acesso em 14 dez. 2014. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00758.x

558 GONZALES, A.J. et al. Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine

559 atopic dermatitis. **Veterinary dermatology**, v.24, n.01, p. 48-e12, 2013. Disponível em:

560 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2012.01098.x/full>>. Acesso em: 10

561 fev. 2015. doi: 10.1111/j.1365-3164.2012.01098.x.

562 GONZALES, A.J. et al. Oclacitinib (APOQUEL®) is a novel Janus kinase inhibitor with

563 activity against cytokines involved in allergy. **Journal of veterinary pharmacology and**

564 **therapeutics**, v.37, n.04, p.317-324, 2014. Disponível em:

565 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jvp.12101/full>>. Acesso em: 10 fev. 2015. doi:

566 10.1111/jvp.12101

567 GUAGUÈRE, E. et al. Cyclosporin A a new drug in the field of canine dermatology.

568 **Veterinary dermatology**, v. 15, p.61-74, 2004. Disponível em:

569 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2004.00376.x/epdf>>. Acesso em: 11
570 ago. 2015. doi: 10.1111/j.1365-3164.2004.00376.x.

571 HILLER, A. Dermatite atópica. In: BICHARD, S.J; SHERDING, R.G. **Manual Saunders-**
572 **clínica de pequenos animais**. 3ed, São Paulo: Ed. Roca, 2008, p.490-496.

573 HILLIER, A. Allergy testing and treatment for canine atopic dermatitis. **Veterinary medicine**,
574 v.97, n.3, p. 210-224, 2002. Acesso em: 02 ago.2015.

575 INMAN, A.O. et al. Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids
576 in normal and atopic dogs. **Veterinary Pathology**, v.38. n.06, p.720-723, 2001. Disponível em:
577 <<http://vet.sagepub.com/content/38/6/720.short>>. Acesso em: 10 nov. 2014. doi:
578 10.1354/vp.38-6-720.

579 JAEGER, K. et al. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison
580 of five locations in three continents. *Vet. Dermatol.* v.21, n.01, p. 119-123, 2010. Disponível
581 em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2009.00845.x/full>>. Acesso em
582 04 dez. 2014. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00845.x.

583 JUNGERSTE, J.M. et al. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations
584 in patients with atopic eczema. **Allergy**. v.65, n.07, p.911-918, 2010. Disponível em:
585 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1398-9995.2010.02326.x/full>>. Acesso em: 06
586 nov. 2015. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02326.x.

587 LITTLE, P.R. et al. A blinded, randomized clinical trial comparing the efficacy and safety of
588 oclacitinib and ciclosporin for the control of atopic dermatitis in client-owned dogs. **Veterinary**
589 **dermatology**, v.26, n.1, p.1-10, 2015. Disponível em:
590 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vde.12186/pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2015. doi:
591 10.1111/vde.12186.

592 MARSELLA, R. et al. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic
 593 dermatitis. **Veterinary dermatology**, v.22, n.03, p.239-248, 2011. Disponível em:
 594 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2011.00967.x/full>>. Acesso em 14
 595 jul. 2015. doi: 10.1111/j.1365-3164.2011.00967.x.

596 MARSELLA, R. et al. Immunohistochemical evaluation of filaggrin polyclonal antibody in
 597 atopic and normal beagles. **Veterinary dermatology**. v.20, n. 05, p.547-554, 2009. Disponível
 598 em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2009.00844.x/full>>. Acesso em
 599 15 jan. 2015. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00844.x.

600 McGRATH, J.A.; UITTO, J. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and
 601 disease. **Trends in molecular medicine**, v.14, n.01, p.20-27, 2008. Disponível
 602 em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491407002213>>. Acesso em: 15
 603 dez. 2014. doi: 10.1016/j.molmed.2007.10.006.

604 MILLER, W.H. et al. Structure and Function of the Skin. In _____. **Small Animal Dermatology**,
 605 7ed. St. Louis: Elsevier Mosby. 2013. Cap. 1, p.1-56.

606 MORAR, N. et al. The genetics of atopic dermatitis. **Journal of allergy and clinical**
 607 **immunology**, v. 118, n.1, p. 24-34, 2006. Disponível em:
 608 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674906007445>>. Acesso em 10 dez.
 609 2014. doi: 10.1016/j.jaci.2006.03.037.

610 MUELLER, R.S. Diagnosis and treatment of canine atopic Dermatitis. In: PROCEEDINGS OF
 611 THE 33RD WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY CONGRESS, 33., 2008. Dublin.
 612 **Proceedings...** WSAVA/FECAVA Programme. Ireland: [s.n], 2008, p. 177-179. Acessado em
 613 11 jan, 2015. Online. Disponível em <www.ivis.org>

614 NODTVEDT, A. et al. A case-control study of risk factors for canine atopic dermatitis among
615 boxer, bullterrier and west highland white terrier dogs in Sweden. **Veterinary dermatology**,
616 v.18, n.05, p.309-315, 2007. Disponível em:
617 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2007.00617.x/full>>. Acesso em 10
618 jan. 2015. doi: 10.1111/j.1365-3164.2007.00617.x

619 OLIVRY, T. et al. Food for thought: pondering the relationship between canine atopic
620 dermatitis and cutaneous adverse food reactions. **Veterinary dermatology**, v.18, p.390, 2007.
621 Disponível em <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2007.00625.x/abstract)
622 [3164.2007.00625.x/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2007.00625.x/abstract)>. Acesso em 20 jan. 2015. doi: 10.1111/j.1365-3164.2007.00625.x

623 OLIVRY, T. et al. Mechanism of lesion formation in canine atopic dermatitis: 2004 hypothesis.
624 In: HILLIER, A.; FOSTER, A.P.; KWOCKHA, K.W. **Advances in veterinary dermatology**,
625 v.5, p.10-16, 2005.

626 OLIVRY, T. et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from
627 the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. **Veterinary dermatology**, v.21,
628 n.03, p.233-248, 2010. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2010.00889.x/full)
629 [3164.2010.00889.x/full](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2010.00889.x/full)>. Acesso em 19 dez. 2014. doi: 10.1111/j.1365-3164.2010.00889.x.

630 PALMER, C.N.A. et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein
631 filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. **Nature**, v. 38, p. 441-446, 2006.
632 Disponível em: <<http://www.nature.com/ng/journal/v38/n4/full/ng1767.html>>. Acesso em: 12
633 dez. 2014. doi: 10.1038/ng1767.

634 PIEKUTOWSKA, A. et al. Effects of a Topically Applied Preparation of Epidermal Lipids on
635 the Stratum Corneum Barrier of Atopic Dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v.138,
636 p.197-203, 2008. Disponível em:

637 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021997508000108>>. Acesso em 17 dez.
638 2014. doi 10.1016/j.jcpa.2008.01.006.

639 REITER, L.V. Characterization and quantification of ceramidas in the nonlesional skin of
640 canine patients with atopic dermatitis compared with controls. **Veterinary dermatology**, v.20,
641 p. 260-266, 2008. Disponível em <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2009.00759.x/pdf>>. Acesso em 10 ago. 2015. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00759.x.

643 RHEN, T; CIDLOWSKI, C.F. Antiinflammatory action of glucocorticoids- New mechanisms for
644 old drugs. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p.1711-1723, 2005.
645 Disponível em: < <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMra050541>>. Acesso em 11 ago.
646 2015. doi: 10.1056/NEJMra050541.

647 SIMOU, C. et al. Adherence of Staphylococcus intermedius to corneocytes of healthy and
648 atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. **Veterinary**
649 **dermatology**, v16, p.385-391, 2005. Disponível em:
650 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2005.00484.x/full>>. Acesso em: 11
651 ago. 2015. doi: 10.1111/j.1365-3164.2005.00484.x

652 SOUSA C. A.; HALLIWELL R.E.W. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XI):
653 the relationship between arthropod hypersensitivity and atopic dermatitis in the dog.
654 **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p.233-237, 2001. Disponível em
655 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165242701003440>>. Acesso em: 10
656 ago.2015. doi: 10.1016/S0165-2427(01)00344-0

657 STEHLE, M. E. et al. Effects of polyunsaturated fatty acids on isolated canine peripheral blood
658 mononuclear cells and cytokine expression (IL-4, IFN- γ , TGF- β) in healthy and atopic dogs.
659 **Veterinary dermatology**, v.21, p. 113-118, 2009. Disponível em:

660 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2009.00860.x/full>>. Acesso em: 10
661 ago. 2015. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00860.x.

662 TIZARD, I.R. Hipersensibilidade do tipo I. In_____ **Imunologia veterinária: uma**
663 **introdução**. 5 ed. São Paulo: Ed. Roca, 1998. p. 357-373.

664 YASUKAWA, K. et al. Low-dose recombinant canine interferon- γ for treatment of canine
665 atopic dermatitis: An open randomized comparative trial of two doses. **Veterinary**
666 **dermatology**, v.21, p.42-49, 2009. Disponível em:
667 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2009.00764.x/pdf>>. Acesso em 11
668 ago. 2015. doi: 10.1111/j.1365-3164.2009.00764.x.

Capítulo 2

Manuscrito 2

Barreira Epidérmica

Artigo de investigação segundo as normas da Ciência Rural

Título: A importância da barreira cutânea e o papel do prurido na dermatite atópica canina

Autores: Laura Carolina Barbosa, Amanda Dias Tadeu, Caroline Martins Biancardi, Fabíola Soares Zahn, Luiz Henrique de Araújo Machado

RESUMO

A dermatite atópica (DA) também conhecida como atopia, doença atópica ou dermatite inalante alérgica, é uma doença genética em que o paciente se torna sensível a antígenos ambientais. É classificada como uma reação de hipersensibilidade do tipo 1. Essas reações inflamatórias agudas são mediadas pela imunoglobulina E (IgE) conjugada com mastócitos e basófilos e é assim conhecida por desenvolver-se muito rapidamente após a exposição ao antígeno, apesar de ser assim classificada, sabe-se que a dermatite atópica nem sempre é mediada por IgE, e em alguns pacientes não é possível comprovar o seu envolvimento. Outros mecanismos envolvidos na sua patogenia são a diminuição da função na barreira epidérmica, redução da produção de peptídeos antimicrobianos por células epidérmicas, função das toxinas secretadas por microrganismos, identificação de polimorfismos genéticos e a influência das condições ambientais no desenvolvimento da alergia em indivíduo geneticamente predispostos. O objetivo dessa revisão é demonstrar ao clínico a importância da barreira cutânea na fisiologia da dermatite atópica.

25 **Barreira Epidérmica**

26 A pele é o maior órgão do corpo e constitui uma barreira anatomofisiológica entre o
27 organismo e o meio ambiente. É responsável por fornecer proteção contra lesões físicas,
28 químicas e microbiológicas, além disso, seus componentes sensoriais são responsáveis pela
29 percepção do calor, frio, dor, prurido, toque e pressão (MILLER et al., 2013; AKIHARU et al.,
30 2015).

31 O estrato córneo é a camada mais externa do tecido, é completamente queratinizado e
32 está em constante renovação. Esta camada é formada por corneócitos, os quais são células
33 achatadas, anucleadas e eosinofílicas sendo mais espessas na pele com pouco pelo ou glabra
34 (MILLER et al., 2013).

35 As células do estrato córneo sofrem queratinização, tornam-se células achatadas e
36 anucleadas que são preenchidas por queratina. A autofagocitose aumenta com o acúmulo de
37 queratina, resultando na decomposição de todas as organelas celulares. Apesar de todas as
38 alterações intracelulares, as membranas celulares continuam unidas pelos desmossomos
39 (BANKS, 1992).

40 A queratina é uma mistura de proteína de baixo teor de enxofre imersa em uma matriz
41 amorfa rica em proteínas de alto teor de enxofre. É a proteína mais abundante do estrato córneo
42 e seus filamentos são unidos por ligações cruzadas de filagrina por meio de um processo
43 catalisado por transglutaminases. A filagrina se agrega aos filamentos de queratina em feixes
44 compactados, o que leva ao achatamento celular, uma característica marcante do estrato córneo
45 (KIERSENBAUM, 2006).

46 O complexo queratina-filagrina se deposita na face interna da membrana plasmática dos
47 queratinócitos, formando o envoltório celular cornificado. Proteínas adicionais como a
48 involucrina, proteínas ricas em prolina (PRP) e loricrina, se localizam logo abaixo da membrana

plasmática e reforçam o envoltório celular cornificado. Do lado externo da célula, os lipídeos liberados pelos grânulos lamelares se unem ao envoltório celular por ligações cruzadas e formam o envoltório celular cornificado composto (Figura 1 e 2) (KIERSZENBAUM, 2006).

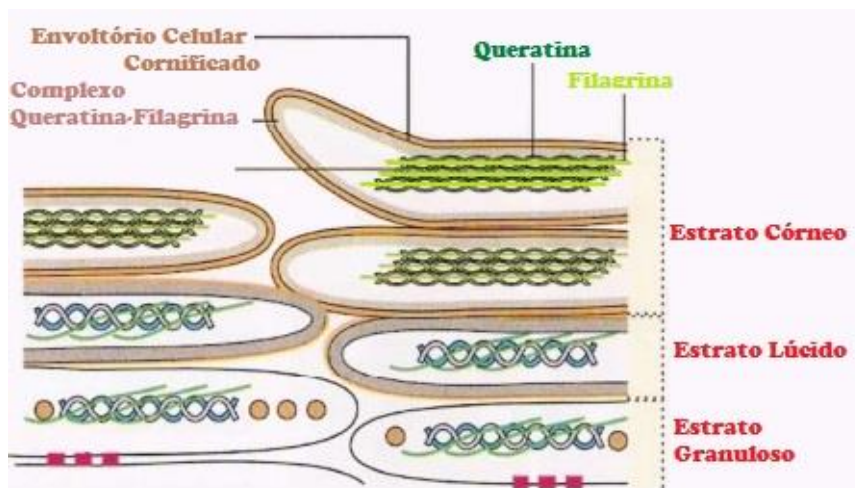


Figura 1. Representação esquemática do complexo queratina-filagrina (Adaptado de KIERSZENBAUM, 2006).

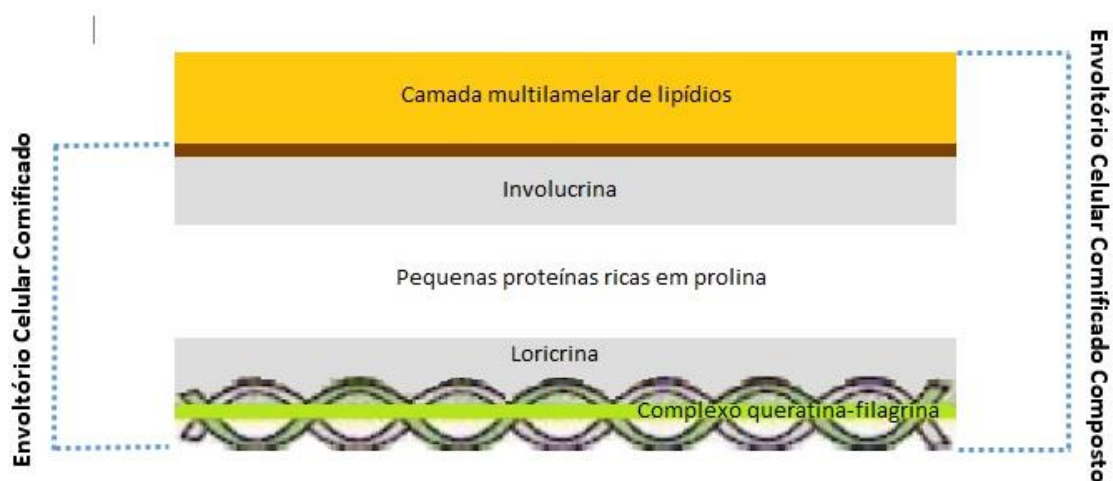


Figura 2. Representação do envoltório celular cornificado (Adaptado de KIERSZENBAUM, 2006).

De uma forma simplificada podemos dizer que os queratinócitos apresentam uma matriz de queratina-filagrina envolvida pelo complexo involucrina-PRP-loricrina que fornece

elasticidade e resistência mecânica, já os lipídeos insolúveis extracelulares se unem à membrana plasmática formando uma barreira de permeabilidade (KIERSENBAUM, 2006).

A integridade estrutural do estrato córneo é mantida pelos desmossomos os quais se ligam aos corneócitos para formar os corneodesmossomos (Figura 3). Como os corneócitos estão em constante renovação, os corneodesmossomos são gradualmente degradados por proteases específicas da pele, o que possibilita à descamação dos corneócitos (CORK et al; 2006)

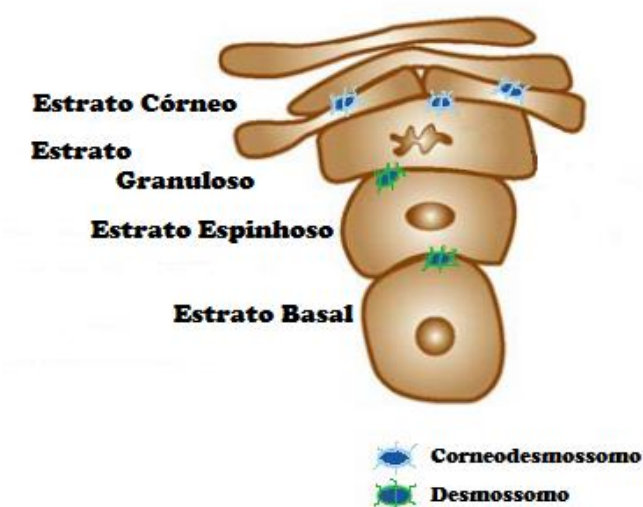


Figura 3: Integridade estrutural da camada córnea mantida pelos desmossomos modificados denominados corneodesmossomos (Adaptado de CORK et al, 2006).

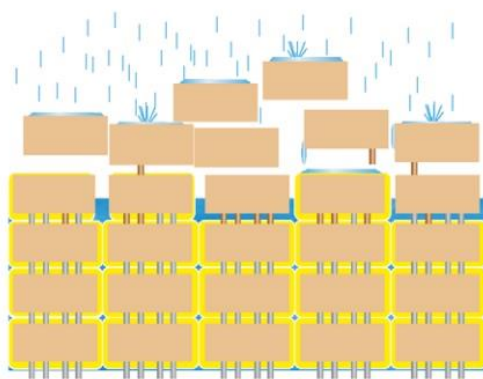
A função da barreira cutânea depende também de uma mistura de lipídeos no espaço intercelular do estrato córneo. As células epidérmicas se movem a partir da membrana basal através da epiderme e sofrem diferenciação na sua superfície, na qual o principal aspecto é o acúmulo de lipídeos. A maior parte dos lipídeos que são sintetizados a partir de corneócitos maduros são embalados em uma organela chamada de corpo lamelar (CL). Próximo ao fim do programa de diferenciação dos queratinócitos, os CLs descarregam o seu conteúdo para o espaço intercelular.

No momento da exocitose essa mistura de lipídeos consiste de fosfolipídeos, glicolipídeos e colesterol e transformações enzimáticas na interface do estrato granuloso resultam na

76 produção principalmente de ceramidas, colesterol e ácidos graxos, o que forma a matriz lipídica
77 lamelar. Essa matriz envolve os corneócitos como cimento e ajudam a prevenir a perda de água
78 transepidérmica, evitam a penetração de materiais solúveis em água, além de dar flexibilidade
79 a barreira epidérmica (WERTZ, 2000; CORK et al, 2006).

80 Os CLs possuem outras funções além da formação da matriz lipídica lamelar, entre elas:
81 proporcionar enzimas que geram ceramidas e ácidos graxos que são incorporados as membranas
82 lipídicas; proporcionar proteases e antiproteases que regulam a digestão de
83 corneodesmosomos, a descamação celular e secretar peptídeos antimicrobianos, como as
84 defensinas, no compartimento intercelular do estrato córneo (HARGIS e GINN, 2013).

85 O componente lipídico do estrato córneo envolve o componente proteico, com o qual se
86 encontra ligado covalentemente, proporciona adesão das células cornificadas aos lipídeos
87 intercelulares, formando o mosaico de corneócitos e lipídeos (Figura 4) (WERTZ, 2000;
88 CORCK et al. 2006; HARGIS e GINN, 2013).



89 Figura 4: Representação do mosaico tijolos (queratinócitos) e cimento (lipídeos), em um
90 indivíduo normal (Adaptado de CORK et al, 2006).

91 Além de desempenhar um papel significativo na formação dos queratinócitos, a filagrina
92 é digerida por enzimas proteolíticas para produzir componentes de aminoácidos que formarão
93 o fator de hidratação natural da epiderme (FHNE) do estrato córneo (polímeros de filagrina),

que mantem a hidratação, a flexibilidade e descamação adequada da pele (HARGIS e GINN, 2013).

A Proteína Filagrina

A filagrina tem como funções agregar, empacotar e alinhar os filamentos de queratina, produzir a matriz entre os filamentos de queratina nos corneócitos, além de ser fonte de aminoácidos livres, importantes na hidratação normal do estrato córneo (BANKS, 1992; MILLER et al., 2013). Ela é encontrada juntamente com a queratina no estrato granuloso, e contribuem para 80-90% da massa epidérmica (McGRATH E UITTO, 2007).

A filagrina é uma das mais importantes proteínas para a queratinização adequada da pele, sendo responsável por facilitar a diferenciação terminal da epiderme e pela formação da barreira. É um polipeptídeo que, agregado ao sistema de citoesqueleto de queratina, forma o envelope celular córneo, uma densa matriz lipo-proteica que evita a perda de água da epiderme e também impede a entrada de alérgenos, substâncias químicas tóxicas e organismos infecciosos (PALMER et al., 2006; JUNGERSTED et al., 2010).

No estrato córneo a FLG é progressivamente degradada por enzimas em associação com um conjunto de aminoácidos hidrofílicos. Esses aminoácidos, seus metabólitos e vários íons compõem o FHNE. Esse fator é altamente higroscópico e desempenha um papel crítico na hidratação e manutenção do pH da pele, regulando eventos bioquímicos chaves, que incluem atividade de proteases, permeabilidade da barreira e defesa microbiana, funções estas que estão fundamentalmente ligadas e co-reguladas.

A expressão da FLG e sua hidrólise são determinadas pelo microambiente da pele que inclui o pH, a umidade externa e a perda de água transepidérmica (McGRATH e UITTO, 2007; O'REGAN et al., 2009).

Estudos em humanos relatam diminuição na expressão da filagrina em pacientes com dermatite atópica, tanto na pele lesionada quanto na pele não afetada clinicamente (IRVINE e

McLEAN, 2006; PROKSCH et al., 2009; DONALD e YASSKY, 2014). Estas mutações levam a defeitos na barreira epidérmica e xerose, que são características marcantes nesta morbidade.

As mutações genicas na proteína FLG auxiliam na compreensão da hipótese de que mecanismos na patogenese da DA podem sintetizar um defeito primário da barreira epitelial, resultando diminuição de mecanismos epidermais, aumento da penetração de alérgenos através da pele, seguidos pela resposta Th2 de linfócitos e inflamação crônica (O'REGAN et al., 2009; LEUNG, 2009; ; DONALD e YASSKY, 2014).

A perda da função devido à mutação nas porções do gene FLG é um dos fatores de risco confirmados para o desenvolvimento da AD em pacientes humanos (KAWASAKI et al., 2011). Essas mutações estão associadas com dermatite atópica grave e precoce, além de piorar de forma significativa a barreira da pele e aumentar o risco de sensibilização alérgênica (NEMOTO-HASEBE et al., 2009; VAN DEN OORD et al., 2009; FLOHR et al., 2010; KAWASAKI et al., 2011).

Estudos apontam que essas mutações não são só reguladas pela genética, mas também pela inflamação da pele. As citocinas Th2, que estão presentes nas lesões agudas da DA regulam negativamente a expressão da filagrina, com impacto na função da barreira da pele (HOWELL et al., 2007; MARSELLA et al., 2011).

A relação entre a inflamação e a barreira cutânea é complexa (VESTERGAARD et al., 2012) porém, embora seja evidente que algumas citocinas possam suprimir a expressão da filagrina nos queratinócitos normais, até o momento é desconhecido se seja possível aumentar a sua síntese em humanos com dermatite atópica, além disso não está claro se isso teria um efeito clínico benéfico, pois a questão envolvida pode não estar somente ligada à quantidade da proteína filagrina, mas também estar relacionada com a qualidade dessa proteína (MARSELLA et al., 2013). Um estudo utilizando uréia tópica em voluntários humanos normais mostrou

aumento da expressão de mRNA da filagrina, mas nenhuma mensuração da proteína foi realizada (GRETHER-BECK et al., 2012).

Marsella et al. (2013) realizaram um estudo onde foi possível constatar que cães Beagle com dermatite atópica apresentavam a coloração imunohistoquímica da filagrina diminuída significativamente em comparação com os cães saudáveis. Se a coloração da filagrina estava diminuída isso é resultado de uma barreira de pele defeituosa, porém não é possível afirmar que se trate de algo primário ou secundário à inflamação, ou até mesmo que esteja diretamente ligada a genética da raça. Esses dados são compatíveis com um estudo utilizando pacientes humanos com dermatite atópica realizados por Palmer et al. (2006).

O Prurido e a Interleucina-31

As citocinas representam uma classe de proteínas responsáveis pela sinalização segregada e funcionam como mensageiros químicos que ajudam na comunicação entre as células. Elas podem afetar vários comportamentos celulares tais como o crescimento, o desenvolvimento, diferenciação, ativação e uma variedade de células do sistema imunológico, bem como tipos de células não imunes. Devido ao seu papel importante na regulação de várias funções celulares, a sua desregulação pode orquestrar uma variedade de alterações a nível celular e molecular que se traduzem em sinais clínicos indesejáveis e doenças crônicas como a DA (GONZALES et al., 2014).

Cães com DA apresentam sinais clínicos típicos como o prurido, tendo um efeito negativo na qualidade de vida tanto do animal quanto do proprietário. No entanto, os mecanismos que levam o desenvolvimento de prurido ainda não estão claros, o que torna difícil o desenvolvimento de terapias específicas para este sinal clínico (GONZALES et al., 2014).

A hipótese atual da patogênese da DA canina propõe que o envolvimento de citocinas pró-inflamatórias, estímulos neuronais e comportamentos pruriginosos estabeleçam um ciclo

vicioso o qual perpetua o prurido, exacerbando as lesões e o defeito da barreira cutânea (COSGROVE et al., 2013).

A interleucina-31 é uma citocina envolvida em estados pruriginosos, como o evidenciado na dermatite atópica e, em humanos, seus níveis séricos se correlacionam com a gravidade da doença. Ela é produzida pelos linfócitos T auxiliares tipo 2 e por linfócitos cutâneos antígeno positivo, os quais são células T da epiderme (GONZALES et al., 2013).

No tecido cutâneo, a IL-31 se liga a um receptor heterodimérico constituído por um receptor α de interleucina-31 (IL-31R α) e um receptor β de oncostatina M (OSMR). Esses receptores podem ser encontrados em queratinócitos, macrófagos e eosinófilos, além de participarem da regulação da resposta imune nessas células (MARSELLA et al., 2012). Após a ligação da IL-31 com esses receptores ocorre ativação da enzima Janus Quinase (JAK), a qual permite que proteínas extracelulares tais como citocinas transmitam sinais para o núcleo das células alvo para que se inicie uma resposta biológica dentro da célula, nesse caso o estímulo pruriginoso (GONZALES et al., 2014).

A expressão da IL-31 é considerada maior em lesões pruriginosas quando comparadas com lesões não pruriginosas, além disso, sua expressão também aumenta quando comparamos lesões não pruriginosas com pele integra de pacientes saudáveis (SONKOLY et al., 2006). Dillon et al. (2004) e Takaoka et al. (2005) injetaram a IL-31 por via subcutânea em ratos e notaram superexpressão da mesma, o que levou ao desenvolvimento de vários sinais característicos como aumento de infiltrado inflamatório na pele, prurido grave, alopecia e lesões auto-induzidas.

Gonzales et al. (2013) administraram a IL-31 em cães alérgicos e saudáveis por meio de diversas vias (intradérmica, intravenosa e subcutânea) e foi possível notar comportamento

pruriginoso em todos os animais, independente da via de administração, sugerindo que esta citocina desempenha um papel de destaque no prurido.

CONCLUSÃO

Podemos concluir que grande parte dos sinais clínicos da dermatite atópica são provenientes de uma barreira de pele danificada, associada à aumento de sensibilização alérgica, infecções e contato irritante, os quais podem estimular a liberação de IL31, e deflagração de prurido.

Esse conhecimento é extremamente importante para se estabelecer uma terapia adequada associado à restauração da barreira e controle dos processos neuro-imunológicos associados ao prurido.

REFERÊNCIAS

- AKIHARU, K. Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. **The Journal of Clinical Investigation**, v.122, n. 2, p. 440-447, 2012. Disponível em: <<http://www.jci.org/articles/view/57416>>. Acesso em 14 de nov. 2015. doi: 10.1172/JCI57416.
- BANKS, W.J. Sistema tegumentar. In: _____. **Histologia veterinária aplicada**. São Paulo: Manole LTDA, 1991. cap.20, p.391-424.
- CORK, M. J. et al. 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. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0091674906011390/1-s2.0-S0091674906011390-main.pdf?_tid=6b088798-4e8c-11e5-b279-00000aabb0f26&acdnt=1440880250_8146544b9c6065c99949979fbc3a4c2b>. Acesso em 10 ago. 2015. doi: 10.1016/j.jaci.2006.04.042.

213 COSGROVE, S.B. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety
 214 of the Janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel®) in client-owned dogs with atopic
 215 dermatitis. **Journal of allergy and clinical immunology**, v.117, n.06, p.587-e142, 2013.
 216 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674905025303>>.
 217 Acesso em 12 jan. 2015.

218 DeBOER, D.J. Skin barrier repair and canine atopic dermatitis. In: INTERNATIONAL
 219 CONGRESS OF THE ITALIAN ASSOCIATION OF COMPANION ANIMAL
 220 VETERINARIANS, 65., 2010, Italy. **Proceedings...** Italy: SCIVAC, 2010. p. 90-91.

221 DETHIOUX, F. A dermatite atópica canina, um desafio para o clínico. **Revista focus**, [s.n],
 222 2006. Acesso em: 12 ago. 2015

223 DILLON, S.R. et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis
 224 in mice. **Nature immunology**. v.5, n.07, p.752-760, 2004. Disponível em:
 225 <<http://www.nature.com/ni/journal/v5/n7/full/ni1084.html>>. Acesso em: 10 jan. 2015.
 226 doi:10.1038/ni1084.

227 FLOHR, C. et al. Filaggrin loss-of-function mutations are associated with early-onset eczema,
 228 eczema severity and transepidermal water loss at 3 months of age. **British Journal of**
 229 **Dermatology**, v.63, n.06, p.333-1336, 2010. Disponível em:
 230 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2133.2010.10068.x/epdf>>. Acesso em 17
 231 fev. 2015. doi: 10.1111/j.1365-2133.2010.10068.x.

232 GRETHER-BECK, S. et al. Urea Uptake Enhances Barrier Function and Antimicrobial
 233 Defense in Humans by Regulating Epidermal Gene Expression. **Journal of Investigative**
 234 **Dermatology**, v.132, p. 1561–1572, 2012. Disponível em:
 235 <<http://www.nature.com/jid/journal/v132/n6/abs/jid201242a.html>>. Acesso em: 13 ago. 2015.
 236 doi: 10.1038/jid.2012.42.

237 HARGIS, A. M.; GINN, P.E. O Tegumento. In: ZACHARY, J.F.; McGAVIN, M.D. **Baseada**
 238 **Patologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. Cap.17, p. 975-1087

239 HOWELL, M.D. et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression.
 240 **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.120, n.01, p.150-155, 2007. Disponível em:
 241 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674907008615>>. Acesso em 10 dez.
 242 2014. doi: 10.1016/j.jaci.2007.04.031.

243 IRVINE, A.D.; McLEAN, W.H.I. Breaking the (Un)Sound Barrier: Filaggrin Is a Major Gene
 244 for Atopic Dermatitis. **Journal of Investigative Dermatology**, v.126, p.1200-1202, 2006.
 245 Disponível em: <<http://www.nature.com/jid/journal/v126/n6/abs/5700365a.html>>. Acesso em
 246 8 dez. 2014. doi: 10.1038/sj.jid.5700365.

247 JUNGERSTE, J.M. et al. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations
 248 in patients with atopic eczema. **Allergy**. v.65, n.07, p.911-918, 2010. Disponível em:
 249 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1398-9995.2010.02326.x/full>>. Acesso em: 06
 250 nov. 2015. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02326.x.

251 KAWASAKI, H. et al. Loss-of-function mutations within the filaggrin gene and atopic
 252 dermatitis. **Current Problems in Dermatology**. v.41, p. 35-46, 2011. Disponível em:
 253 <<http://europepmc.org/abstract/med/21576945>>. Acesso em: 12 dez. 2014. doi:
 254 10.1159/000323291.

255 KIERSZENBAUM A.L. Sistema Tegumentar. In_____ **Histologia e Biologia Celular**. São
 256 Paulo: Elsevier, 2008. Cap.11, p.329-352.

257 LEUNG, D.Y. Our evolving understanding of the functional role of filaggrin in atopic
 258 dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v.124, n.03, p.494-495, 2009.
 259 Disponível em: <[http://www.jacionline.org/article/S0091-6749\(09\)01159-2/abstract](http://www.jacionline.org/article/S0091-6749(09)01159-2/abstract)>. Acesso
 260 em: 10 jan. 2015. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2009.07.041>.

261 LEUNG, D.Y.M; LEDFORD, D.K. Deciphering the complexities of atopic dermatitis:
 262 Shifting paradigms in treatment approaches. **Clinical reviews in allergy and immunology**.
 263 v.134, p.769-779, 2014. Disponível em:
 264 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674914011592>>. Acesso em 10 nov.
 265 2015. doi: doi:10.1016/j.jaci.2014.08.008.

266 MARSELLA, R. et al. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic
 267 dermatitis. **Veterinary dermatology**, v.22, n.03, p.239-248, 2011. Disponível em:
 268 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3164.2011.00967.x/full>>. Acesso em 14
 269 jul. 2015. doi: 10.1111/j.1365-3164.2011.00967.x.

270 MARSELLA, R. et al. Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine
 271 atopic dermatitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.241, n.02,
 272 p.194-207, 2012. Disponível em
 273 <<http://avmajournals.avma.org/doi/pdf/10.2460/javma.241.2.194>>. Acesso em: 7 dez. 2014.
 274 10.2460/javma.241.2.194

275 MARSELLA, R. Does filaggrin expression correlate with severity of clinical signs in dogs with
 276 atopic dermatitis? **Veterinary dermatology**, v.24, n.02, p.266-e59, 2013 Disponível em:
 277 <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vde.12007/abstract>>. Acesso em: 11 jan. 2015.
 278 doi:10.1111/vde.12007.

279 McGRATH, J.A.; UITTO, J. The filaggrin story: novel insights into skin-barrier function and
 280 disease. **Trends in molecular medicine**, v.14, n.01, p.20-27, 2008. Disponível
 281 em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1471491407002213>>. Acesso em: 15
 282 dez. 2014. doi: 10.1016/j.molmed.2007.10.006.

283 MILLER, W.H. et al. Structure and Function of the Skin. In _____. **Small Animal Dermatology**,
 284 7ed. St. Louis: Elsevier Mosby. 2013. Cap. 1, p.1-56.

285 NEMOTO-HASEBE, I. et al. Clinical severity correlates with impaired barrier in filaggrin-
 286 related eczema. **Journal of Investigative Dermatology**, v.129, p. 682-689, 2009. Disponível

287 em: <<http://www.nature.com/jid/journal/v129/n3/abs/jid2008280a.html>>. Acesso em 13 fev.
 288 2015. doi: 10.1038/jid.2008.280.

289 O'REGAN, G.M. et al. Filaggrin in atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical**
 290 **Immunology**, v.124, n.03, p. r2-r6, 2009. Disponível em:
 291 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674909011233>>. Acesso em: 17 fev.
 292 2015. doi: 10.1016/j.jaci.2009.07.013.

293 PALMER, C.N.A. et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein
 294 filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. **Nature**, v. 38, p. 441-446, 2006.
 295 Disponível em: <<http://www.nature.com/ng/journal/v38/n4/full/ng1767.html>>. Acesso em: 12
 296 dez. 2014. doi: 10.1038/ng1767.

297 PROKSCH, E. et al. Role of the epidermal barrier in atopic dermatitis. **Journal der Deutschen**
 298 **Dermatologischen Gesellschaft**, v.7, n.10, p.899-910, 2009. Disponível em:
 299 <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1610-](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1610-0387.2009.07157.x/abstract;jsessionid=86A6F6F789BE313EF57CF03109963949.f02t03?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false)
 300 [0387.2009.07157.x/abstract;jsessionid=86A6F6F789BE313EF57CF03109963949.f02t03?den](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1610-0387.2009.07157.x/abstract;jsessionid=86A6F6F789BE313EF57CF03109963949.f02t03?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false)
 301 [iedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1610-0387.2009.07157.x/abstract;jsessionid=86A6F6F789BE313EF57CF03109963949.f02t03?deniedAccessCustomisedMessage=&userIsAuthenticated=false)>. Acesso em: 24 nov. 2014. doi:
 302 10.1111/j.1610-0387.2009.07157.x.

303 SONKOLY, E. et al. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation.
 304 **Journal of Allergy and Clinical Immunology**., v.117, n. 2, p.411-417, 2006. Disponível em:
 305 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091674905023274>>. Acesso em 5 mar.
 306 2015. doi 10.1016/j.jaci.2005.10.033.

307 TAKAOKA, A. et al. Expression of IL-31 gene transcripts in NC/Nga mice with atopic
 308 dermatitis **European Journal of Pharmacology**, v. 516, p.180–181, 2005. Disponível em:
 309 <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299905004693>>. Acesso em: 7 mar.
 310 2015. doi: 10.1016/j.ejphar.2005.04.040.

311 TIZARD, I.R. Hipersensibilidade do tipo I. In_____ **Imunologia veterinária: uma**
 312 **introdução**. 5 ed. São Paulo: Ed. Roca, 1998. p. 357-373.

313 VAN DEN OORD, R.A. et al. A. Filaggrin gene defects and risk of developing allergic
 314 sensitization and allergic disorders: systematic review and meta-analysis. **British Medical**

315 **Journal**, v. 339, p. 1-12, 2009. Disponível em:
316 <<http://www.bmj.com/content/bmj/339/bmj.b2433.full.pdf>>. Acesso em: 17 fev. 2015.
317 doi:10.1136/bmj.b2433.

318 VESTERGAARD, C. et al. Inflammation-induced alterations in the skin barrier function:
319 implications in atopic dermatitis. **Chemical Immunology and Allergy**, v. 96, p. 77-80, 2012.
320 Disponível em: <<http://www.karger.com/Article/Abstract/331889>>. Acesso em: 20 fev. 2015.
321 doi: 10.1159/000331889.

322 WERTZ, P.W. Lipids and barrier function of the skin. **Acta Dermato Venereologica**, v.208,
323 p.7-11, 2000. Disponível em: <[http://www.beauty-review.nl/wp-](http://www.beauty-review.nl/wp-content/uploads/2014/11/Lipids-and-barrier-function-of-the-skin.pdf)
324 [content/uploads/2014/11/Lipids-and-barrier-function-of-the-skin.pdf](http://www.beauty-review.nl/wp-content/uploads/2014/11/Lipids-and-barrier-function-of-the-skin.pdf)>. Acesso em: 23 dez.
325 2014. doi: não encontrado

Capítulo 3

Capítulo 3

Artigo de investigação segundo as normas da Veterinary Dermatology

Título: Eficácia da restauração da barreira cutânea na minimização da expressão da IL-31 em cães com dermatite atópica.

Autores: Laura Carolina Barbosa, Amanda Dias Tadeu, Carlos Eduardo Fonseca Alves, Renée Laufer Amorim, Caroline Martins Biancardi, Fabíola Soares Zahn, Luiz Henrique de Araújo Machado

Título: Eficácia da restauração da barreira cutânea na minimização da expressão da IL-31 em cães com dermatite atópica.

Autores: Laura C. Barbosa*, Amanda D. Tadeu*, Carlos E. F. Alves*, Renée L. Amorim*, Caroline M. Biancardi*, Fabíola S. Zahn*, Luiz H. A. Machado*

*Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus Botucatu

Nome do autor correspondente: Luiz Henrique de Araújo Machado

Endereço: Distrito de Rubião Junior, s/n, Departamento de Clínica Veterinária; Caixa Postal 56018618-970 - Botucatu, SP;

Título Curto: Interleucina 31 e restauração epidérmica

RESUMO

Introdução: O prurido é uma característica marcante na dermatite atópica. Estudos preliminares tem apontado a interleucina-31 como uma citocina envolvida com o grau de prurido nas alergopatias.

Hipótese/Objetivo: O objetivo foi padronizar a técnica da imunohistoquímica para IL-31 e avaliar a correlação entre prurido, IL-31 e restauração da barreira cutânea em cães com dermatite atópica, antes e depois da aplicação da solução repositora de lipídeos na epiderme.

Animais: Foram utilizados 2 grupos de cães, sendo 23 animais saudáveis e 15 animais com dermatite atópica, todos provenientes do serviço de dermatologia veterinária do hospital.

Métodos: Como tratamento para os cães com dermatite atópica utilizamos banhos semanais com clorexidina 2% e repositores tópicos de lipídeos, uma aplicação a cada 7 dias, durante 30 dias. O grau de prurido foi avaliado pelos proprietários através da escala do prurido Rybníček et al (2008) e um clínico avaliou o score através do CADESI-04.

Resultados: Foi possível padronizar a técnica de imunohistoquímica. Não houve diferença significativa entre a expressão da IL-31 quando comparadas as regiões dorsal e axilar de cães saudáveis. Quando comparamos sua expressão entre cães com dermatite atópica e saudáveis foi possível notar maior expressão de IL-31 em cães com dermatite atópica. Quando comparada a expressão de IL-31 antes e após a reposição lipídica a expressão da IL-31 diminuiu significativamente após a aplicação.

Conclusão: Podemos concluir que a citocina IL-31 provavelmente esteja envolvida na fisiologia do prurido atópico e que a restauração da barreira cutânea é primordial para que consigamos controlar o prurido e a hiper-reatividade do sistema imunológico.

INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) é uma doença genética em que o paciente se torna sensível a antígenos ambientais, como ácaros de poeira doméstica, esporo de fungos, pólen de vegetais, poeira doméstica, escama de cães e humanos, fragmentos de insetos, os quais em cães saudáveis são inofensivos ¹.

A dermatite atópica (DA) é uma dermatite crônica e recorrente, de cunho alérgico e inflamatório, com predisposição genética, cujas manifestações clínicas estão associadas à produção de anticorpos da classe IgE ². É considerada uma síndrome de caráter multifatorial e sua fisiopatologia está relacionada a mutações genéticas que conduzem a distúrbios da queratinização terminal e da função de barreira tegumentar, o que favorece a penetração transepidérmica de inúmeros alérgenos ambientais, antígenos microbianos e irritantes primários, além de hiper-reatividade da resposta imunológica ^{3, 4, 5, 6, 2} o que conduz ao eczema atópico ^{4, 5, 7}.

A DA supostamente afeta entre 3 a 15% da população canina, embora a real prevalência e incidência na população geral sejam desconhecidas^{8,9,2}. Clinicamente apresenta-se como uma doença de pele pruriginosa, compartilhando muitas características com a dermatite atópica humana, como uma predisposição hereditária, similaridade histopatológica, semelhanças clínicas e imunológicas, prurido como sinal clínico predominante, além da importância da via epicutânea na exposição aos alérgenos.

A interleucina-31 é produzida pelos linfócitos *helper* tipo 2 (Th2) e por linfócitos cutâneos e se encontra elevada em condições pruriginosas como a dermatite atópica em humanos e em cães, e seus níveis séricos se correlacionam com a gravidade da doença nesses pacientes. A IL-31 se liga a receptores específicos do tecido cutâneo, após essa ligação ocorre ativação da enzima Janus Quinase (JAK), a qual é responsável por transmitir sinais para o núcleo da célula, desencadeando através das terminações nervosas o estímulo pruriginoso¹⁰.

O objetivo desse trabalho foi padronizar as técnicas de imunohistoquímica para evidênciação de IL-31, e avaliar seus níveis antes e após o tratamento da dermatite atópica com repositores de lipídeos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local

O presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (processo Fapesp nº 2012/12774-8), protocolado na Comissão de Ética sob os nºs 110/2012 e 111/2012. Todos os proprietários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando a coleta de materiais e utilização dos dados obtidos em publicações futuras.

As amostras foram provenientes do arquivo de amostras colhidas de animais da rotina do hospital veterinário. Os exames dermatológicos e coletas das amostras foram realizados pelo Serviço de Dermatologia Veterinária do hospital veterinário e os exames de imunohistoquímica foram realizados com a colaboração do serviço de Patologia Veterinária do hospital veterinário.

Seleção e número de animais

O experimento teve dois grupos, sendo um composto por amostras provenientes de cães hígidos e sem queixas dermatológicas e outro por amostras de cães com dermatite atópica.

O grupo um foi composto por 46 amostras de pele (23 amostras axilares e 23 cervicais dorsais), provenientes de cães independente do gênero sexual, racial e faixa etária, sem queixas dermatológicas ou de doenças sistêmicas que alterassem a composição lipídica da pele, tais como hipotireoidismo e hiperadrenocorticismismo.

O grupo dois foi composto por 30 amostras de pele (15 amostras axilares e 15 cervicais dorsais) provenientes de cães atendidos pelo Serviço de Dermatologia Veterinária do hospital veterinário, com diagnóstico de dermatite atópica, os quais obedeciam no mínimo 5 dos critérios diagnósticos estabelecidos por Favrot et al. (2010)¹¹. Foram previamente descartadas outras dermatopatias pruriginosas como

116 acaríase sarcóptica, e outros dermatopatias de origem alérgica como dermatite
117 alérgica à picada de ectoparasitas e hipersensibilidade alimentar.

118 As dermatopatias alérgicas foram excluídas utilizando além dos critérios de
119 Favrot et al (2010), os critérios de exclusão, ou seja os cães foram submetidos a
120 rigoroso controle de ectoparasitas a cada 21 dias, durante 2 meses e após essa
121 etapa passaram pela dieta de eliminação, onde foi fornecido dieta hipoalergenica
122 comercial ou dieta caseira com uma proteína que esse animal nunca tenha tido
123 contato, por no mínimo 8 semanas, caso o animal não respondesse a essas terapias
124 era incluso no estudo, portanto todos os cães desse estudo tinham dermatite atópica
125 *strictu sensu*.

126 *Avaliação do prurido*

127 O prurido dos cães foi mensurado na ocasião do atendimento segundo o
128 escore de prurido de Rybníček et al. (2008) ¹², inicialmente pedindo-se que o dono
129 atribuísse nota de 0-10 ao prurido (prurido espontâneo) e, num segundo momento,
130 servindo-se com consulta à escala de escore de prurido de Rybníček et al. (2008)
131 (prurido esclarecido).

132 *Exames complementares*

133 Além de exame clínico completo, os cães passaram por exames
134 dermatológicos, a saber: escovado do pelame utilizando pente fino, tricograma,
135 impressão em fita de acetato, citologia, exame parasitológico por raspado cutâneo
136 superficial e profundo, fluorescência por lâmpada de Wood (Brasmed S.A) e cultura
137 fúngica (quando necessário).

138 *Acompanhamento clínico*

139 Os cães com dermatite atópica incluídos no estudo foram submetidos a exame
140 clínico dermatológico no momento inicial e após 30 dias, e seu escore lesional foi
141 estabelecido pela escala CADESI-4, validada por Olivry et al. (2014) ¹³.

142 *Reposição de ceramidas*

143 Os cães do grupo dois foram tratados com repositor comercial de lipídeos
144 (ceramidas e colesterol 5%, ácidos graxos 11,4%; água.qsp 100%; Allerderm® spot
145 on; Virbac, São Paulo, SP, Brasil) conforme recomendações do fabricante, durante
146 30 dias, sendo uma aplicação no dia do atendimento e uma a cada sete dias até o
147 momento da nova coleta.

148 *Colheita e acondicionamento das Amostras*

149 Para colheita das amostras, os cães foram sedados com acepromazina na
150 dose de 0,05 mg/kg em associação com a morfina na dose de 0,5 mg/kg, seguido de
151 anestesia local ou anestesia dissociativa com 0,5 mg/kg de diazepam e 2 mg/kg de
152 cetamina IV ou propofol 5 mg/kg.

153 Os fragmentos cutâneos foram obtidos por *punch* de 6 mm, das regiões axilar e
154 cervical dorsal.

155 No grupo um foi feita apenas uma coleta da amostra, enquanto que no grupo
156 dois foram feitas duas coletas com intervalo de um mês entre estas.

As amostras colhidas foram devidamente identificadas, acondicionadas em criotubos embebidas em crioprotetor O.C.T (Tissue Tek®), congeladas a -80°C e submetidas à secção por congelação em criostato modelo Leica CM1850, obtendo cortes de 25 µm em lâminas silanizadas

Processamento Histológico

Os fragmentos de pele foram submetidos ao procedimento histopatológico pela técnica de corte de congelação. As secções histológicas tinham espessura de 8 µm e foram dispostas em lâminas carregadas positivamente (Starfrost – KnitteGlass, Braunschweig, Alemanha) para promover aderência do corte à lâmina. Foram realizados 106 cortes e uma lâmina de cada amostra (totalizando 46 lâminas dos cães controle e 60 lâminas dos cães com DA) foram coradas pelo método de Hematoxilina & Eosina (LUNA, 1968), segundo protocolo do laboratório de patologia e o material foi examinado de forma independente em microscópio óptico por dois patologistas.

Padronização da IL-31

O primeiro teste de imunohistoquímica realizado revelou marcação positiva em células inflamatórias localizadas na epiderme, com marcação positiva para células estromais e alguns folículos pilosos. Esse protocolo foi realizado a partir de técnica padronizada do Laboratório do Serviço de Patologia Veterinária, baseada na metodologia descrita por HSU et al. (1981), com algumas modificações e utilizando o anticorpo anti-IL-31 policlonal para caracterizar o índice de expressão, sendo que para isto foram contadas as células marcadas em 20 campos de observação. Parte da marcação foi considerada inespecífica e o protocolo foi adaptado para minimizá-la.

Imunohistoquímica

Para a realização da técnica de imunohistoquímica foi utilizado o sistema de polímero (Histofine® - Nichirei Biosciences, Tokyo, Japão); o anticorpo primário, anti-interleucina 31 (Anti IL31 – Abcam, Cambridge, Reino Unido); os sistemas de bloqueios de peroxidase endógena e de proteínas inespecíficas, além de cromógeno Autostainer–Daki Cytomation, California, EUA). A padronização da técnica de imunohistoquímica foi realizada inicialmente pelo sistema automático de imunohistoquímica (DAB – Dako Cytomation, California, EUA.), e pelo protocolo padrão realizado manualmente. Para a técnica de IHQ utilizou-se a técnica padronizada no Laboratório de IHQ do Serviço de Patologia Veterinária, com algumas modificações e utilizando-se o anticorpo anti-IL31, diluído na proporção 1:100. As lâminas foram retiradas do congelador e repousadas a temperatura ambiente (27°C) por 15 minutos. As amostras foram circundadas com caneta hidrofóbica e foi instilada uma gota de peroxidase em cada uma para realização do bloqueio. O material com peroxidase permaneceu por 20 minutos em temperatura ambiente e após foram realizadas 3 lavagens com água deionizada, seguida da secagem das lâminas. Para o bloqueio de proteína foram instiladas 2 gotas em cada amostra que permaneceram em contato com o material por 20 minutos. Após a retirada do bloqueio, sem realização de lavagem, foi instilado o anticorpo primário. O material com o anticorpo primário permaneceu 18 horas refrigerado e então lavado com água deionizada. Após a lavagem foi instilado o anticorpo secundário Envision (Envision - Dako Cytomation, California, EUA) em cada amostra e condicionado em

estufa (27°C) por 1 hora. O material foi retirado da estufa e lavado com água deionizada e então instilado o DAB. Foi realizada lavagem com água deionizada e então adicionada hematoxilina à amostra, permanecendo em contato por 2 minutos, e posterior lavagem com água corrente por 5 minutos. As montagens das lâminas foram realizadas em 8 etapas: fixação em álcool 85°, álcool 95°, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III, xilol I, xilol II e xilol III, todas por 3 minutos cada. Após a retirada de excesso de material e posterior colagem das lamínulas, as lâminas estavam prontas.

Interpretação dos resultados

A quantificação da coloração de imunohistoquímica foi realizada pelo método semi-quantitativo de escore de distribuição de células marcadas. Em todo o material foram contadas todas as células do corte e realizada uma proporção entre a quantidade de células positivas e células totais. O sistema de escore seguiu o descrito por Fonseca-Alves et al. (2013) ¹⁴ de acordo com o seguinte: 0: ausência de marcação nas células; 1: 1 a 25% de células positivas; 2: 26 a 50% de células positivas; 3: 51 a 75% de células positivas; 4: acima de 76% de células positivas.

Estatística

O test t Wilcoxon foi utilizado para comparar amostras pareadas, e o test t Mann Whitney para amostras não-pareadas, ambos aplicados nos cães saudáveis e nos com DA, antes e após a aplicação do repositor comercial de lipídeos. A correlação de Spearman foi utilizada para correlacionar a significância da melhora clínica dos cães e a expressão da IL31.

RESULTADOS

A técnica foi realizada em 46 lâminas todas pertencentes a cães saudáveis (23 da região axilar e 23 da região cervical dorsal), e os resultados referentes a quantidade de células marcadas em relação as lâminas coradas da região axilar e cervical dorsal estão descritas no quadro 1.

Quadro 1. Escore IHQ da expressão da IL-31 da região axilar e cervical dorsal de cães saudáveis.

Animal	Escore IHQ da região axilar	Escore IHQ da região cervical dorsal
1	0	2
2	1	3
3	1	2
4	1	3
5	3	2
6	2	2
7	1	1
8	3	2
9	2	2
10	3	3
11	2	1
12	1	0
13	2	2
14	1	0
15	1	2
16	1	1
17	2	3
18	2	1
19	0	3
20	1	2
21	2	1
22	1	1
23	1	1

Nos cães com DA foram realizadas 60 lâminas (15 lâminas da região axilar antes da aplicação, 15 lâminas da região cervical dorsal antes da aplicação, 15 lâminas da região axilar após a aplicação e 15 lâminas da região cervical dorsal após a aplicação). Os resultados referentes a quantidade de células marcadas da região axilar e cervical dorsal estão listados no quadro 2.

Quadro 2. Escore IHQ da expressão de IL-31 na região axilar e cervical dorsal de cães com dermatite atópica antes e após o tratamento com repositor de lipídeos

Animal	Score IHQ região axilar antes da aplicação	Score IHQ região axilar após a aplicação	Score IHQ região cervical dorsal antes da aplicação	Score IHQ região cervical dorsal após a aplicação
1	3	2	2	2
2	2	2	2	1
3	3	3	4	2
4	4	2	4	2
5	2	1	3	1
6	4	3	3	1
7	3	1	4	3
8	2	2	3	3
9	3	3	2	1
10	4	2	3	2
11	4	2	4	3
12	3	1	3	3
13	2	2	4	2
14	3	3	2	1
15	4	3	3	3

Os valores referentes a estatísticas estão representados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Representação estatística dos valores de IL₃₁ (mediana e desvio padrão) de cães saudáveis e com dermatite atópica (DA) antes e após o tratamento (utilizando o Test t Wilcoxon).

	Região axilar cães saudáveis ^A	Região axilar cães DA antes tratamento ^{A,B}	Região axilar cães DA após tratamento ^B	Região cervical cães saudáveis ^C	Região cervical cães antes tratamento ^{C,D}	Região cervical cães DA após tratamento ^D
Mediana	1,478	3,067	2,133	1,739	3,067	2,000
Desvio Padrão	0,8458	0,7988	0,7432	0,954	0,7988	0,8452

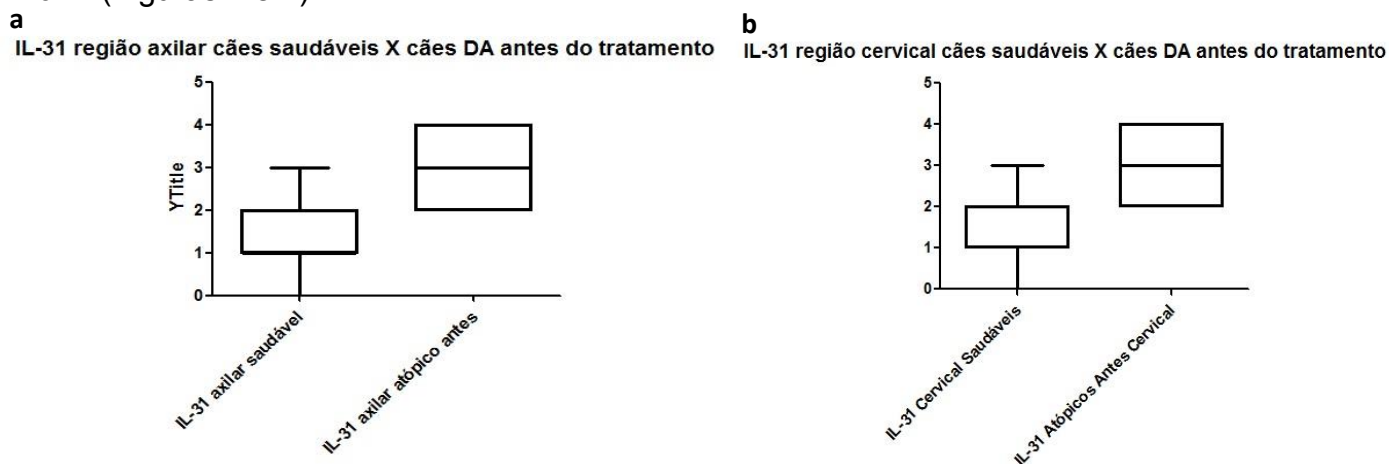
Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t* de Wilcoxon). $p < 0,05$.

Tabela 2. Representação estatística dos valores de IL-31 (mediana e desvio padrão) entre cães saudáveis e cães com dermatite atópica (DA) antes e após o tratamento (Test t Mann Whitney).

	Região axilar cães saudáveis ^A	Região axilar cães DA antes tratamento ^A	Região cervical cães saudáveis ^B	Região cervical cães DA antes tratamento ^B
Mediana	1,478	3,067	1,739	3,067
Desvio Padrão	0,8458	0,7988	0,9154	0,7988

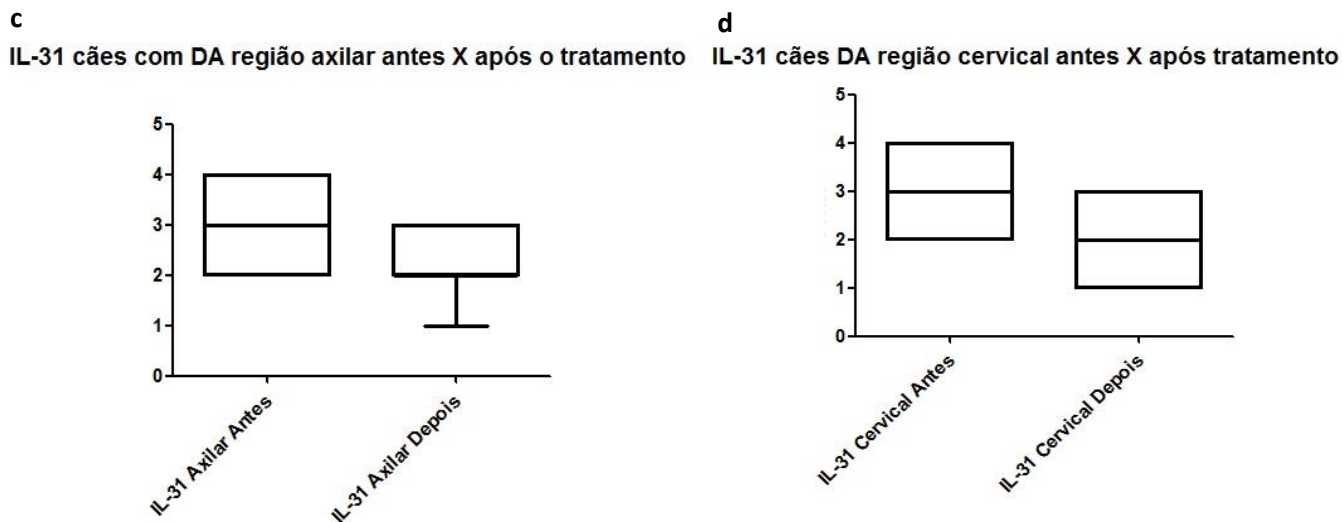
Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t* Mann Whitney). $p < 0,05$.

Os resultados mais relevantes estão representados através do Box Spot (Figuras 1 e 2).



///

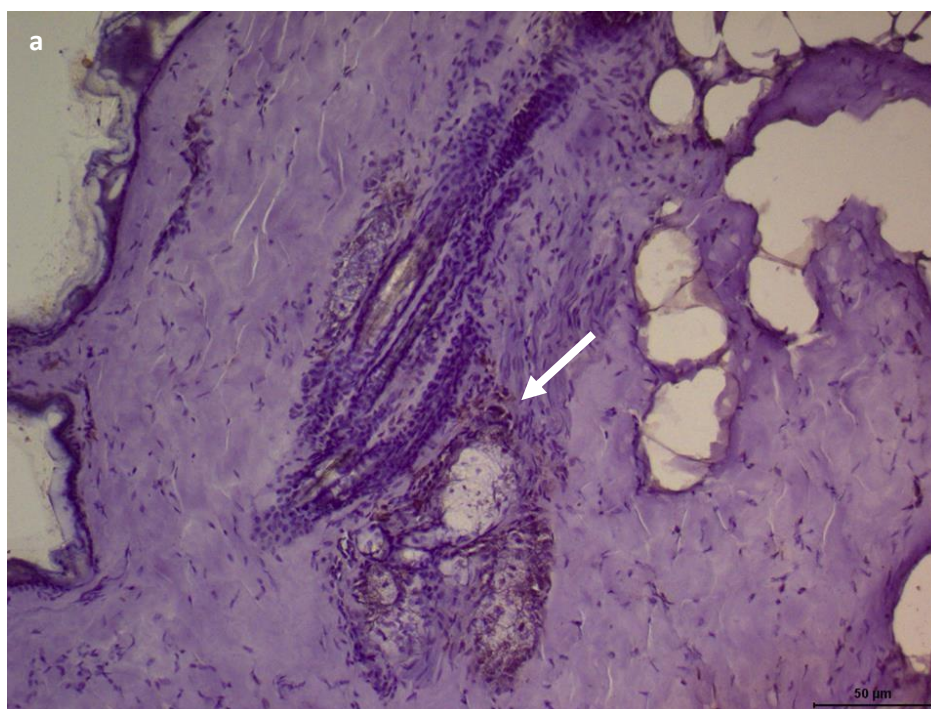
Figura 1. a e b representação através do Box Spot da diferença entre a expressão da IL-31 nas regiões de cães saudáveis e cães com DA antes do tratamento com repositores de lipídeos (a-região axilar e b- região cervical)



281

282 **Figura 2.** c e d representação através do Box Spot da diferença entre a expressão da
 283 IL-31 nas regiões de cães com DA, antes e após o tratamento com repositores de
 284 lipídeos (c- região axilar e d- região cervical)

285 Quando comparamos visualmente as lâminas dos cães saudáveis (Figura 3),
 286 cães com DA antes e após o tratamento (Figura 4), podemos notar uma menor
 287 expressão da IL-31 nos cães saudáveis e nos cães com DA tratados. A IHQ
 288 demarca a IL-31 com uma coloração acastanhada.



289 **Figura 3.** Amostra de pele de um animal saudável (a). Notar a pouca marcação das
 290 células de IL-31(seta)
 291

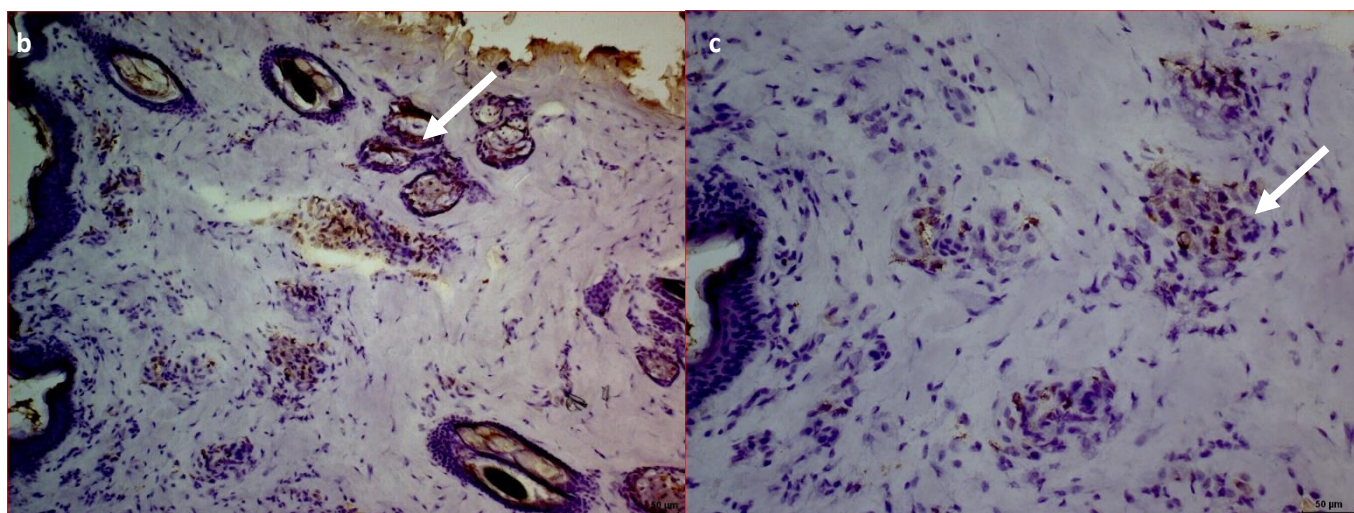


Figura 4. Comparação da pele de um animal atópico antes do tratamento a esquerda (b) e depois do tratamento a direita (c). Marcação das células de IL-31 (setas)

Para avaliar clinicamente a eficácia do nosso tratamento utilizamos a escala CADESI-04 e escores de prurido (Quadro 4).

Ao analisar a resposta ao tratamento clínico dos cães com DA vimos que houve uma diminuição significativa dos valores do CADESI-04 (valores do CADESI menores que 23, o que nos indica uma dermatite atópica leve ou em remissão).

Quando comparamos o CADESI com a expressão da IL-31 utilizando o cálculo da correlação e significância de Spearman, não vemos qualquer tipo de relação, por outro lado, quando comparamos todos os parâmetros, há uma correlação significativa (em um nível de 95%) entre CADESI nos animais atópicos antes do tratamento e a expressão da IL-31 da região axilar dos mesmos.

Os escores dos níveis de prurido (tanto o espontâneo, quanto o esclarecido) se correlacionam com os valores do CADESI e com a menor expressão da IL-31 após o tratamento com o repositor de lipídeos.

Quadro 4. Escala CADESI-04, escores do prurido (espontâneo e esclarecido) e IL-31 axilar antes (AT) e após (PT) o tratamento.

	Prurido espontâneo		Prurido esclarecido		CADESI-04		IL-31	
	ATA	PTA	ATB	PTB	ATC,D	PTC	Axilar ATD	Axilar PT
Mediana	9,0	4	8	3	80	15	3,067	2,133
Desvio padrão	0,8	1,5	0,5	0,6	7	5	0,7988	0,7432

Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t Spearman*). $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

O prurido é a principal queixa em cães com problemas dermatológicos. Nos últimos anos estudos envolvendo os mediadores e as vias neuronais para transmissão do prurido cresceu acentuadamente. Este conhecimento crescente se faz necessário para que novos alvos terapêuticos sejam desenvolvidos ¹⁵.

Rossbach e Baumer (2014) analisaram a expressão de receptores para vários mediadores do prurido em cães nos gânglios da raiz dorsal, e os receptores de IL-31 foram encontrados em todos os cães do estudo.

A partir de biopsia da pele de cães normais foi possível notar que a maioria dos animais tiveram marcação para IL-31, e não houve diferença significativa na expressão da IL-31 da região axilar e cervical dorsal desses animais. Isso demonstra que a IL-31 está presente na pele de cães saudáveis, porém ela não é capaz de induzir o prurido nesses casos. Uma hipótese é de que cães saudáveis apresentem uma barreira de pele íntegra, o que evita a entrada de alérgenos e microrganismos, e impede a via de ativação da IL-31, uma resposta imune exacerbada e consequentemente o prurido. O limiar do prurido também é muito importante nesses casos, pois cães com dermatite atópica apresentando uma barreira de pele prejudicada possuem um limiar de prurido menor do que cães com a barreira de pele íntegra.

Comparando à expressão da IL-31 foi possível constatar índices maiores em cães com DA, o que sugere que a IL-31 possa estar desregulada nesses animais, e contribua para a patogenia da doença. Devido a barreira de pele prejudicada e entrada de alérgenos na pele de cães com DA, ocorre ativação do sistema imunológico e liberação de várias citocinas entre elas a IL-31. A IL-31 liga-se a receptores específicos da pele que ativam a enzima Janus Quinase. Essa enzima é responsável por desencadear o prurido através da estimulação de neurônios sensoriais ^{10, 20}.

Foi possível notar uma diferença significativa entre a expressão da IL-31 em ambas as regiões de cães com DA, antes e após o tratamento com o repositório comercial de lipídeos, sendo que a expressão de IL-31 diminuiu após a aplicação.

A ceramida constitui o principal lipídio presente no estrato córneo, dando estabilidade e flexibilidade para a barreira cutânea e impedindo a perda de água transepidérmica. Uma desorganização das lamelas lipídicas tem sido observada em cães com DA, deixando-os suscetíveis a insultos externos e a hiper-reatividade do sistema imunológico ²¹.

Após a reposição de lipídeos, os cães com DA provavelmente conseguiram uma maior estabilidade da barreira epidérmica, diminuindo a penetração de material exógeno e consequentemente a inflamação²², reduzindo assim a expressão da IL-31. O fato de termos escolhido o banho com o clorexidine a 2% foi para que houvesse uma diminuição da colonização bacteriana, muito comum em cães com DA ².

Quando comparado a região axilar dos cães normais com a dos cães com DA após o tratamento, notamos que houve uma diferença significativa entre a expressão de IL-31. Mesmo após o uso do repositório de lipídeos os cães com dermatite atópica

continuum tendo uma expressão maior do que os normais, e isso pode ser explicado pelo fato da DA ser uma doença multifatorial, e somente a reposição de lipídeos não ser capaz de sanar todas as deficiências da pele atópica e normalizar a liberação desta citocina.

No entanto quando comparamos a região cervical dorsal dos cães normais com os cães com DA, houve normalização dos índices de IL-31 após o tratamento, o que pode ser explicado pelo fato da região axilar ser mais acometida na dermatite atópica, e também pelo fato de ser uma região glabra, intertriginosa e, portanto, mais suscetível a inflamação. Outro fator importante é que em nosso estudo a aplicação do repositório de lipídeos foi feita na região cervical dorsal e isso também pode ter interferido no resultado, já que a região axilar fica distante do local da aplicação.

A reposição de lipídeos também foi capaz de melhorar os índices lesionais dos cães com DA, o que denota que a restauração da barreira epidérmica está diretamente relacionada a melhora clínica, entretanto, quando correlacionamos a região axilar com o escore do CADESI-04 antes da aplicação da solução de lipídeos, houve uma piora em seus escores, o que é o esperado por ser uma das áreas mais acometidas na dermatite atópica, além de ser uma área topograficamente distante da aplicação da solução lipídica.

Foi possível através do CADESI e dos valores do prurido espontâneo e esclarecido estabelecer uma ligação direta com a reposição de lipídeos e diminuição da expressão da IL-31, portanto concluímos que restaurando a barreira cutânea somos capazes de diminuir de forma significativa o prurido e os sinais clínicos da DA.

A DA é uma doença multifatorial, portanto envolve interações complexas entre genes de suscetibilidade, disfunção da barreira epidérmica e hiper-reatividade do sistema imunológico, que juntos produzem uma hipersensibilidade a alérgenos ambientais e alimentares em cães. Diante disso nem todos os cães apresentaram todas as alterações moleculares e celulares, e uma análise individual de cada animal pode ser necessária ^{1,2}.

CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir que foi possível padronizar a técnica da IHQ e quantificar a IL-31. A expressão da IL-31 em cães com DA foi superior aos normais, a reposição de lipídeos foi capaz de minimizar sua expressão tegumentar, os valores do CADESI e os scores do prurido (espontâneo e esclarecido) diminuíram com a reposição lipídica, melhorando assim a qualidade de vida do animal.

REFERÊNCIAS

1. MILLER, W.H. et al. Hypersensitivity Disorders. In _____. *Small Animal Dermatology*, 7ed. St. Louis: Elsevier Mosby. 2013; 365-388.
2. OLIVRY, 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: 233-248.
3. HILLIER, A. Allergy testing and treatment for canine atopic dermatitis. *Vet med*, 2002, 97: 210-224.

- 408 4. AKDIS, C.A. et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and
409 adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American
410 Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Report. *J.*
411 *Allergy Clin. Immunol*, 2006, 61: 969-897.
- 412 5. CORK, M. J. et al. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic
413 dermatitis: Gene-environment interactions. *J Allergy Clin. Immunol*, 2006, 118: 3-21.
- 414 6. FARIAS, M.R. Dermatite atópica canina: da fisiopatogênia ao tratamento. *Clín*
415 *Vet*, 2007, 69: 48-62.
- 416 7. MORAR, N. et al. The genetics of atopic dermatitis. *J Allergy Clin. Immunol*, 2006,
417 118: 24-34.
- 418 8. NODTVEDT, A. et al. A case-control study of risk factors for canine atopic
419 dermatitis among boxer, bullterrier and west highland white terrier dogs in Sweden.
420 *Vet Dermatol*, 2007; 18: 309-315.
- 421 9. JAEGER, K. et al. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a
422 comparison of five locations in three continents. *Vet. Dermatol*, 2010, 21: 119-123.
- 423 10. GONZALES, A.J. et al. Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally
424 occurring canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol*, 2013, 24: 48-e12.
- 425 11. FAVROT, F.; STEFFAN, W.S.; PICCO, F.; A prospective study on the clinical
426 features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet. Dermatol*. 2010,
427 21: 23-31.
- 428 12. RYBNÍČEK, J. et al. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs.
429 *Vet. Dermatol*, 2008, 20: 115-122.
- 430 13. OLIVRY et al. Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for
431 assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Vet. Dermatol*, 2014, 25: 77-e25.
- 432 14. FONSECA-ALVES, C. E. Expressão do C-MYC, NKX3.1 e E-CADERINA por
433 imunohistoquímica em microarranjo de tecido (TMA) de lesões pré-neoplásicas e
434 neoplásicas na próstata de cães. 2013. 50f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de
435 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita
436 Filho", Botucatu.
- 437 15. ROSSBACH, K. BAUMER, W. PCR detects bands consistent with the expression
438 of receptors associated with pruritus in canine dorsal root ganglia. *Vet. Dermatol*,
439 2014, 25: 9-e4.
- 440 16. RAAP, U. et al. Correlation of IL-31 serum levels with severity of atopic
441 dermatitis. *J. Allergy Clin. Immunol*, 2008, 22: 421-423.
- 442 17. EZZAT, M.H.M; HASAN, Z.E.; SHAHEEN, K.Y.A. Serum measurement of
443 interleukin-31 (IL-31) in paediatric atopic dermatitis: elevated levels correlate with
444 severity. *J. Eur. Acad. Dermatol*, 2011, 25: 334-339.
- 445 18. DILLON, S.R. et al. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells,
446 induces dermatitis in mice. *Nat. Immunol*, 2004, 5: 752-760.

- 447 19. MIZUNO, T. *et al.* Molecular cloning of canine interleukin-31 and its expression in
448 various tissues. *Vet Immunol Immunop*, 2009, 131: 140-43.
- 449 20. BILSBOROUGH, J. *et al.* IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte
450 antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *J. Allergy Clin.*
451 *Immunol.* 2006, 117: 418-425.
- 452 21. MARSELLA, R.; SAMUELSON, D.; HARRINGTON, L. Immunohistochemical
453 evaluation of filaggrin polyclonal antibody in atopic and normal beagles. *Vet.*
454 *Dermatol*, 2009, 20: 547-554.
- 455 22. PIEKUTOWSKA, A. *et al.* Effects of a Topically Applied Preparation of Epidermal
456 Lipids on the Stratum Corneum Barrier of Atopic Dogs. *J. Comp. Pathol*, 2008, 138:
457 197-203.

Capítulo 4

Manuscrito 4

Artigo de investigação segundo as normas da Veterinary Dermatology

Título: Análise da filagrina e sua relação com o grau de prurido e restauração da barreira cutânea em cães atópicos

Autores: Laura Carolina Barbosa, Amanda Dias Tadeu, Carlos Eduardo Fonseca Alves, Renée Laufer Amorim, Caroline Martins Biancardi, Fabíola Soares Zahn, Luiz Henrique de Araújo Machado

Título: Análise da proteína filagrina e sua relação com o grau de prurido e restauração da barreira cutânea em cães atópicos

Autores: Laura C. Barbosa*, Amanda D. Tadeu*, Carlos E. F. Alves*, Renée L. Amorim*, Caroline M. Biancardi*, Fabíola S. Zahn*, Luiz H. A. Machado*

*Universidade Estadual Paulista – UNESP, campus Botucatu

Nome do autor correspondente: Luiz Henrique de Araújo Machado

Endereço: Distrito de Rubião Junior, s/n, Departamento de Clínica Veterinária; Caixa Postal 56018618-970 - Botucatu, SP

Título Curto: Filagrina e restauração epidérmica

RESUMO

Introdução: Filagrina (FLG) é uma proteína responsável por unir os filamentos de queratina dando uma maior estabilidade a barreira cutânea, além disso é através da sua degradação que se forma o fator de hidratação da epiderme.

Hipótese/Objetivo: O objetivo foi padronizar a técnica da imunohistoquímica para filagrina e avaliar a correlação entre prurido, filagrina e restauração da barreira cutânea em cães com dermatite atópica, antes e depois da aplicação da solução repositora de lipídeos na epiderme.

Animais: Foram utilizados 2 grupos de animais, sendo 23 animais saudáveis e 15 animais com dermatite atópica, todos provenientes do serviço de dermatologia veterinária do hospital.

Métodos: Como tratamento para os animais com dermatite atópica utilizamos banhos semanais com clorexidine 2% e repositores de lipídeos, uma aplicação a cada 7 dias, durante 30 dias. O grau de prurido foi avaliado pelos proprietários por meio da escala do prurido Rybníček et al (2008) e um clínico avaliou o escore através do CADESI-04

Resultados: foi possível padronizar a técnica imunohistoquímica para filagrina. Não foi encontrada diferença significativa entre a expressão da proteína filagrina quando comparamos a região axilar e cervical dorsal de animais saudáveis, o mesmo ocorreu entre as regiões de cães atópicos antes do tratamento e após o tratamento, quando comparados de maneira isolada. Quando comparamos as regiões axilar e cervical dorsal dos cães atópicos antes e após o tratamento não houve aumento da expressão da proteína filagrina como o esperado. Houve diferença significativa entre as regiões cervical dorsal e axilar de cães atópicos quando comparados com os cães saudáveis, uma maior expressão de filagrina nos animais saudáveis foi observada.

Conclusão: Esses resultados abrem um leque de discussões sobre a real importância da proteína filagrina na dermatite atópica, apontando a necessidade de novos estudos para compreensão de tal doença e a possibilidade de outros fatores como o genético por exemplo, estar envolvido na diminuição dessa proteína.

INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA), é uma doença genética em que o paciente se torna sensível a antígenos ambientais e alimentares.¹ Clinicamente apresenta-se como uma doença de pele inflamatória e pruriginosa, com similaridades histológicas e imunológicas à dermatite atópica no homem. Supostamente afeta entre 3 a 15% da população canina, embora a real prevalência e incidência sejam desconhecidas^{2,3,4}.

A filagrina é um polipeptídeo agregado ao sistema de citoesqueleto de queratina, com a qual forma uma matriz lipoproteica, e sua degradação dá origem ao fator de hidratação natural da epiderme, sendo fundamental na queratinização adequada do estrato córneo e manutenção da hidratação da pele. Essa estrutura impede a perda de água e a entrada de alérgenos, irritantes primários e agentes microbianos, garantindo a função de barreira associada à epiderme. Vários estudos tem demonstrado que mutações genéticas levam a defeitos estruturais da filagrina,

distúrbios na formação da camada córnea e diminuição da barreira física na pele atópica em humanos e em cães ^{5,6,7, 8}.

Pressupomos que restaurando a barreira cutânea através dos repositores de lipídeos possamos diminuir a inflamação e com isso aumentar a síntese de filagrina no estrato córneo, além disso fatores hidratantes como a uréia são apontados por não só ajudar de maneira passiva, mas também ser uma estrutura reguladora da função da estrutura epidérmica, isso poderia acontecer também com os lipídeos.

O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de proteína filagrina em cães com dermatite atópica, antes e após o uso de repositores de lipídeos cutâneos e tentar correlacionar a reposição de lipídeos com o aumento da expressão da filagrina.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local

O presente trabalho foi submetido à Comissão de Ética no Uso de Animais (processo Fapesp nº 2012/12774-8), protocolado na Comissão de Ética sob os nºs 110/2012 e 111/2012. Todos os proprietários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido, autorizando a coleta de materiais e utilização dos dados obtidos em publicações futuras.

As amostras foram provenientes do arquivo do hospital veterinário, e exames dermatológicos e coletas das amostras foram realizados pelo Serviço de Dermatologia Veterinária do hospital veterinário e os exames de imunohistoquímica foram realizados pelo serviço de Patologia Veterinária do hospital veterinário.

Seleção e número de animais

O experimento teve dois grupos.

O grupo um foi composto por 46 amostras de pele (23 amostras axilares e 23 cervicais dorsais), provenientes de cães sem predileção por sexo ou raça, adultos, saudáveis, previamente atendidos no hospital veterinário, sem queixas dermatológicas ou doenças sistêmicas.

O grupo dois foi composto por 30 amostras de pele (15 amostras axilares e 15 cervicais dorsais) provenientes de cães atendidos pelo Serviço de Dermatologia Veterinária do hospital veterinário, com diagnóstico de dermatite atópica, os quais apresentavam no mínimo 5 dos oito critérios estabelecidos por Favrot et al. (2010) ⁹. Foram previamente descartadas outras dermatopatias pruriginosas como acariase sarcóptica, e outras dermatopatias de origem alérgica como dermatite alérgica à picada de ectoparasitas e hipersensibilidade alimentar.

As dermatopatias alérgicas foram excluídas utilizando além dos critérios de Favrot et al (2010), os critérios de exclusão, ou seja os cães foram submetidos a rigoroso controle de ectoparasitas a cada 21 dias, durante 2 meses e após essa etapa passaram pela dieta de eliminação, onde foi fornecido dieta hipoalergenica comercial ou dieta caseira com uma proteína que esse animal nunca tenha tido contato, por no mínimo 8 semanas, caso o animal não respondesse a essas terapias

117 era incluso no estudo, portanto todos os cães desse estudo tinham dermatite atópica
118 *strictu sensu*.

119 *Avaliação do prurido*

120 O prurido dos animais foi mensurado durante o atendimento clínico segundo o
121 escore de prurido de Rybníček et al. (2008) ¹⁰. Inicialmente o dono atribuía uma nota
122 de 0-10 ao prurido (prurido espontâneo) e em seguida, servindo-se com consulta à
123 escala de escore de prurido de Rybníček et al. (2008) (prurido esclarecido).

124 *Exames complementares*

125 Além de exame clínico completo, os cães passaram por exames
126 dermatológicos como escovado do pelame utilizando pente fino, tricograma,
127 impressão em fita de acetato, citologia, exame parasitológico por raspado cutâneo
128 superficial e profundo, fluorescência por lâmpada de Wood (Brasmed S.A.) e cultura
129 fúngica (quando necessário) para se descartar dermatopatias de origem infecto-
130 parasitárias.

131 *Acompanhamento clínico*

132 Os cães com dermatite atópica incluídos no estudo foram submetidos a exame
133 clínico dermatológico no momento inicial e após 30 dias, e seu escore lesional
134 estabelecido pela escala CADESI-4, validada por Olivry et al. (2014) ¹¹.

135 *Colheita e acondicionamento das Amostras*

136 Para colheita das amostras, os animais foram sedados com acepromazina na
137 dose de 0,05 mg/kg em associação com a morfina na dose de 0,5 mg/kg, seguido de
138 anestesia local ou anestesia dissociativa com 0,5 mg/kg de diazepam e 2 mg/kg de
139 cetamina IV ou propofol 5 mg/kg.

140 Os fragmentos cutâneos foram obtidos por *punch* de 6 mm, das regiões axilar e
141 cervical dorsal.

142 No grupo um foi feita apenas uma coleta da amostra, enquanto que no grupo
143 dois foram feitas duas coletas com intervalo de um mês entre estas.

144 As amostras colhidas foram devidamente identificadas, acondicionadas em
145 criotubos embebidas em crioprotetor O.C.T (Tissue Tek®), congeladas a -80°C e
146 submetidas à secção por congelação em criostato modelo Leica CM1850, obtendo
147 cortes de 25 µm em lâminas silanizadas.

148 *Reposição de ceramidas*

149 Os animais do grupo dois foram tratados com o repositores comercial de lipídeos
150 (ceramidas e colesterol 5%, ácidos graxos 11,4%; água qsp 100%; Allerderm® spot
151 on; Virbac, São Paulo, SP, Brasil) conforme recomendações do fabricante, sendo
152 uma aplicação no dia do atendimento e uma a cada sete dias, durante 30 dias,
153 quando se realizava uma nova coleta.

154

155

Processamento Histológico

Os fragmentos de pele foram submetidos ao procedimento histopatológico pela técnica de corte de congelação. As secções histológicas tinham espessura de 8 µm e foram dispostas em lâminas carregadas positivamente (Starfrost – KnitteGlass, Braunschweig, Alemanha) para promover aderência do corte à lâmina. Foram realizados 106 cortes e uma lâmina de cada amostra (totalizando 46 lâminas dos cães saudáveis e 60 lâminas de cães com DA, sendo 15 lâminas da região axilar antes da aplicação, 15 lâminas da região cervical dorsal antes da aplicação, 15 lâminas da região axilar antes a aplicação e 15 lâminas da região cervical dorsal após a aplicação). Todas as lâminas foram coradas pelo método de Hematoxilina & Eosina (LUNA, 1968), segundo protocolo do laboratório de patologia e examinadas de forma independente em microscópio óptico por dois patologistas veterinários.

Imunohistoquímica

Para a realização da técnica de imunohistoquímica foi utilizado o sistema de polímero (Histofine® - Nichirei Biosciences, Tokyo, Japão); o anticorpo primário anti-filagrina (Rabbit polyclonal to filagrin Bioss-Cód. Bs-6327R); Os sistemas de bloqueios de peroxidase endógena e de proteínas inespecíficas, além de cromógeno Autostainer–Daki Cytomation, California, EUA). A padronização da técnica de imunohistoquímica foi realizada inicialmente pelo sistema automático de imunohistoquímica (DAB–Dako Cytomation, California, EUA) e pelo protocolo padrão realizado manualmente.

As lâminas foram retiradas do congelador e repousadas a temperatura ambiente (27°C) por 15 minutos. As amostras foram circundadas com caneta hidrofóbica e foi instilada uma gota de peroxidase em cada uma para realização do bloqueio. O material com peroxidase permaneceu por 20 minutos em temperatura ambiente e após foram realizadas 3 lavagens com água deionizada e secagem. Para o bloqueio de proteína foram instiladas 2 gotas em cada amostra que permaneceram em contato com o material por 20 minutos. Após a retirada do bloqueio, sem realização de lavagem, foi instilado o anticorpo primário anti-filagrina, diluído na proporção 1:25. O material com o anticorpo primário permaneceu 18 horas refrigerado e então lavado com água deionizada. Após a lavagem foi instilado o anticorpo secundário Envision (Envision - Dako Cytomation, California, EUA) em cada amostra e condicionado em estufa (27°C) por 1 hora. O material foi retirado da estufa e lavado com água deionizada e então instilado o DAB. Foi realizada lavagem com água deionizada e então adicionada hematoxilina à amostra, permanecendo em contato por 2 minutos, e posterior lavagem com água corrente por 5 minutos. As montagens das lâminas foram realizadas em 8 etapas: fixação em álcool 85°, álcool 95°, álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III, xilol I, xilol II e xilol III, todas por 3 minutos cada. Logo após foi retirado o excesso de material e em seguida colado lamínulas.

Interpretação dos resultados

A quantificação da coloração de imunohistoquímica foi realizada pelo método semi-quantitativo de escore de distribuição de células marcadas. Em todo o material foram contadas todas as células do corte e realizada uma proporção entre a quantidade de células positivas e células totais. O sistema de escore seguiu o descrito por Fonseca-Alves et al. (2013) ¹² de acordo com o seguinte: 0: ausência de

marcação nas células; 1: 1 a 25% de células positivas; 2: 26 a 50% de células positivas; 3: 51 a 75% de células positivas; 4: acima de 76% de células positivas.

Estatística

O test t de Wilcoxon foi utilizado para comparar amostras pareadas, e o test t Mann Whitney para amostras não-pareadas, ambos aplicados nos cães saudáveis e com DA, antes e após a aplicação do repositório de lipídeos. A correlação de Spearman foi utilizada para correlacionar a significância da melhora clínica dos animais e a expressão da filagrina.

RESULTADOS

Os resultados referentes a quantidade de células marcadas em relação às lâminas coradas da região axilar e cervical dorsal de cães saudáveis estão descritas no quadro 1.

Quadro 1. Escore IHQ da expressão da filagrina da região axilar e cervical dorsal de cães saudáveis.

Animal	Escore IHQ da região axilar	Escore IHQ da região cervical dorsal
1	0	0
2	1	0
3	1	0
4	1	1
5	0	1
6	0	0
7	1	0
8	0	0
9	0	1
10	0	0
11	0	1
12	0	0
13	1	1
14	1	1
15	0	0
16	0	1
17	0	0
18	1	1
19	0	0
20	1	0
21	1	1
22	1	0
23	1	1

Os resultados referentes a quantidade de células marcadas da região axilar e cervical dorsal dos cães com dermatite atópica, antes e após o tratamento estão expostos no quadro 2.

Cães	Score IHQ da região axilar antes do tratamento	Score IHQ da região cervical dorsal antes do tratamento	Score IHQ da região axilar após o tratamento	Score IHQ da região cervical dorsal após o tratamento
1	1	1	0	1
2	0	0	1	1
3	1	1	1	2
4	2	1	2	1
5	0	0	1	1
6	1	1	0	0
7	2	2	1	1
8	1	0	1	1
9	1	1	2	0
10	0	1	1	2
11	0	0	1	1
12	1	2	0	1
13	1	1	1	0
14	2	0	0	1
15	1	1	1	1

Quadro 2. Escore IHQ da expressão de filagrina na região axilar e cervical dorsal de cães atópicos antes e após o tratamento com repositor de lipídeos.

Os valores referentes a estatísticas estão representados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1. Representação estatística dos valores de filagrina (mediana e desvio padrão) de cães saudáveis e com dermatite atópica (DA) antes e após o tratamento (utilizando o Test t Wilcoxon).

	Região axilar cães saudáveis ^A	Região axilar cães DA antes tratamento ^A	Região axilar cães DA após tratamento		Região cervical cães saudáveis ^B	Região cervical cães antes tratamento ^B	Região cervical cães DA após tratamento
Mediana	0,4783	0,933	0,8000		0,4348	0,8667	0,9333
Desvio Padrão	0,5108	0,7037	0,9333		0,5069	0,6399	0,5936

Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t de Wilcoxon*). $p < 0,05$.

Tabela 2. Representação estatística dos valores de filagrina (mediana e desvio padrão) entre cães saudáveis e cães com dermatite atópica (DA) antes e após o tratamento (Test t Mann Whitney).

	Região axilar cães saudáveis ^A	Região axilar cães DA antes tratamento ^A	Região cervical cães saudáveis ^B	Região cervical cães DA antes tratamento ^B
Mediana	0,4783	0,9333	0,4348	0,8667
Desvio Padrão	0,5108	0,7037	0,5069	0,6399

Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t de Wilcoxon*). $p < 0,05$.

Os resultados mais relevantes estão representados através do Box Spot (Figuras 1).

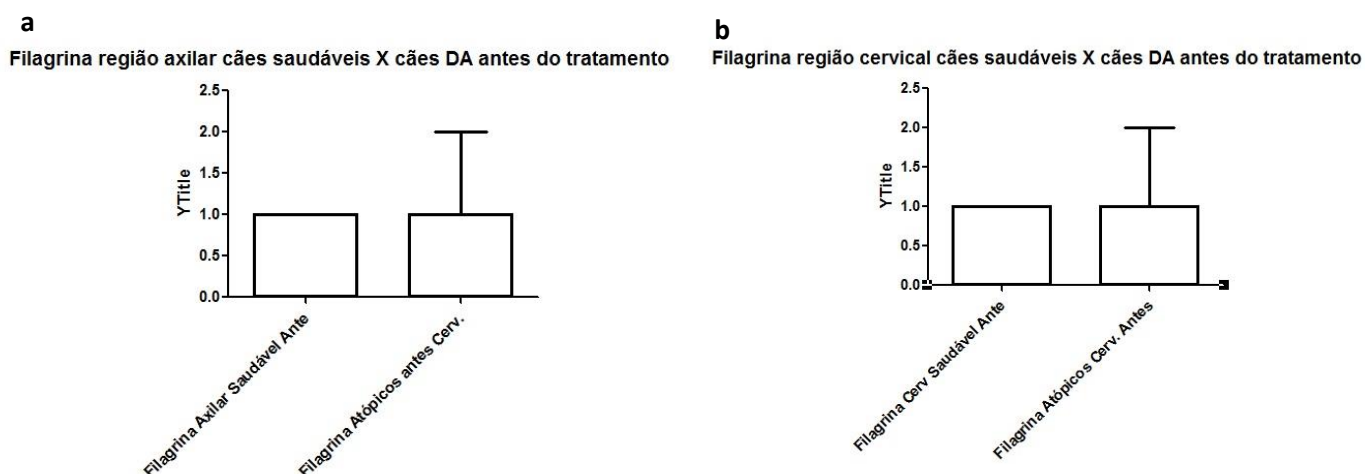


Figura 1. a e b representação através do Box Spot da diferença entre a expressão da filagrina nas regiões de cães saudáveis e cães com DA antes do tratamento com repositores de lipídeos (a-região axilar e b- região cervical)

Ao comparamos visualmente as lâminas dos animais saudáveis (Figura 3), animais atópicos antes e depois do tratamento (Figura 4), podemos notar uma maior expressão da filagrina nos animais saudáveis e ao comparar os atópicos vimos que antes do tratamento quase não temos marcação e após o tratamento a marcação aumenta (coloração acastanhada).

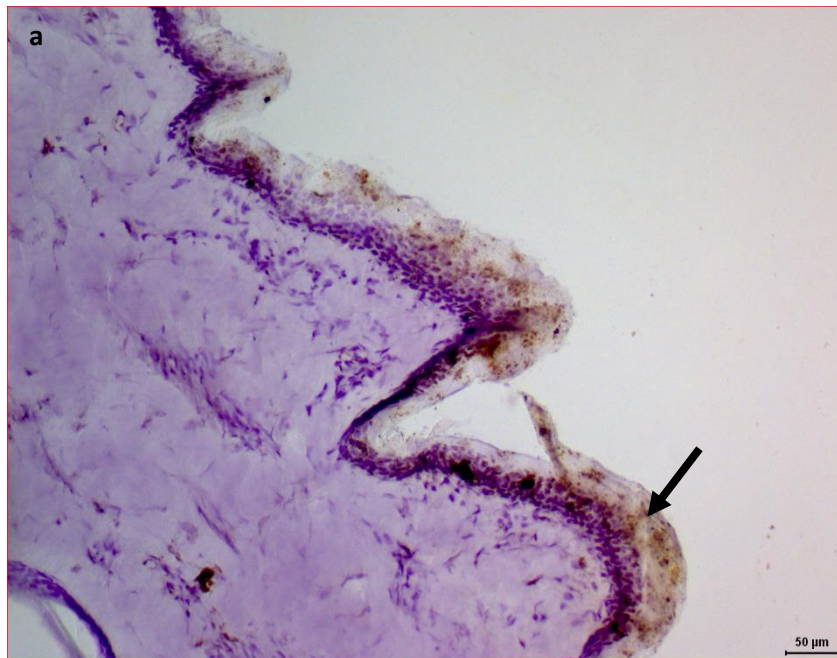


Figura 3. Amostra de pele axilar de um animal saudável (a). Notar a marcação da filagrina (seta)

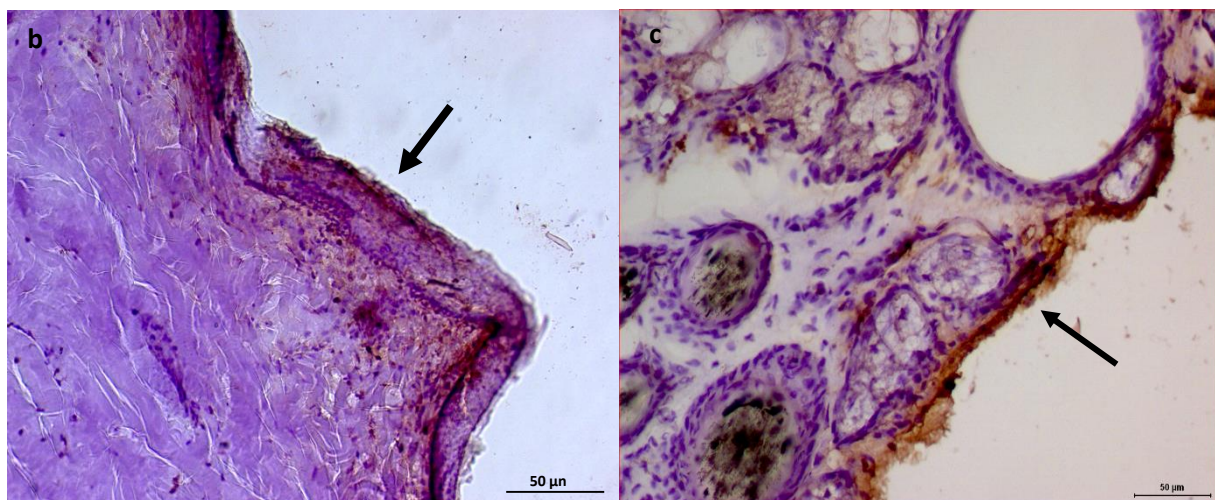


Figura 4. Amostra de pele axilar de uma animal atópico antes do tratamento (b) e após o tratamento. Notar a marcação da filagrina (setas)

Ao analisar a resposta ao tratamento clínico vimos que houve uma diminuição significativa dos valores do CADESI-04 (valores do CADESI menores que 23, o que nos indica uma dermatite atópica leve ou em remissão).

Quando comparamos o CADESI-04 com a expressão da filagrina utilizando o cálculo da correlação e significância de Spearman, não vemos qualquer tipo de relação ou seja, um aumento ou redução nos valores do CADESI-04 não implicam

em um aumento da filagrina, por outro lado, quando comparamos todos os parâmetros há uma correlação significativa (em um nível de confiança de 95%) entre CADESI dos cães com dermatite atópica após o tratamento, e a expressão da filagrina da região cervical dorsal dos mesmos (0.42+/-0.12) (QUADRO 5).

Quadro 5. Escala CADESI-04, escores do prurido (espontâneo e esclarecido) e filagrina cervical antes (AT) e após (PT) o tratamento.

	Prurido espontâneo		Prurido esclarecido		CADESI-04		Filagrina	
	ATA	PTA	ATB	PTB	ATC	PTC,D	Cervical AT	Cervical PT ^D
Mediana	9,0	4	8	3	80	15	0,8667	0,9333
Desvio padrão	0,8	1,5	0,5	0,6	7	5	0,6399	0,5936

Letras iguais representam diferença entre os momentos (teste *t Spearman*). $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

A filagrina é responsável por unir, compacta e homogenizar os filamentos de queratina, dando estabilidade estrutural aos queratinócito. O complexo queratina-filagrina se deposita na face interna da membrana plasmática dos queratinócitos, formando o envoltório celular cornificado, contribuindo estruturalmente para formação da barreira cutânea¹³.

No presente estudo, houve evidenciação de uma menor expressão de filagrina em cães com da, em relação aos cães normais.

Estudos em humanos relatam uma diminuição da expressão da filagrina na pele de pacientes com dermatite atópica, tanto na pele lesional, quanto na pele não afetada, o que leva a uma diminuição da barreira física epidérmica e a xerose^{14, 15}. Em adição, essas mutações podem estar relacionadas não somente a quantidade de proteína, mas também a sua qualidade o que afeta diretamente a formação da barreira cutânea⁷.

Trabalhos em labradores com da também mostraram diminuição na produção de filagrina. Porém isso não foi observado em west highland white terrier. Isto denota que a mutação do gene filagrin e formação de uma filagrina defeituosa está mais relacionada aos indivíduos, não especificamente a raça^{16, 17}.

Estudos em humanos correlacionaram o uso de uréia tópica em pacientes com dermatite atópica, com um aumento da expressão de RNAm da filagrina, e melhora clínica lipídeos¹⁸.

No presente estudo, a reposição de lipídica foi capaz de melhorar os índices lesionais e a inflamação dos cães com DA, porém essa não influenciou a expressão da proteína filagrina na epiderme, isso pode ser explicado pois provavelmente à diminuição da filagrina nos cães avaliados tenha origem genética primária, e o controle dos sinais clínicos e inflamação não foram capazes de restaurar sua expressão na camada córnea. A hidratação pode repor barreira, mas não aumenta a formação de filagrina quando sua deficiência é primária.

Em humanos, a mutação do gene filagrina tem valor prognóstico, inclusive para o desenvolvimento de marcha atópica ⁷.

Um hipótese que devemos levar em consideração é que esse estudo foi realizado em um hospital escola, nesses locais os casos atendidos sempre são mais complicados e já passaram por diversos tratamentos, muitas vezes estamos nos dando com casos mais recalcitrantes, o que pode ter interferido nos resultados do nosso estudo.

Além da filagrina, outras proteínas estão envolvidas na patogênese da DA, como loricrina, involucrina, pequena proteína rica em prolina, portanto não só a filagrina desempenha o papel de estruturação e hidratação da barreira cutânea, muitas outras proteínas devem ser estudadas ^(19, 13).

Por se tratar de uma doença multifatorial, o controle na DA envolve terapia tópica e sistêmica, a combinação de vários protocolos terapêuticos é fundamental para o sucesso do tratamento. A análise individualizada do histórico clínico e fatores desencadeantes para crise em cada paciente é primordial para que se possa estabelecer uma terapia adequada.

CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir que cães com dermatite atópica podem ter uma menor expressão de proteína filagrina no seu estrato córneo, e o uso dos repositores de lipídeos, apesar de minimizar os sinais clínicos da doença, não foi capaz de normalizar essa expressão.

REFERÊNCIAS

1. MILLER, W.H. et al. Hypersensitivity Disorders. In _____. *Small Animal Dermatology*, 7ed. St. Louis: Elsevier Mosby. 2013; 365-388.
2. NODTVEDT, A. et al. A case-control study of risk factors for canine atopic dermatitis among boxer, bullterrier and west highland white terrier dogs in Sweden. *Vet Dermatol*, 2007; 18: 309-315.
3. JAEGER, K. et al. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Vet. Dermatol*, 2010, 21: 119-123.
4. OLIVRY, 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: 233-248.
5. PALMER, C.N.A. et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature*, 2006, 38: 441-446.
6. JUNGERSTE, J.M. et al. Stratum corneum lipids, skin barrier function and filaggrin mutations in patients with atopic eczema. *Allergy*, 2010, 65: 911-918.
7. MARSELLA, R. Does filaggrin expression correlate with severity of clinical signs in dogs with atopic dermatitis? *Vet. Dermatol*, 2013, 24: 266-e59.

- 339 8. MARSELLA, R.; OLIVRY, T.; CARLOTTI, D.N. Current evidence of skin barrier
340 dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol*, 2011, 22: 239-
341 248.
- 342 9. FAVROT, F.; STEFFAN, W.S.; PICCO, F.; A prospective study on the clinical
343 features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet. Dermatol*. 2010,
344 21: 23-31.
- 345 10. RYBNÍČEK, J. *et al.* Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs.
346 *Vet. Dermatol*, 2008, 20: 115-122.
- 347 11. OLIVRY *et al.* Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for
348 assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Vet. Dermatol*, 2014, 25: 77-e25.
- 349 12. FONSECA-ALVES, C. E. Expressão do C-MYC, NKX3.1 e E-CADERINA por
350 imunohistoquímica em microarranjo de tecido (TMA) de lesões pré-neoplásicas e
351 neoplásicas na próstata de cães. 2013. 50f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de
352 Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita
353 Filho”, Botucatu.
- 354 13. KIERSZENBAUM A.L. Sistema Tegumentar. In_____ *Histologia e Biologia*
355 *Celular*. São Paulo: Elsevier., 2008; 329-352.
- 356 14. IRVINE, A.D.; McLEAN, W.H.I. Breaking the (Un)Sound Barrier: Filaggrin Is a
357 Major Gene for Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol*, 2006, 126: 1200-1202.
- 358 15. PROKSCH, E. *et al.* Role of the epidermal barrier in atopic dermatitis. *J.D.D.G.*,
359 2009, 7: 899-910.
- 360 16. WOOD, S.H. *et al.* Despite identifying some shared gene associations with
361 human atopic dermatitis the use of multiple dog breeds from various locations limits
362 detection of gene associations in canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunop*,
363 2010, 138: 193-197.
- 364 17. ROQUE, J.B. *et al.* Haplotype sharing excludes canine orthologous Filaggrin
365 locus in atopy in West Highland White Terriers. *Anim Genet*. 2009, 40: 793-794.
- 366 18. GREThER-BECK, S. *et al.* Urea Uptake Enhances Barrier Function and
367 Antimicrobial Defense in Humans by Regulating Epidermal Gene Expression. *J*
368 *Invest Dermatol*, 2012, 132: 1561–1572.
- 369 19. O`ReGAN, G.M. *et al.* Filaggrin in atopic dermatitis. *J Allergy Clin. Immunol*.
370 2009, 03: r2-r6.

Conclusões Gerais

Foi possível padronizar a técnica de imunohistoquímica tanto para IL-31 e filagrina e a partir dela quantificar a expressão de ambas.

Concluimos através do CADESI-04 que a reposição tópica de lipídeos juntamente com os banhos semanais com clorexidine 2%, é um possível tratamento para cães atópicos e que a reposição lipídica tem a capacidade de restaurar a barreira cutânea desses animais.

Através dos resultados da IL-31 comprovamos o seu envolvimento na dermatite atópica e conseguimos relacionar o prurido e a restauração da barreira cutânea com a diminuição da expressão da IL-31.

Os resultados do experimento feito com a filagrina nos mostrou que realmente há uma menor expressão em animais atópicos, porém a reposição lipídica não é capaz de aumentar a expressão da filagrina, provavelmente outras proteínas estejam envolvidas na fisiologia da DA e até mesmos um fator genético relacionado a qualidade da proteína deverá ser estudado.

Capítulo 5

Normas das revistas

Ciencia Rural

As normas de formatação podem ser consultadas no site:

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

Veterinary Dermatology

As normas de formatação podem ser consultadas no site:

[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)