LARISSA SILVEIRA BOTONI DE ANDRADE

Aspectos clínicos e epidemiológicos e avaliação da disbiose cutânea em cães com dermatite atópica

Tese apresentada como pré-requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Aluna: Larissa Silveira Botoni de Andrade
Orientador: Prof. Marcos Bryan Heinemann
Orientadora University of Minnesota: Prof. Sheila Torres
Co-orientadores: Prof. Adriane Pimenta da Costa Val
Prof. Felipe Pierezan

Belo Horizonte
Escola de Veterinária
2018

Andrade, Larissa Silveira Botoni de, 1986-
A553a Aspectos clínicos e epidemiológicos e avaliação da disbiose cutânea em cães com dermatite atópica / Larissa Silveira Botoni de Andrade. – 2018.
132 p. : il.

Orientadores: Marcos Bryan Heinemann, Sheila Torres
Co-orientadores: Adriane Pimenta da Costa Val, Felipe Pierezan
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Tratamento – Teses. 2. Pele – Doenças – Tratamento – Teses. 3. Dermatologia veterinária – Teses. I. Heinemann, Marcos Bryan. II. Torres, Sheila. III. Costa Val, Adriane Pimenta da. IV. Pierezan, Felipe. V. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. VI. Título.

CDD – 636.708 965

UFMG UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

542-D

FOLHA DE APROVAÇÃO

LARISSA SILVEIRA BOTONI DE ANDRADE

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em Medicina e Cirurgia Veterinárias.

Aprovada em 31 de Janeiro de 2018, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Marcos Bryan Heinemann
Presidente – Orientador

Prof. Marconi Rodrigues de Farias
Pontifícia Universidade Católica do Paraná - PUC-PR

Prof. Rodrigo dos Santos Horta
Universidade Vila Velha - UVV

Prof. Andrey Pereira Lage
Escola de Veterinária - UFMG

Profª. Fabíola de Oliveira Paes Leme
Escola de Veterinária - UFMG

Profª. Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho
Escola de Veterinária - UFMG

Universidade Federal de Minas Gerais
Escola de Veterinária
Av. Antônio Carlos, 6627 -
Caixa Postal 567 – CEP 30123-970
Belo Horizonte – Minas Gerais
Telefone: (31) 3409-2057/2059(fax)
www.vet.ufmg.br
E-mail cap@vet.ufmg.br

Escola de Veterinária UFMG

AGRADECIMENTOS

É com muita alegria e realização que chego até aqui, concretizando este grande sonho de terminar o Doutorado! Começar a escrever esses agradecimentos faz passar um filme na minha cabeça.

Ao meu orientador, Prof. Marcos Bryan, por ter me guiado e apoiado desde o experimento do Mestrado e por ter aceitado me orientar no Doutorado, mesmo tendo que fazer o grande esforço de orientar à distância.

À Professora Sheila Torres, não tenho palavras para agradecer tanta dedicação em me ensinar tanto, por ter me acolhido tão bem na University of Minnesota. A experiência de passar um ano com você mudou a minha vida e me fez crescer muito como pessoa e profissional. Obrigada por toda a paciência, pelos puxões de orelha muito merecidos e por ter me adotado e exercido a função de orientadora, mesmo sem ser a sua obrigação formal. Eu sei o tanto que esse trabalho foi difícil e você esteve ao meu lado em todos os momentos, sempre disponível mesmo sempre ocupada. Minha gratidão e admiração serão eternos por tudo o que fez por mim e pelas grandes oportunidades que me proporcionou.

À Prof Adriane por ter me introduzido à Dermatologia Veterinária e me orientado nesses quase 10 anos desde que comecei a seguir seus passos. Obrigada pela oportunidade de te seguir e trabalhar na sua equipe. Nosso vínculo institucional termina aqui, mas a amizade e a gratidão serão para toda a vida. Sempre conte comigo para o que precisar.

Ao meu marido, Mateus, por ter me suportado durante esses quatro anos difíceis e por não ter me deixado desistir nas milhares de vezes que eu disse que não conseguiria chegar ao fim. Obrigada pela disposição de largar tudo e enfrentar um ano em Minnesota junto comigo, sem dinheiro, morando em estados diferentes e só nos encontrando a cada 15 dias, com seis meses de casados. E lá vamos nós para muitas outras aventuras. Obrigada por ser meu amor, meu companheiro, melhor amigo e por me ajudar a enfrentar o dia a dia com tanto bom humor. Você é uma pessoa incrível.

À minha mãe, Laís Silveira, por todo o apoio e dedicação ao longo de toda a vida, não apenas nessa fase. Obrigada pelo exemplo de garra, força e luta que você sempre em deu e por ter estado ao meu lado incondicionalmente. Sem o seu apoio, eu jamais poderia ter enfrentado 13 anos de graduação e pós-graduação. Obrigada por ter suportado o Barth na sua casa enquanto eu estive fora, mesmo com todas as dificuldades que ele te proporcionou. De verdade, obrigada por existir!

Agradeço ao meu pai, Fernando Botoni, por ter sido a minha grande inspiração acadêmica. Muito antes de eu entrar na faculdade, eu já sabia que queria fazer Mestrado e Doutorado, pois o orgulho e a admiração eram tão grandes que eu só queria seguir seus passos. Se algum dia eu puder ser a metade do pesquisador e professor que você é, já estarei realizada. Mais do que nunca, meu pai, tenho que te agradecer por estar aqui presente hoje e agradecer a Deus pela sua vida! O sonho de me tornar Doutora jamais seria completo se você não pudesse participar dele. Com certeza, sem você, eu não teria chegado até aqui. Milhões de vezes obrigada Deus, Nossa Senhora e São Francisco de Assis por ouvir as minhas preces!

À minha vovó Lourdes que infelizmente não está mais entre nós... “Pense sempre no positivo, minha filha”.... Essa frase ecoa diariamente na minha cabeça... que saudades...

Aos meus avós Guiomar e Zé Murilo, que são como pais para mim e nunca me deixaram só... Que Deus os conserve por muitos e muitos anos com muita saúde!

Ao meu irmão, Fernando Henrique, por estar presente mesmo do seu jeito discreto, na sua fase de vida também difícil.

À minha Dinda Cida por nunca deixar de me dar bom dia e estar sempre presente na minha vida.

Ao meu "filho" canino Bartholomeo, fiel companheiro. Obrigada pela companhia silenciosa diariamente durante a escrita da tese. Você é um dos grandes amores da minha vida. Ao meu "filho" canino Napoleão, obrigada pela recepção calorosa e rebolosa sempre na casa da mamãe. Vida longa aos dois, por favor!!

À Fernanda Santos, amiga e companheira de sofrência, obrigada pelo apoio diário, principalmente nessa fase final que eu queria jogar tudo pro alto... finalmente chegamos ao fim, e juntas! Tenho certeza que nossos caminhos vão continuar se cruzando e ainda vamos juntas à Aparecida do Norte agradecer!!

À Maria Lopes, obrigada pela amizade. Ainda bem que cheguei a tempo de te conhecer. Difícil haver no mundo uma outra pessoa que entenda tão bem as minhas ideias e divagações. Obrigada por ter se tornado uma grande amiga e ter me apoiado tanto esse tempo todo. Amo as nossas longas conversas!

À Nina Scherer, parceira de Mestrado e Doutorado também! Obrigada por não ter me deixado desistir do Doutorado e pelos preciosos conselhos sempre que preciso!

Ao Gui De Caro, minha dupla de caminhada desde a residência. Sucesso! Nos encontramos nesse mundo dermatológico!!

À Sandra Koch, Stephanie, Lisa Gerards, Lisa Reiter, Clarissa e Kim e todos do Derm Service da UMN.

Aos amigos de Minnesota, em especial: Ruth, Monica, Julien, Alvise e Lucas por terem sido os melhores amigos que eu poderia sonhar.

Por fim, agradeço a Deus por todas as oportunidades, por ter vencido as dificuldades e por ter me proporcionado um Doutorado muito melhor que as minhas expectativas!

"The heart of life is good"

(The heart of life, John Mayer)

SUMÁRIO

RESUMO	13
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO GERAL	15
OBJETIVOS	17
CAPÍTULO I - Dermatite atópica canina: patogênese, manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento - revisão de literatura.	18
CAPÍTULO II - Aspectos epidemiológicos da dermatite atópica em cães atendidos no hospital veterinário universitário na University of Minnesota, em Saint Paul, Minnesota/USA, entre 2007 e 2015	49
CAPÍTULO III - Comparação das características clínicas e epidemiológicas de dermatite atópica e dermatite atópica-like em cães atendidos em um hospital veterinário universitário em Saint Paul, Minnesota/USA, entre 2007 e 2015	73
CAPÍTULO IV - Microbioma cutâneo bacteriano – revisão de literatura	90
CAPÍTULO V- Microbioma cutâneo bacteriano de cães atópicos: antes, durante e depois da crise da doença	103
CONSIDERAÇÕES FINAIS	132

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II	**Tabela 1.** Análise de frequências das variáveis epidemiológicas dos animais com dermatite atópica selecionados para o estudo, atendidos no hospital universitário da University of Minnesota, Minnesota/EUA, entre 2007 e 2015.	55
	Tabela 2. Comparação da frequência das raças entre a população geral atendida entre 2007-2015 no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, em Saint Paul, MN, EUA.	56
	Tabela 3. Comparação do indicador de gravidade da dermatite atópica com as variáveis epidemiológicas qualitativas e quantitativas.	63
CAPÍTULO III	**Tabela 1.** Comparação das variáveis epidemiológicas entre os grupos AD e ALD de animais com dermatite atópica, atendidos no hospital universitário da University of Minnesota, Minnesota/EUA, entre 2007 e 2015.	79

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I	**Quadro 1:** Principais citocinas que atuam no sistema imune tegumentar, suas células de origem, alvo e efeito biológico. (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; MCCANDLESS et al., 2014).	27
	Quadro 2: Critérios de Favrot. Os autores recomendam que seja usado o set 1, com cinco critérios positivos, para teste de triagem	32

	no contexto prático da clínica e dermatologia veterinária (FAVROT et al., 2010.	
	Quadro 3: Principais drogas usadas no tratamento da DAC, sua interferência com os testes alérgicos e o tempo necessário de interrupção prévia ao procedimento (HENSEL et al., 2015).	33
CAPÍTULO V	**Quadro 1.** Dados epidemiológicos dos cães incluídos no Grupo Atópico (GA). F: fêmea, M: macho, SID: a cada 24 horas, BID: a cada 12 horas, SRD: sem raça definida.	109
	Quadro 2. Dados epidemiológicos dos cães incluídos no Grupo Controle (GC). F: fêmea, M: macho, SRD: sem raça definida.	109

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO. II	**Figura 1.** Frequência de raças caninas presentes no grupo de cães incluídos no estudo "Aspectos epidemiológicos da dermatite atópica em cães atendidos no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, em Saint Paul, Minnesota/USA, entre 2007 e 2015", *n* = 269.	56
	Figura 2. A: Grau médio de prurido na primeira visita. B: Número médio de áreas afetadas na primeira visita. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers; n =175.*	58
	Figura 3. Distribuição quanto ao grau de prurido na primeira visita de 175 cães atendidos no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, EUA entre 2007 e 2015. Leve: 2,0-3,5; Moderado: 3,8-5,5; Grave: 5,8-10,0.	59
	Figura 4. Frequência de áreas afetadas na primeira visita de 175 cães atendidos no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, EUA entre 2007 e 2015.	60
	Figura 5. Distribuição quanto ao escore de tratamento de manutenção utilizado em 175 cães atendidos no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, EUA entre 2007 e 2015. 1: imunoterapia alérgeno-específica (ASIT) e/ou anti-histamínicos e/ou ácidos graxos essenciais; 2: uma droga imunomoduladora (glicocorticoides por via oral, ciclosporina, oclacitinib, lokivetmab); 3: duas ou mais drogas imunomoduladoras associadas.	61
	Figura 6. Frequência das drogas imunomoduladoras utilizadas nos 175 cães com dermatite atópica atendidos no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, EUA entre 2007 e 2015. EDA: em dias alternados, a cada 48 horas. SID: a cada 24 horas. *ASIT: frequência calculada apenas nos 159	61

	cães classificados como AD, ou seja, os que possuíam reações positivas nos testes alérgicos.	
	Figura 7. Modelo marginal linear para grau de prurido e número de áreas afetadas. Observa-se nestas curvas uma tendência decrescente ao longo das oito primeiras visitas; *n=175*.	62

LISTA DE FIGURAS		
CAPÍTULO. III	**Figura 1.** Número de cães incluídos nas análises = 175. (a) Box plot mostrando o grau médio de prurido dos cães dos grupos AD e ALD na primeira visita. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers*. (b) Frequência de cães dos grupos AD e ALD classificados em cada categoria de prurido na primeira visita. Leve: 2,0-3,5; Moderado: 3,6-5,5; Grave: 5,8-10,0.	80
	Figura 2. Box plot mostrando o número de áreas corpóreas afetadas em cães com dos grupos AD e ALD na primeira visita. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers.* Número de cães incluídos na análise = 175.	81
	Figura 3. Frequência de cães dos grupos AD e ALD em cada escore de tratamento de manutenção. 1: imunoterapia alérgeno-específica (ASIT) e/ou anti-histamínicos e/ou ácidos graxos essenciais; 2: uma droga imunomoduladora (glicocorticoides por via oral, ciclosporina, oclacitinib, lokivetmab); 3: duas ou mais drogas imunomoduladoras associadas. Número de cães utilizados na amostra = 175.	81
	Figura 4. Número de cães incluídos nas análises = 175. (a) Box plot mostrando o grau médio de prurido dos cães dos grupos AD e ALD ao longo das visitas. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers*. (b) Frequência de cães dos grupos AD e ALD classificados em cada categoria de prurido ao longo das visitas. Leve: 2,0-3,5; Moderado: 3,8-5,5; Grave: 5,8-10,0.	82
	Figura 5. Box plot mostrando o número médio de áreas corpóreas afetadas em cães com dos grupos AD e ALD ao longo das visitas. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers.* Número de cães incluídos na análise = 175.	83

LISTA DE FIGURAS		
CAPÍTULO. V	**Figura 1.** Suabe bucal com faces sulcadas (Isohellix®,Cell Products Ltd, Kent, UK). Fonte: arquivo pessoal.	108
	Figura 2. Coleta de amostra de pele do abdômen de um cão do Grupo Controle. Fonte: arquivo pessoal.	109
	Figura 3. *PowerBead Tubes*® (PowerSoil® DNA Isolation kit, QIAGEN, Germantown, USA). A: tubo vazio como fornecido no kit pelo fabricante. B: dois suabes armazenados em um tubo.	109
	Figura 1. Análise filogenética em nível de Filo de todas as amostras separadas por Grupo Atópico e Grupo Controle	113
	Figura 2. Análise filogenética em nível de Classe de todas as amostras separadas por Grupo Atópico e Grupo Controle.	113
	Figura 3. Análise filogenética em nível de Ordem de todas as amostras separadas por Grupo Atópico e Grupo Controle.	114
	Figura 4. Análise filogenética em nível de Gênero de todas as amostras separadas por Grupo Atópico e Grupo Controle.	114
	Figura 5. Análise de alphadiversidade por curvas de rarefação de todas as amostras por Grupo Atópico e Grupo Controle e controles negativos. As linhas representaram a média de cada grupo e as barras representam o desvio-padrão.	115
	Figura 6. Boxplot representando a diversidade média das amostras dos grupos Controle e Atópico e das amostras dos controles negativos na rarefação de 1000 sequências por amostra. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers*.	116
	Figura 7. Análise da alpha-diversidade das amostras das áreas corpóreas estudadas de todos os grupos. As linhas representaram a média de cada grupo e as barras representam o desvio-padrão.	117
	Figura 8. Boxplot representando a diversidade média das amostras das regiões corpóreas e das amostras dos controles negativos, na rarefação de 1000 sequências por amostra. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers*.	118
	Figura 9. Análise da alpha-diversidade das amostras do Grupo Atópico em cada ponto de coleta e de todas as amostras do GC agrupadas. As linhas representaram a média de cada grupo e as barras representam o desvio-padrão.	119
	Figura 10. Boxplot representando a diversidade média das amostras do Grupo Atópico em cada ponto de coleta e de todas as amostras do Grupo Controle agrupadas. A caixa representa o	120

	intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers*.	
	Figura 11. *Principle coordinate analysis* (PCoA) de unweighted UNIFRAC analysis das amostras do Grupo Controle, Grupo Atópico e dos controles negativos.	121
	Figura 12. Mapa perceptual da Análise Hierárquica de Agrupamento dos grupos Atópico e Controle e das amostras de controle negativo.	122
	Figura 13. *Principle coordinate analysis* (PCoA) de unweighted UNIFRAC analysis das amostras dos grupos Alérgico e Controle separadas por áreas corpóreas e amostras de controles negativos.	123
	Figura 14. Mapa perceptual da Análise Hierárquica de Agrupamento das áreas corpóreas dos grupos experimentais e das amostras de controle negativo.	124
	Figura 15. *Principle coordinate analysis* (PCoA) de unweighted UNIFRAC analysis das amostras de cada ponto de coleta do GA, todas as amostras do GC e dos controles negativos (NegControl: suabes estéreis umedecidos com água ultrapura).	124
	Figura 16. Mapa perceptual da Análise Hierárquica de Agrupamento do Grupo Atópico por tempos de coleta e do Grupo Controle e dos controles negativos.	126

LISTA DE ABREVIATURAS

DA: dermatite atópica
ALD: dermatite atópica-like
IAD: dermatite atópica intrínseca
EAD: dermatite atópica extrínseca
DAIA: dermatite atópica induzida por alimentos
Th: linfócito T *helper*
AD: grupo dermatite atópica no capítulo III
ALD: grupo dermatite atópica-like no capítulo III

RESUMO

A dermatite atópica (DA) é uma doença cutânea pruriginosa, inflamatória, crônica associada a anticorpos IgE alérgeno-específicos principalmente voltados contra alérgenos ambientais. A DA afeta diversas espécies, incluindo cães e humanos e o prurido é o seu principal sinal clínico. Além disso, cães atópicos tendem a apresentar quadros recorrentes de piodermites bacterianas, associadas a alterações no microbioma tegumentar. Em alguns casos, os pacientes apresentam sinais clínicos típicos de DA, mas anticorpos IgE alérgeno-específicos não podem ser detectados. Este subtipo de DA é chamado de dermatite atópica-like (ALD). Tanto as alterações no microbioma em cães atópicos quanto as características da ALD ainda são pouco estudadas em cães. Sendo assim, objetivou-se avaliar estes dois parâmetros distintos da DA. Para tal, o presente estudo foi dividido em duas partes. Na primeira parte, realizou-se um estudo retrospectivo dos prontuários de 269 cães atendidos no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, entre 2007 e 2015. Os pacientes foram divididos em dois grupos (AD e ALD) de acordo com os resultados dos testes alérgicos. Foram avaliados e comparados entre os grupos dados epidemiológicos, gravidade da doença de acordo com o grau de prurido, número de áreas corpóreas afetadas, protocolo de tratamento de manutenção e resposta à terapia. A partir do grau médio de prurido e do número médio de áreas corpóreas afetadas ao longo das visitas, foi criado um índice de gravidade da dermatite atópica (CADSI) para se avaliar a intensidade da doença em cada paciente e comparar entre os grupos ALD e AD. No grupo AD foram incluídos 228 cães (84,76%) e 41 no grupo ALD (15,24%). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nas variáveis epidemiológicas. Em relação à predisposição racial, o Bichon Frisé apresentou mais risco de desenvolver ALD. Não houve diferença significativa no grau médio de prurido e número de áreas corpóreas afetadas na primeira visita ou durante o tratamento entre os grupos, bem como na evolução dessas variáveis ao longo das visitas. Quando o CADSI foi comparado entre os grupos, não houve diferença. Na segunda parte, foram selecionados prospectivamente sete cães atópicos com manifestações clínicas sazonais, alocados no Grupo Atópico (GA) e dez cães saudáveis, alocados no Grupo Controle (GC) e amostras foram coletadas da região interdigital, axilar, abdominal e lombar utilizando um suabe estéril. No GC, realizou-se seis coletas intervaladas de quatro semanas. No GA, as amostras foram coletadas quatro semanas antes do mês típico de crise (Pré-crise), na crise antes de iniciar o tratamento (Crise), durante a crise com tratamento (Tratamento) e após a estação de crise, já sem tratamento (Pós-crise). Após as coletas, as amostras foram armazenadas refrigeradas por no máximo sete dias até a extração do DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA. Após o processamento, foi feita a análise bioinformática e estatística para avaliação taxonômica e cálculo de alpha e beta-diversidade. Os filos mais abundantes em todas as amostras foram Actinobacteria, Firmicutes, Fusobacteria e Proteobacteria. Observou-se que a diversidade do microbioma cutâneo de cães atópicos sofre redução no Pré-crise e o tratamento imunomodulador é capaz de restabelecê-la. Estes resultados são muito relevantes e promissores pois demonstram as alterações na diversidade do microbioma antes mesmo do surgimento dos sinais clínicos da doença e o papel restaurador da terapia imunomoduladora, sem o uso de antimicrobianos.

Palavras-chave: microbioma cutâneo, metagenoma, dermatite atópica, dermatite atópica-like, dermatologia, cão.

ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory, pruritic skin disease associated with allergen-specific IgE antibodies primarily against environmental allergens. AD affects several species, including dogs and humans. Pruritus is the main clinical sign of AD. In addition, atopic dogs tend to present recurrent superficial pyoderma, associated with alterations in the skin microbiome. In some cases, patients show typical clinical signs of AD, but allergen-specific IgE antibodies cannot be detected. This subtype of AD is called atopic-like dermatitis (ALD). Both the alterations in the skin microbiome of atopic dogs and the features of ALD are still poorly understood in dogs. Thus, we aimed to evaluate these two distinct parameters of AD. So, the present study was divided in two parts. In the first part, a retrospective study of the medical records of 269 dogs seen at the veterinary teaching hospital of the University of Minnesota between 2007 and 2015 was performed. Patients were divided in two groups (AD and ALD) according to the allergy tests results. Epidemiological data, disease severity according pruritus level, number of affected body sites, maintenance treatment protocol and response to therapy were evaluated and compared between the groups. The mean pruritus level and the mean number of body sites affected across visits, the Canine Atopic Dermatitis Severity Index (CADSI) was created to assess the severity of the disease in each patient and to compare ALD and AD. In the AD group, 228 dogs (84.76%) were included and in the ALD group, 41 (15.24%). There were no significant differences between the groups in the epidemiological variables. In relation to breed predisposition, Bichon Frisé was more predisposed to developing ALD. There was no significant difference in the mean pruritus level and number of affected areas at the first visit or during treatment between groups, as well as in the outcome of these variables throughout the visits. When CADSI was compared between groups, there was no significant difference. In the second part, were selected prospectively seven seasonal atopic dogs, Atopic Group (GA), and ten healthy dogs, Control Group (CG). Samples were collected from the interdigital, axillary, abdominal and lumbar regions from each dog using a sterile swab. In GC, six collections in a of four week interval were performed. In GA, the samples were collected four weeks prior the typical flare month (Pre-crisis), in the flare before starting the treatment (Flare), during the flare with treatment (Treatment) and after the flare season without treatment (Post-flare). After collection, samples were stored refrigerated for up to seven days until DNA extraction and sequencing of the 16S rRNA gene. After processing, bioinformatic and statistical analysis were performed for taxonomic evaluation and alpha and beta-diversity assessment. The most abundant phyla in all samples were Actinobacteria, Firmicutes, Fusobacteria and Proteobacteria. It was observed that the diversity of the cutaneous microbiome of atopic dogs undergoes a reduction the Pre-flare and the immunomodulatory treatment is able to reestablish it. These results are very relevant and promising as they demonstrate changes in microbiome diversity even before the inflammatory response of the disease and the restorative role of immunomodulatory therapy without the use of antimicrobials.

Key-words: skin microbiome, metagenomics, atopic dermatitis, atopic-like dermatitis, dermatology, dog.

INTRODUÇÃO GERAL

A pele é o maior e mais exposto órgão do corpo de humanos e animais, e uma de suas principais funções é a de formar uma barreira ao ambiente externo capaz de resistir a diversos tipos de ameaças. Para tal, a pele possui uma gama de mecanismos de imunidade inata e adquirida. Ainda assim, a superfície cutânea é habitada por diversas espécies de microrganismos que lá vivem como comensais, a microbiota ou microbioma. Esta comunidade microbiana, composta por diversas espécies de bactérias, fungos, vírus e arqueia, não apenas coexiste com o hospedeiro, mas também participa ativamente na integridade da barreira cutânea e na modulação do sistema imune. Desta forma, o sistema imune tegumentar possui duas tarefas antagônicas, a de tolerar a microbiota residente e a de reconhecer e eliminar patógenos de prontidão. Para garantir um bom funcionamento do sistema imune cutâneo, é necessário que haja um balanço entre estas tarefas. Caso haja ruptura deste equilíbrio, espécies microbianas comensais podem transformar-se em patógenos importantes. A inflamação cutânea é um fator de desequilíbrio relevante e a dermatite atópica (DA), é uma doença que frequentemente cursa com disbiose cutânea e infecções recorrentes.

A DA é uma doença pruriginosa, inflamatória e crônica, associada a anticorpos do tipo IgE espécificos para alérgenos ambientais, principalmente (HALLIWELL, 2006). Esta alergopatia afeta várias espécies, entre eles caninos, equinos e humanos. Em cães, a prevalência está em torno de 1-15% de toda a clínica geral e 3-30% dos casos dermatológicos (HILLIER e GRIFFIN, 2001). Entretanto, é possível que a prevalência seja subestimada nos estudos, pois a dermatite atópica frequentemente está associada a outras doenças como otites recorrentes e infecções secundárias bacterianas e fúngicas que não raramente são diagnosticadas como eventos independentes. Em serviços especializados em dermatologia veterinária, a dermatite atópica é a doença mais frequente na rotina dos profissionais e também uma das mais desafiadoras tendo em vista a intensidade dos sinais clínicos e a dificuldade de se obter um controle satisfatório.

Em humanos, a prevalência da dermatite atópica em crianças está em torno de 20% e afeta 2-7% dos adultos (LEUNG e BIEBER, 2003; WILLIAMS et al., 2008; DECKERS et al., 2012; SON et al., 2017). Dois fenótipos de dermatite atópica já foram identificados em humanos de acordo com os resultados obtidos nos testes alérgicos, a dermatite atópica extrínseca (EAD) e a dermatite atópica intrínseca (IAD). A EAD pode também ser denominada dermatite/eczema atópico alérgico devido à presença de altos níveis séricos de anticorpos do tipo IgE e reações positivas nos testes alérgicos que avaliam a presença de IgE alérgeno-específico. A IAD, por outro lado, é caracterizada por apresentar níveis séricos de IgE normais e ausência de IgE alérgeno-específicos nos testes alérgicos. Desta forma, é também conhecida como dermatite atopiforme, dermatite atópica não alérgica ou eczema não atópico (NOVAK e BIEBER, 2003; BRENNINKMEIJER et al., 2008). De maneira semelhante, em cães também há uma população de animais com sinais clínicos típicos de dermatite atópica em que não é possível a identificação de anticorpos IgE alérgeno-específicos tanto nos testes alérgicos intradérmicos quanto sorológicos. Denominou-se então esta condição de dermatite atópica-like (ALD) (HALLIWELL, 2006). Pouco se sabe sobre a patogenia e sobre as características de ALD, mas devido às semelhanças com a IAD, supõem-se que ALD seja a correlata canina da IAD (BRENNINKMEIJER et al., 2008).

Em humanos, sabe-se que EAD e IAD apresentam sintomas indistinguíveis. Entretanto, existem algumas características clínicas e epidemiológicas que as diferem, quando comparadas. Estas diferenças, apesar de discretas, são capazes de influenciar no manejo da doença. Sabe-se que

pacientes com EAD apresentam a intensidade e extensão lesional e grau de prurido significativamente mais leve que EAD, os sintomas tendem a ter início mais tardio, não apresentam doença respiratória associada e ausência de histórico familiar de doenças atópicas (FOLSTER-HOLST et al., 2006; BRENNINKMEIJER et al., 2008; TOKURA, 2010). Além disso, observou-se que pessoas com IAD utilizavam com menor frequência soluções tópicas de tacrolimus, emolientes e anti-histamínicos que EAD, e relataram melhor qualidade de vida, o que corrobora com a hipótese de que IAD possui quadro clínico mais leve (BRENNINKMEIJER et al., 2008). Em cães, só existe um estudo, publicado sob a forma de resumo, caracterizando os sinais clínicos de 21 cães com ALD e comparando com atópicos IgE dependentes (PRELAUD; COCHET-FAIVRE, 2007). Neste estudo, os autores não observaram diferenças clínicas evidentes entre os dois grupos, apenas uma resposta significativamente melhor à ciclosporina A nos atópicos IgE dependentes. Uma diferença importante entre esses dois fenótipos de dermatite atópica em cães é a impossibilidade do uso de imunoterapia nos ALD, restringindo ainda mais as opções terapêuticas nesses casos.

A patogenia da dermatite atópica em humanos e em cães, não completamente elucidada apresenta caráter sindrômico e multifatorial e resulta de uma interação entre os alérgenos, os defeitos na barreira cutânea e a disfunção do sistema imune do indivíduo (WEIDINGER; NOVAK, 2016; OTSUKA et al., 2017). O prurido primário é o sinal clínico mais característico da DA, sobretudo nas fases iniciais da doença, podendo apresentar-se alesional, conhecido como *prurido sine materia.* Inicialmente, o quadro lesional mais comum é eritema, pápulas, excoriações e lesões autoinduzidas. À medida que a doença se cronifica, as lesões por remodelamento tecidual em resposta à inflamação começam a surgir, tais como lignificação e hiperpigmentação, hiperqueratose (LARSSON; LUCAS, 2015). Em cerca de 50% dos casos, especialmente nas fases iniciais, a otite bilateral recorrente é o único sinal clínico presente, até mesmo o prurido pode ser ausente (FAVROT et al., 2010). A topografia lesional da dermatite atópica ocorre tipicamente na região perilabial, periocular, interdigital, axilar, antecubital, abdominal, auricular e perineal (FAVROT et al., 2010; WILHEM; KOVALIK; FAVROT, 2011).

Tanto em humanos quanto em cães, a DA está frequentemente associada a infecções bacterianas recorrentes principalmente causadas por *Staphylococcus sp.* Sendo assim, é crescente o interesse em pesquisas relacionadas ao microbioma bacteriano de pacientes com dermatite atópica. Um estudo que investigou a variação na comunidade bacteriana de crianças atópicas durante diferentes fases da doença, observou queda na diversidade do microbioma durante a crise, com predomínio de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis,* sobretudo nas áreas mais frequentemente afetadas. Os pesquisadores também observaram que o tratamento da doença resultou em restauração da diversidade, semelhante àquela antes da crise (KONG et al, 2012). Em cães, poucos estudos sobre o microbioma cutâneo de cães atópicos foram publicados e nenhum deles avaliou as suas alterações na fase assintomática, durante a crise, durante o tratamento imunomodulador e após a descontinuação do mesmo (HOFFMANN et al., 2014; BRADLEY et al., 2016; PIEREZAN et al., 2016).

Considerando todo o exposto, decidiu-se realizar dois experimentos diferentes, para investigar dois pontos relevantes à dermatite atópica: as alterações no microbioma e as apresentações clínicas da ALD. Para tal, o presente estudo foi dividido em duas partes. Na primeria parte, realizou-se a descrição das características epidemiológicas, sinais clínicos e resposta terapêutica de um grupo de cães com ALD e comparado com cães atópicos IgE dependentes com o objetivo de destacar as principais diferenças entre os dois fenótipos da dermatite atópica em cães. Na segunda parte, objetivou-se avaliar as alterações na diversidade do microbioma cutâneo

bacteriano antes do surgimento dos sinais clínicos da crise atópica e os efeitos do tratamento imunomodulador sobre o mesmo.

OBJETIVOS

Primeira parte: dermatite atópica-like (ALD)

- Avaliar de forma retrospectiva as características clínicas e epidemiológicas de um grupo de cães atópicos atendidos entre 2007 e 2015 em um hospital veterinário universitário em Minnesota (USA).
- Dividir os cães incluídos em dois grupos, dermatite atópica-like (ALD) e dermatite atópica (AD), de acordo com definição publicada (HALLIWELL, 2006) e comparar as características clínicas e epidemiológicas.

Segunda parte: microbioma cutâneo bacteriano de cães atópicos

- Determinar, por um estudo prospectivo, a existência de mudanças significativas no microbioma cutânea de cães com dermatite atópica sazonal durante crises quando comparada com as fases assintomáticas.
- Determinar se o tratamento imunomodulatório com glicocorticóides, ciclosporina ou oclacitinib, para dermatite atópica influencia o microbioma cutâneo.
- Avaliar se as alterações no microbioma cutâneo de cães atópicos precedem a crise alérgica ou se são induzidas pelas alterações inflamatórias geradas pela crise.

CAPÍTULO I

Dermatite atópica canina: patogênese, manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento - revisão de literatura.

1. Introdução

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica, recorrente e pruriginosa, que é, na grande maioria das vezes, associada a anticorpos IgE mais comumente voltados a alérgenos ambientais (HALLIWELL, 2006). Em cães, as dermatites trofoalérgicas, ou seja, causadas por alérgenos alimentares, e DA, historicamente, sempre foram consideradas entidades distintas. As reações adversas a alimentos são caracterizadas por mecanismos imuno-mediados e não imuno-mediados e apresentam manifestações clínicas diversas, tais como, distúrbios gastrointestinais, uticária, angioedema e sinais que mimetizam dermatite atópica (FAVROT et al., 2010). O fato de alérgenos alimentares serem capazes provocar sinais clínicos indistinguíveis de DA levou a *International Task Force on Canine Atopic Dermatitis* a reconhecer que proteínas de alimentos também podem desencadear crises da doença (OLIVRY et al., 2007). Desta forma, a doença é denominada dermatite atópica induzida por alimentos (DAIA) ou dermatite atópica *sensu lato* quando os alérgenos alimentares são reconhecidos com um dos causadores dos sinais clínicos, e dermatite atópica *sensu stricto* quando o quadro é não responsivo a alimentos. Entretanto, é incorreto inferir que toda reação adversa a alimentos com manifestações cutâneas é DAIA, quando na realidade, a última trata-se exclusivamente da dermatopatia alérgica com sinais clínicos típicos de dermatite atópica que apresenta melhora parcial ou total no quadro após dieta de eliminação com proteína exótica ou hidrolisada (PUCHEU-HASTON et al., 2015; PUCHEU-HASTON, 2016). Além da distinção dos conceitos de DAIA e DA *sensu stricto,* é importante também salientar a definição que abrange os pacientes que apresentam sinais clínicos de uma doença inflamatória e pruriginosa, com características não distinguíveis da DA, mas em que não é possível se documentar anticorpos do tipo IgE alérgeno-específicos em ambos os testes alérgicos sorológico e intradérmico. Esta doença foi então chamada de dermatite atópica-*like* (ALD) (HALLIWELL, 2006).

Em humanos, a DA apresenta prevalência em torno de 20% em crianças e 10% em adultos (LEUNG & BIEBER, 2003; WILLIAMS et al., 2008; DECKERS et al., 2012; WEIDINGER; NOVAK, 2016; SON et al., 2017). Nesta espécie, as manifestações clínicas são mais comuns na primeira infância, com gradual desaparecimento até a adolescência. Já em cães, os sinais clínicos geralmente aparecem em média entre os seis meses e três anos de idade, com progressiva intensificação do quadro, sem que ocorra a tendência ao desaparecimento da doença na fase adulta. Além disto, sugere-se que, quando há reação a proteínas alimentares, os sinais clínicos podem ocorrer em idades extremas, muito jovens ou senis (BIZIKOVA e SANTORO et al., 2015; WOLFF et al, 2008). Observa-se em humanos uma predisposição sexual feminina na dermatite atópica (SCHMID et al., 2001; NOVAK; BIEBER, 2003; BRENNINKMEIJER et al., 2008; KARIMKHANI et al., 2015; YAMAGUCHI et al., 2015), em cães, não existem diferenças significativas quanto ao gênero (ZUR et al., 2002; NØDTVEDT et al., 2006; TARPATAKI et al., 2006; FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011; BRUET et al., 2012; KHOSHNEGAH et al., 2013; MAZRIER et al., 2016).

Em cães, a prevalência relatada na literatura é variável e já foi relatada como sendo de 1 a 15% dos casos atendidos na clínica geral e 3 a 30% em cães com doenças de pele (HILLIER & GRIFFIN, 2001; A. NØDTVEDT et al., 2006) Desconhece-se ainda certamente se a prevalência de DA em cães também aumentou, como vem ocorrendo em humanos. Entretanto, estudos sugerem que houve sim um aumento na prevalência de DAC, assim como em humanos (MILLER et al., 2013).

2. Patogênese

A dermatite atópica é uma doença complexa e com patogenia multifatorial, que pode ser dividida didaticamente em fatores intrínsecos, os que são inerentes ao animal, e fatores extrínsecos, os fatores externos ao animal. A patogenia da doença será assim dividida e detalhada a seguir.

2.1 Fatores intrínsecos

2.1.1 Fatores genéticos

Na medicina humana, diversos estudos foram realizados no intuito de investigar os genes relacionados à DA. Múltiplas associações foram reconhecidas entre os alelos dos cromossomos 5, 7 e 11. Além disso, inibição dos genes responsáveis formação do envelope cornificado e ativação da via alternativa de queratinização foram demonstradas em humanos, sugerindo que epidermopoiese anormal e mecanismos de defesa defectivos são pontos chave na patogenia da DA (MILLER et al., 2013). As mutações no gene da filagrina, tem sido amplamente pesquisadas e são consideradas como os principais fatores causais de disfunções da barreira cutânea em humanos e aproximadamente 10 a 30% das pessoas atópicas têm a mutação (PALMER et al., 2006; OTSUKA et al., 2017).

Já nos cães, a herança genética relacionada com a DA está longe de ser completamente elucidada, mas já é sabido que a doença tem uma base genética complexa, o que, juntamente com os fatores ambientais, predispõem indivíduos a desenvolverem os sinais clínicos. A forte predisposição racial suporta esta afirmação. Pastores Alemães, Golden Retrievers, West Highland White Terriers, Cocker Spaniels, Boxers e Buldogues Franceses foram as raças mais frequentes em diversos estudos, ainda que a predisposição racial seja variável de acordo com a região (JAEGER et al., 2010; MEURY et al., 2011; BIZIKOVA et al., 2015). Um estudo com 439 cães-guia das raças Labrador e Golden Retriever descendentes de 13 cães com dermatite atópica, realizado no Reino Unido, demonstrou herdabilidade da dermatite atópica de 0,47, indicando que cerca de 50% do risco de desenvolvimento da doença foi relacionado com o genótipo. O mesmo estudo demonstrou também que o fato de ambos os pais serem atópicos está relacionado com alto risco dos filhotes terem DA. Caso apenas um dos pais tivesse a doença, este risco tornava-se moderado. Já os filhotes de pais não atópicos possuíram um risco baixo de desenvolverem a doença. Desta forma, os autores concluíram que a DA tem forte herança genética e o cruzamento de animais doentes deve ser desencorajado (SHAW et al., 2004).

Devido à relevância que tem se dado à mutação do gene da filagrina na DA humana, esta alteração genética tem sido bastante investigada em cães com DA. Os resultados destes estudos são controversos e não se sabe ainda se a alteração estrutural da filagrina tem realmente alguma relação com a patogenia e gravidade da DA. Santoro e colaboradores, em 2013, detectaram em seu estudo com Beagles atópicos com DA experimentalmente induzida, expressão e distribuição de filagrina anormais na pele lesionada destes animais (SANTORO et al., 2013b). Entretanto,

outro estudo realizado no mesmo ano, também com Beagles atópicos com DA experimentalmente induzida, concluiu que a expressão de filagrina não se relaciona inversamente com a gravidade do quadro clínico da dermatite atópica e considera que a relevância desta proteína na doença permanece desconhecida (MARSELLA, 2013). Além do gene da filagrina, também foi demonstrada a associação do gene da placofilina-2 (PKP2) com o desenvolvimento da dermatite atópica em um estudo realizado a partir do sequenciamento do genoma de uma população de pastores alemães da Suécia (TENGVALL et al., 2013). A placofilina-2 é uma proteína que recruta desmoplaquina para a formação correta dos desmossomos, que são junções intercelulares cruciais para a estrutura da pele (TENGVALL et al., 2016).

2.1.2 Barreira cutânea

Na pele de mamíferos, a barreira cutânea tem a função de proteger a pele da perda de água transepidérmica e penetração de moléculas exógenas, como alérgenos e microrganismos, do ambiente. O estrato córneo, camada mais externa da epiderme, é o principal responsável por esta função, e é composto de queratinócitos cornificados, os corneócitos, envoltos por uma matriz lipídica lamelar (OLIVRY, 2011). O estrato córneo é um tecido com várias camadas compostas por corneócitos anucleados e achatados, envoltos por uma matriz extracelular composta por ceramidas, colesterol ácidos graxos livres. A localização destes lipídeos altamente hidrofóbicos evita a perda de água transepidérmica. Os lipídeos da matriz extracelular são liberados no estrato córneo, em forma de precursores como glicosilceramidas, fosfolípides e colesterol, originários da extrusão dos corpos lamelares. Esta organela contém também enzimas que convertem os precursores em lipídeos e orquestram a lise dos corneodesmossomos, possibilitando a descamação dos corneócitos. Além disto, os corpos lamelares também secretam os peptídeos antimicrobianos, essenciais para a defesa contra a colonização de microrganismos patogênicos (ELIAS e SCHMUTH, 2008).

A disfunção da barreira cutânea tem despertado grande interesse tanto na medicina humana quanto na veterinária. É evidente a sua participação na patogenia da DA em ambas as espécies, entretanto, ainda não é totalmente esclarecido se estas anormalidades são primárias ou secundárias à inflamação decorrente da DA (SANTORO et al., 2015). Os defeitos da barreira cutânea intensificam a penetração epicutânea de alérgenos e consequentemente a sensibilização a alérgenos ambientais e/ou alimentares, provocando uma reação do sistema imune local (MARSELLA et al., 2011; OLIVRY et al., 2011; ASAHINA e MAEDA, 2017). Consequentemente, após a sensibilização, a resposta imune do tipo Th2 promove a liberação de citocinas inflamatórias que intensificam ainda mais o dano na barreia cutânea, tornando-se assim um ciclo inflamatório na pele dos indivíduos atópicos (OLIVRY et al., 2011; PUCHEU-HASTON et al., 2015; OTSUKA et al., 2017)

Os corpos lamelares são sintetizados na camada espinhosa e, na camada granulosa, se fundem com a membrana plasmática dos queratinócitos e secretam seu conteúdo nos espaços intercelulares, formando a matriz extracelular. Após a secreção, as enzimas lamelares hidrolisam os lipídeos em ceramidas, ácidos graxos livres e colesterol, formando a matriz superapolar. As ceramidas são lipídeos ácidos graxos ligados a amidas que contém uma longa cadeia de aminoálcool, de base esfingóide. Vários tipos de ceramidas são encontradas no estrato córneo e estas são os principais componentes para a sua organização lamelar e função de barreira cutânea. Além disto, participam ativamente da plasticidade da camada córnea da pele, permitindo a movimentação devido a fluidificação da barreira lipídica (MILLER et al., 2013).

Os corneócitos possuem abaixo de sua membrana plasmática, uma estrutura altamente especializada, o envelope cornificado. Este é composto por um envelope de proteínas como filagrina, loricrina, involucrina e cistatina A, e um envelope lipídico. Estas proteínas são provenientes dos grânulos de querato-hialina, produzidos no citoplasma dos queratinócitos da camada granulosa. A filagrina é armazenada nos grânulos de querato-hialina em forma de pró-filagrina que, após liberada, sofre clivagem cálcio-dependente em monômeros de filagrina. A função desta é agregar os filamentos de queratina, também derivados dos grânulos de querato-hialina, e agrupá-los em macrofilamentos. Loricrina e cistatina A atuam na adesão dos filamentos de queratina uns aos outros e ancoragem dos mesmos ao envelope cornificado. Estes processos são fundamentais para a queratinização do envelope cornificado, que, progressivamente, gera o achatamento característico dos corneócitos (ELIAS e SCHMUTH, 2008; PROKSCH et al., 2008).

Em humanos, as mutações no gene da filagrina (*FLG)* são os mais importantes fatores de risco para o desenvolvimento de DA, bem como agentes causadores de ictiose vulgar. Estima-se que 25-50% das pessoas atópicas possuam mutações em *FLG*, desta forma, apesar da sua grande relevância, não é uma condição essencial para o desenvolvimento da DA (OSAWA et al, 2011). Em cães atópicos, um estudo com Labradores britânicos mostrou redução na expressão de mRNA de filagrina e associação de mutações C-terminais causadoras de perda de função com DA (CHERVET et al., 2010). Entretanto, um estudo com Labradores dos EUA e Japão, e outras raças, não conseguiu reproduzir essa associação da DA com estas mutações (WOOD et al., 2010). Outro estudo com cães atópicos da raça West White Highland Terrier demonstrou que as mutações de *FLG* não são importantes nessa raça (BARROS ROQUE et al., 2009). Entretanto, a redução na expressão de mRNA na pele de cães atópicos já foi demonstrada (CHERVET et al., 2010; ROQUE et al., 2011). Além disto, outro estudo avaliando a expressão de enzimas degradadoras de filagrina demonstrou um aumento das mesmas na pele alesional de cães atópicos comparados com cães normais no tempo 0, antes da sensibilização com ácaros da poeira doméstica, mas não houve diferença ao longo do tempo. Ou seja, a degradação de filagrina não foi aumentada pela presença de inflamação na pele. Portanto, os autores demonstraram o aumento da atividade de degradação de filagrina em animais atópicos, mas concluíram que esta disfunção provavelmente não foi influenciada pela inflamação, podendo ser então uma alteração primária (FANTON et al., 2017).

Além da filagrina, outro grupo de proteínas da epiderme parece estar envolvido na patogenia da DA em cães. As proteínas de ligação entre queratinócitos, principalmente claudinas e ocludinas, regulam a adesão de queratinócitos e o trânsito de moléculas, formando uma segunda barreira cutânea (ASAHINA & MAEDA, 2017). Em um estudo em humanos, observou-se que a expressão de claudina-1 na pele de atópicos estava reduzida e correlacionava-se inversamente com marcadores de resposta T_H2 (GEORAS et al., 2012). Em cães, um estudo observou que a expressão de claudina-1 estava reduzida na pele não lesional de atópicos comparado à pele de cão normal (ROUSSEL et al., 2015). Outro estudo na mesma espécie observou que a expressão de zona occludens-1 e ocludina estava reduzida na pele de atópicos, mas não claudina-1 (KIM et al., 2016). Os resultados destes estudos, ainda que incongruentes, sugerem que a disfunção da segunda barreira provavelmente existe na DA canina, assim como em humanos (ASAHINA & MAEDA, 2017).

As ceramidas são consideradas a principal classe de lipídeos da barreira cutânea e a sua deficiência está relacionada com aumento da perda de água transepidérmica e, consequentemente desidratação em humanos com DA. Em cães atópicos e controles, observou-se em um estudo a

partir da avaliação cromatográfica dos lipídeos na matriz extracelular, que a proporção das ceramidas 1 e 9 e de colesterol na pele dos atópicos foi significativamente menor que a dos hígidos, concluindo que a deficiência de ceramidas está provavelmente envolvida na ruptura da barreira epidérmica de cães com DA. Estas ceramidas são carreadoras de ácido linoleico e ômega 6, assim, sabe-se que, em humanos, elas tem função importante na manutenção da integridade da barreira cutânea. (REITER et al., 2009). Outros estudos com cães com DAC também reiteraram os resultados do anterior (POPA et al., 2011; YOON et al., 2011). Além da deficiência de ceramidas, existe também nos animais com DAC anomalias no arranjo das lamelas lipídicas da barreira cutânea, em pele hígida e lesionada. Estudos mostram que, apesar de o número e a morfologia dos corpos lamelares ser aparentemente normal, a distribuição dos lipídeos apresenta anomalia tanto em termos de continuidade quanto de espessura, o que gera espaços intercelulares maiores entre os corneócitos e descamação prematura dos mesmos (INMAN et al., 2001; PIEKUTOWSKA et al., 2008). Em 2010, Marsella e colaboradores, em um estudo com cães atópicos da raça Beagle, após indução experimental de sensibilização por ácaros ambientais, observaram, na pele macroscopicamente não lesionada destes animais, desorganização dos lipídeos lamelares da matriz extracelular e retenção de corpos lamelares no citoplasma dos corneócitos (MARSELLA et al.,2010). Em outro estudo, o efeito da sensibilização experimental com ácaros da poeira doméstica na quantidade de ceramidas no estrato córneo de cães atópicos foi avaliado e observou-se a redução significativa na quantidade de diferentes tipos de ceramidas não só no local de aplicação do antígeno, mas também em regiões corpóreas distantes (STAHL et al., 2012). Os achados destes estudos demonstram a capacidade da inflamação que ocorre na pele atópica possui de agravar ainda mais o dano possivelmente pré-existente. (HIGHTOWER et al., 2010; STAHL et al., 2012).

Em humanos, a forma de acessar a integridade da barreira cutânea é tradicionalmente realizada por mensuração da perda de água transepidérmica em câmeras evaporimétricas abertas ou fechadas. A partir destes métodos, há evidências de que, nesta espécie, pacientes com DA tem aumento de perda de água transepidérmica tanto em pele hígida quanto em áreas lesionadas e quanto maior a gravidade da doença, maior é esta desidratação (GUPTA et al., 2008). Em cães com DA, a utilidade destes métodos de mensuração é discutível, pois existe uma variação individual, temporal e de região corpórea muito grande nos resultados, dificultando a comparação entre os pacientes em ensaios clínicos (OLIVRY, 2011). Entretanto, em estudos realizados em cães com estas câmaras evaporimétricas, mesmo com as limitações, os autores observaram perda de água transepidérmica significativamente maior em pele normal e lesionada de cães atópicos, quando comparados com animais controle hígidos (HIGHTOWER et al., 2010; SHIMADA et al., 2009). Além disto, a redução na quantidade de ceramidas na pele de cães atópicos está inversamente correlacionada à perda de água transepidérmica, demonstrando a função das ceramidas na manutenção da integridade da barreira cutânea (SHIMADA et al., 2009).

Outro componente importante da barreira cutânea são os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Nos mamíferos, eles representam um componente essencial da imunidade inata e uma molécula pivô na organização das respostas inata e adaptativa. Os peptídeos antimicrobianos são capazes de induzir fagocitose, estimular liberação de prostaglandinas, neutralizar efeitos específicos dos lipopolissacárides (LPS), promover recrutamento de diversas células imunes para locais inflamados, promover angiogênese, induzir cicatrização de lesões, ativar granulócitos, entre outras funções. Desta forma, participam ativamente da barreira epidérmica, protegendo o organismo contra a invasão de microrganismos patogênicos e auxiliando na manutenção da estabilidade do microbioma cutâneo (SANTORO, 2015). Em humanos, existem vários estudos relacionando estes peptídeos com dermatopatias inflamatórias. Na DA, sabe-se que a expressão

de alguns tipos de catelicidinas e beta-defensinas são inibidas por citocinas de resposta Th2 (IL-4 e IL-13), o que deixa a pele destes pacientes mais suscetível a infecções estafilocócicas, doença secundária comum da DA (WOLFF et al., 2008; ASAHINA e MAEDA, 2017). Em cães, um estudo demonstrou a redução da transcrição de beta-defensinas-1, -103 e -122 na pele de cães atópicos em comparação com normais. Entretanto, não observaram diferenças entre os níveis de transcrição das mesmas beta-defensinas de cães atópicos e de cães com outras dermatopatias inflamatórias, sugerindo que esta redução pode estar atribuída à inflamação em geral (LANCTO et al., 2013). Outro estudo semelhante não observou diferenças significativas nos níveis de transcrição de beta-defensinas -1 e -103 de pele normal, atópica não infectada ou atópica infectada (MULLIN et al., 2013). Por outro lado, outro estudo demonstrou um aumento significativo na transcrição da beta-defensina-103 em cães atópicos, comparado com cães saudáveis (SANTORO et al., 2013a). As discrepâncias nos resultados dos estudos sugerem que mais pesquisas são necessárias para esclarecer as funções dos PAMs na DA canina e se eles são mesmo relevantes como demonstrado em humanos (ASAHINA e MAEDA, 2017).

2.1.3 Imunologia

Os linfócitos T $CD4^+$, são ativados por células dendríticas e se diferenciam em células antígeno-específicas T *helper.* Estes linfócitos são capazes de regular outras células do sistema imune pela secreção de citocinas. Entretanto, existem ao menos quatro padrões de citocinas que caracterizam diferentes respostas relacionadas aos T *helper* (MOSER e LEO, 2010). Linfócitos T *helper* são inicialmente designados como T_H0, mas podem ser ativados em T_H1, T_H2, T_H17, T_H regulador dependendo dos sinais enviados pelas células apresentadoras de antígenos. A secreção de IL-4 pelas mesmas é um sinal potente para a polarização da resposta em T_H2. Em contraste, a secreção de IL-12 pelas apresentadoras de antígenos direciona fortemente a resposta T_H1. Tradicionalmente, acreditava-se que, uma vez que a resposta imune se polarizasse para T_H1 ou T_H2, a tendência é que seguisse na mesma direção, pois as citocinas de um lado inibem o desenvolvimento de células do fenótipo oposto. Em linhas gerais, T_H1 tende a promover imunidade celular e produção de IgG por células B, e T_H2 está relacionada à produção de IgE e respostas alérgicas (MILLER et al., 2013).

Entretanto, com a evolução dos métodos de avaliação de expressão gênica, pode-se se afirmar que a DA não é uma reação exclusiva de T_H2. Na DA, ambas as respostas, T_H1 e T_H2 estão envolvidas (PUCHEU-HASTON et al., 2015). Uma resposta imune bifásica tem sido observada na DA, sendo lesões cutâneas agudas relacionadas à polarização da resposta em direção a T_H2, predominância de eosinófilos, com liberação IL-4, IL-5, IL-13 e IL-31, principalmente, e consequentemente, produção de IgE. Já lesões cutâneas crônicas demonstram predominância de macrófagos e presença de citocinas do tipo T_H1, IL-2, IL-12 e IFNγ (MILLER et al., 2013; PUCHEU-HASTON et al., 2015). Um resumo das funções das principais citocinas envolvidas no sistema imune tegumentar está representado no Quadro 1.

Citocina	Origem	Alvo principal	Efeitos biológicos
Interferon β (IFNβ)	Fibroblastos	NK, células teciduais	Expressão de MHC I e ativação de NK
Interferon γ (IFNγ)	Macrófagos, Th1 e $TCD8^+$	Macrófagos, NK, linfócitos T e B, células dendríticas	Ativação de macrófagos, diferenciação de Th0 em Th1, produção de IgG, expressão de MHCI e MHCII.
Interleucina 1 (IL-1)	Macrófagos, células endoteliais e epiteliais	Células endoteliais, hipotálamo e fígado	Ativação de células endoteliais, febre, síntese de proteínas de fase aguda e IL-6
Interleucina 2 (IL-2)	Macrófagos e linfócitos T	Linfócitos T e B, NK	Inflamação, proliferação e diferenciação de linfócitos T, síntese de IL-4 e IFNγ, diferenciação de NK e síntese de anticorpos
Interleucina 3 (IL-3)	Células T	Células hematopoiéticas imaturas	Estimula hematopoiese
Interleucina 4 (IL-4)	Th2, mastócitos e basófilos	Th2, células B, células epiteliais e macrófagos	Desenvolvimento de resposta Th2, estimular produção de IgE, reações alérgicas, ativação de macrófagos, peristaltismo, produção de muco
Interleucina 5 (IL-5)	Th2, mastócitos	Eosinófilos, células B	Ativação, multiplicação e diferenciação de eosinófilos, produção de IgA
Interleucina 6 (IL-6)	Macrófagos, células endoteliais, células T	Fígado, células B, precursores de leucócitos, Th17	Síntese de proteínas de fase aguda, proliferação de células B e produção de anticorpos, diferenciação de neutrófilos, produção de IL-17
Interleucina 7 (IL-7)	Fibroblastos, células da medula óssea	Precursores linfóides imaturos	Produção de linfócitos B e T
Interleucina 10 (IL-10)	Macrófagos e Treg	Macrófagos e células dendríticas	Inibe produção de IL-12 e expressão de MHCI e MHCII
Interleucina 12 (IL-12)	Células dendríticas, macrófagos	Linfócitos T e NK	Síntese de IFNγ e diferenciação de Th0 em Th1
Interleucina-13 (IL-13)	Th2, basófilos, eosinófilos, NK, macrófagos	Células B, monócitos, células dendríticas, eosinófilos, basófilos, células epiteliais e endoteliais, fibroblastos	Aumento da produção de muco, aumento da produção de IgE, reações alérgicas, proliferação de fibroblastos (fibrose)
Interleucina 15 (IL-15)	Macrófagos	NK, células T	Proliferação de NK e $TCD8^+$ de memória
Interleucina 17 (IL-17)	Th17	Leucócitos, células epiteliais	Produção de quimiocinas, peptídeos antimicrobianos, inflamação e respostas de neutrófilos
Interleucina 18 (IL-18)	Macrófagos	NK, células T	Síntese de IFNγ
Interleucina 22 (IL-22)	Th17	Células epiteliais	Síntese de peptídeos antimicrobianos
Interleucina 25 (IL-25)	Th2	Fagócitos, células T	Produção de IL-4, IL-5, IL-13; aumento da expressão de fatores inibidores de migração de fagócitos, para que estes continuem no local de inflamação
Interleucina 31 (IL-31)	Th2	Células dendríticas, epiteliais, eosinófilos, mastócitos	Indução de prurido e inflamação
TGF β	Células T, macrófagos	Linfócitos T e B, macrófagos e fibroblastos	Inibição do crescimento e função de células T, inibição da proliferação de células B,inibição da ativação de macrófagos,
Fator de necrose tumoral (TNF)	Macrófagos, células T	Neutrófilos, hipotálamo, células endoteliais	Estimula inflamação, recrutamento de neutrófilos e monócitos, síntese de quimiocinas, síntese de IL-1, apoptose e catabolismo

Quadro 4: Principais citocinas que atuam no sistema imune tegumentar, suas células de origem, alvo e efeito biológico. (MILLER et al., 2013; MCCANDLESS et al., 2014).

Diferente da visão tradicional que se tinha dos queratinócitos, estas não são apenas células estruturais e hoje sabe-se que eles expressam uma gama de receptores para perceber a entrada de invasores. Dentre eles, os principais são os receptores Toll (TLR) e os receptores ativados por proteases (PARs), o que indica a habilidade destas células de reconhecer componentes de microrganismos. Estudos recentes demonstram que a ativação de TLRs e PAR-2 pelos queratinócitos caninos e humanos induzem a produção de citocinas e quimiocinas necessárias para iniciar e manter a inflamação alérgica (MAEDA et al., 2013; ASAHINA e MAEDA, 2017). Maeda e colaboradores demonstraram em seu estudo que queratinócitos de cães quando expostos a tripsina, sofrem estimulação de PARs que induzem a produção de TNF-alfa, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), IL-8 e a quimiocina regulada pelo timo e ativação (TARC/CCL17). Os autores concluem que os queratinócitos quando expostos a alérgenos que são proteases como os ácaros da poeira doméstica e baratas, podem contribuir na patogênese da DA, modulando a resposta imune (MAEDA et al., 2013).

Para que a resposta de T_H seja polarizada no sentido de T_H2, as células dendríticas precisam ser ativadas por citocinas e quimiocinas produzidas pelos queratinócitos. Sabe-se que estas células são capazes de produzir diversos mediadores inflamatórios, mas os principais na patogenia da DA são TARC/CCL17, a linfopoietina estromal tímica (TLSP), GM-CSF e a IL-33 (ASAHINA & MAEDA, 2017). A TARC é uma quimiocina produzida por queratinócitos que se liga ao receptor CCR4 nos linfócitos T_H2, fazendo quimiotaxia dos mesmos para a pele (MAEDA et al., 2005; IIO et al., 2014). Em um estudo avaliando a transcrição de citocinas por T_H2 $CCR4^+$ E $CCR4^-$, Lio e colaboradores observaram que a produção de IL-4 pelas células $CCR4^+$ foi significativamente maior que pelas $CCR4^-$, sugerindo que além de estimular a infiltração cutânea por linfócitos T_H2, também estimula a produção pronunciada de IL-4 (IIO et al., 2014). Em outro estudo, Maeda e colaboradores observaram que a produção de TARC ocorre predominantemente na pele lesional de cães atópicos (MAEDA et al., 2005). Vários estudos em humanos demonstram que a concentração plasmática e sérica de TARC/CCL17 está correlacionada à severidade da DA e tem sido utilizada como um bom biomarcador da doença (KAKINUMA et al., 2001; LEUNG et al., 2002; MORITA et al., 2002; HIJNEN et al., 2004; JAHNZ-ROZYK et al., 2005). Em cães, o mesmo não pode ainda ser afirmado, entretanto, no momento há um estudo em andamento no Japão investigando o uso da concentração plasmática e sérica de TARC/CCL17 em cães como biomarcador de DA (ASAHINA e MAEDA, 2017).

A TSLP é uma importante quimiocina produzida pelos queratinócitos envolvida em diversas funções biológicas, como maturação de células dendríticas, expansão de células T e B e ativação de células de imunidade inata (HE et al., 2008). A TSLP está envolvida na patogênese da DA em humanos e a sua expressão foi detectada nos queratinócitos das camadas mais externas da epiderme nas fases crônicas e agudas da DA (SOUMELIS et al., 2002). Outro estudo demonstrou que a expressão de TSLP na pele de pessoas atópicas foi maior que em indivíduos normais e estava correlacionada com o escore de ressecamento da pele e hidratação do estrato córneo (SANO et al., 2013). A TSLP produzida por queratinócitos ativa células dendríticas e induz a produção de TARC/CCL17 e estas células dendríticas ativadas por TSLP induz linfócitos T_H0 a se diferenciarem em T_H2 (SOUMELIS et al., 2002).

Em cães, foi demonstrado que o nível de expressão de TSLP na pele de cães com DA foi significativamente maior que em cães normais, mas não houve diferença entre pele lesional e alesional dos atópicos (KLUKOWSKA-RÖTZLER et al., 2013). Além disso, a ligação de extratos alergênicos de ácaros da poeira doméstica com TLR3 e TLR4 de queratinócitos caninos em cultura provocou indução da expressão de TSLP (KLUKOWSKA-RÖTZLER et al., 2013).

Estes achados de estudos indicam que o TSLP é um alvo farmacológico promissor no tratamento de doenças alérgicas (ASAHINA e MAEDA, 2017)

A IL-33 é uma citocina também produzida pelos queratinócitos que induz o desenvolvimento de inflamação associada a resposta T_H2 na DA e na asma pela produção de citocinas T_H2 e aumento do tempo de sobrevivência de mastócitos e eosinófilos (MILLER, 2011). Em um estudo com cães atópicos na fase aguda da doença foi revelado que a expressão de IL-33 era aproximadamente três vezes maior que em cães normais (PLAGER et al., 2012). Estes resultados sugerem que a IL-33 provavelmente está envolvida na patogênese da DA em cães e a inibição da mesma por anticorpos monoclonais pode apresentar benefícios no tratamento da doença (ASAHINA e MAEDA, 2017).

A identificação e caracterização das imunoglobulinas do tipo E, IgE, caninas representaram o primeiro trabalho significativo na alergologia veterinária. Os resultados dos estudos da época sugeriram que IgE possuía função muito relevante na patogenia da DA. Ainda que os estudos possam frequentemente demonstrar a presença de IgE alérgeno-específicos em animais afetados, alguns cães apresentam sinais clínicos de DA sem evidenciação destas imunoglobulinas em teste sorológico e intradérmico. Desta forma, a função destes anticorpos na patogenia da DA ainda não é completamente elucidada. Além disto, também há algumas questões em relação à participação dos anticorpos do isotipo IgG na DA, pois IgG alérgenos específicos podem ser demonstrados tanto em animais sensibilizados experimentalmente quanto espontaneamente, reiterando o conceito de que a DA é resultado de uma resposta imune bifásica de T_h1 e T_h2 (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Os anticorpos IgE são expressados na superfície das células de Langerhans na epiderme de cães atópicos, mas não dos animais hígidos, sugerindo que, da mesma forma como ocorre em humanos, IgE participa na captura e processamento dos alérgenos. Imunoglobulina E também é expressada na superfície de mastócitos *in situ*, participando também da degranulação destas células (PUCHEU-HASTON et al., 2015). As células de Langerhans apresentam função essencial na DA. Olivry e colaboradores, em 1996, em um estudo amostras de pele lesional e alesional de cães atópicos, analisaram a epiderme e a derme morfometricamente e por imunohistoquímica com corantes ligados a IgE alérgeno-específicos (OLIVRY et al., 1996). Além disto, realizaram também a mensuração sorológica de IgE total destes animais. Desta forma, puderam observar que a epiderme tanto das amostras lesionais de cães atópicos possuíram quantidade significativamente maior de células de Langerhans comparado à pele alesional do mesmo grupo de animais (OLIVRY et al., 1996). Além disto, a associação de células dendríticas com IgE só foi observada na pele dos animais atópicos e não nos controles hígidos. Em consoante, houve correlação entre a porcentagem desta associação na pele dos cães atópicos com a titulação de IgE total destes pacientes. Assim, concluíram que há, em cães com DA, hiperplasia de células dendríticas e expressão de IgE (OLIVRY et al., 1996).

A titulação total de IgE é elevada em pacientes humanos, mas isto é menos pronunciado em cães atópicos, tendo este parâmetro pouca associação com a doença nestes animais. Em contraste, os níveis de IgE alérgeno-específicos são mais fortemente associados à presença de dermatite atópica em cães (OLIVRY et al., 2011; PUCHEU-HASTON et al., 2015). Entretanto, estudos observaram altos níveis de IgE alérgeno-específicos em cães sem sinais clínicos de DA ou demonstraram nível não significativo destes anticorpos em testes sorológicos e intradérmicos de animais com sinais consistentes, diagnosticados com a doença, status classificado como dermatite atópica-*like* ou símile (LAUBER et al., 2012; LIAN e HALLIWELL, 1998; ROQUE et al., 2011).

Dermatite atópica-*like* (ALD) é o termo empregado para caracterizar uma doença alérgica dermatológica inflamatória, pruriginosa, com apresentação clínica idêntica à observada na dermatite atópica canina, porém não é possível a documentação de resposta de IgE a alérgenos ambientais ou de outra natureza (HALLIWELL, 2006). Em humanos, denomina-se dermatite atópica intrínseca (DAI) a alergopatia que apresenta sintomas idênticos de DA, mas sem aumento de IgE total sérico e IgE alérgeno-específicos identificados em testes alérgicos e dermatite atópica extrínseca (DAE) quando há aumento do nível sérico de IgE e IgE alérgeno-específicos. As manifestações clínicas da DAE e DAI são muito semelhantes, praticamente indistinguíveis. Entretanto, algumas características são observadas em alguns estudos. Os pacientes humanos com DAI geralmente não apresentam história familiar da doença, são mais predispostos ao desenvolvimento tardio, na fase adulta, não possuem sintomas respiratórios e aparentemente não apresentam defeitos na barreira epidérmica (NOVEMBRE et al., 2001; KULTHANAN et al., 2011). A frequência de DAI em humanos está entre 10-45% (SCHMID et al., 2001; CHOI et al., 2003; NOVAK & BIEBER, 2003; FOLSTER-HOLST et al., 2006; PÓNYAI et al., 2008; OTT et al., 2009, 2010; KULTHANAN et al., 2011). Até o presente momento, não há informações suficientes para determinar se a ALD representa uma variante canina da DAI humana ou se esses cães não foram testados para os alérgenos apropriados. Ademais, estes cães podem ter reações de IgE a alérgenos pouco convencionais ou atípicos ambientais, microbianos, auto-alérgenos ou até mesmo alimentares não identificados (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

2.1.4 Alérgenos

Os principais alérgenos ambientais envolvidos na dermatite atópica incluem: pólens de árvores, arbustos e gramíneas, poeira doméstica, fibras de tecidos, escamas de animais e humanos, fragmentos de insetos, ácaros da poeira doméstica, em destaque *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Dermatophagoides farinae*, esporos de fungos, ácaros de armazenamento e outros alérgenos de menor frequência (HILL & DEBOER, 2001). No passado, acreditava-se que os alérgenos adentravam-se no organismo principalmente pela via inalatória. Atualmente, sabe-se que a forma mais relevante de entrada é a percutânea (OLIVRY & HILL, 2001). A via percutânea de sensibilização é bem descrita em humanos e animais e auxilia na compreensão do fato de a distribuição das lesões nos cães ser principalmente nas áreas de maior contato com o ambiente (LARSSON e LUCAS, 2015; MILLER et al., 2013).

Classicamente, reações adversas a alimentos e DA sempre foram tratadas como doenças distintas. Entretanto, esta separação tem sido frequentemente motivo de debate entre os pesquisadores. Atualmente, já se sabe que alérgenos alimentares são causadores de crises de DA em cães com sintomas indistinguíveis dos causados por alérgenos ambientais. Desta forma, chama-se de dermatite atópica induzida por alimentos (DAIA) a doença canina com sinais clínicos indênticos aos da DA, mas que há melhora após a dieta de eliminação e confirmação após reexposição à dieta antiga. Em medicina humana, alérgenos alimentares são os primeiros a sensibilizarem crianças com DA (OLIVRY et al., 2007; WILHEM et al., 2011). As principais fontes de proteína envolvidas nas reações adversas a alimentos são carne bovina, derivados lácteos, carne de frango, trigo, ovos e carne ovina (MUELLER et al., 2016; BEXLEY et al., 2017).

Existem evidências de que infecções bacterianas e fúngicas secundárias, frequentes nos pacientes com DA, não apenas contribuam para o desconforto do animal, como também sejam causadores e perpetuadores da reação alérgica. Ou seja, antígenos bacterianos e fúngicos podem ser capazes desencadear a reação de hipersensibilidade. O mecanismo pelo qual isto acontece tem motivado diversos estudos tanto na área humana quanto veterinária. Sabe-se que *Staphylococcus*

pseudintermedius é capaz de produzir toxinas com função de superantígenos, que provocam reações inflamatórias e alérgicas na pele após apresentação dos mesmos às células T_H2. Antígenos de leveduras como a *Malassezia* também podem atuar como alérgenos no desenvolvimento e perpetuação da DA. Estes microrganismos, habitantes naturais do microbioma de cães normais, tendem ao supercrescimento na pele de animais atópicos devido à diversos mecanismos incluindo os defeitos da barreira cutânea e o desequilíbrio no microbioma que provocam predomínio de determinadas espécies sobre outras, dependendo das condições. Sabe-se que pacientes Ainda não é bem estabelecido se o distúrbio no microbioma é um resultado da crise atópica, se este pode ser um dos agentes causais ou até mesmo se pode atuar das duas formas, em diferentes graus. Este assunto tem sido motivo de pesquisas, para a melhor elucidação destas questões, com o objetivo de se desenvolver modalidades terapêuticas voltadas ao equilíbrio da microbiota, prevenção de crises e infecções com consequente redução da frequência de uso de antimicrobianos (GRICE, 2014; HOFFMANN et al., 2014; KONG & SEGRE, 2012; LARSSON e LUCAS, 2015; MILLER et al, 2013).

3. Apresentações clínicas

A dermatite atópica canina é uma doença multifacetada em que os sinais clínicos são influenciados por um grande número de fatores, incluindo a genética do animal, o ambiente onde vive, tipo de alérgenos e irritantes envolvidos. As manifestações clínicas podem ser perenes ou sazonais, dependendo da região onde o animal habita. Em locais de clima tropical, onde há ocorrência de pólen durante todo o ano, por exemplo, os animais tendem a ter DA perene. Já em climas temperados, existe uma quantidade maior de DA sazonal, particularmente mais frequente nas épocas de primavera, verão e outono, quando ocorre a floração e polinização das plantas. A sazonalidade é dependente dos alérgenos aos quais o paciente foi exposto e sensibilizado. Frequentemente, observa-se sinais clínicos sazonais no começo no curso da doença e posterior progressão para a forma perene. Nos casos de DA induzida por alimentos, as manifestações clínicas tendem a ser perenes, já que mais comumente a reação se dá por alimentos presentes constantemente na dieta do paciente. Além disto, sabe-se que, animais muito predispostos que vivem em climas tropicais, tendem a manifestar a doença mais jovens, devido à alta exposição a alérgenos ambientais constantemente, como pólens (LARSSON e LUCAS, 2015; MILLER et al., 2013; WILHEM et al., 2011).

O prurido primário, ou *sine materia* é o principal sintoma da DA em humanos e em animais. O termo *sine materia* se refere ao fato de o prurido ser inicialmente alesional e ocorrer em áreas de pele visivelmente íntegra, sem que haja a necessidade de lesões primárias para que o sintoma aconteça. Este sinal dermatológico é típico de alergopatias e é, mais frequentemente, classificado como moderado a intenso pelos tutores do animal. Sendo assim, nas fases iniciais, ou agudas, da DA, é mais comum que o animal apresente apenas pele eritematosa associada, ou não, a lesões sugestivas de autotraumatismo por prurido intenso, como excoriações, alopécia e erosão. Com a cronificação do quadro, a tendência é o surgimento de feotriquia, hiperpigmentação, liquenificação, alopécia mais pronunciada e, em alguns casos, até a formação de cicatrizes e úlcerações por lambedura constante. Lesões como pápulas, pústulas e crostas melicéricas são comuns em todas as fases da doença e são frequentemente associadas a infecções bacterianas secundárias. Dermatite acral por lambedura e dermatite úmida aguda são também potenciais alterações secundárias da DA. O prurido gera trauma autoinduzido, alopécia, escoriações e ulcerações. As infecções secundárias ocasionam a formação de pústulas, crostas e descamação (LARSSON e LUCAS, 2015; MILLER et al., 2013; WILHEM et al., 2011).

Devido à importância do prurido como um sinal clínico da DA, a sua avaliação deve ser feita em toda a consulta veterinária, da resenha ao exame físico. Na anamnese, deve-se caracterizar o decurso (agudo, crônico), a periodicidade (sazonal ou perene) e as manifestações sintomáticas. Devem ser registrados todos os sintomas e sinais clínicos relacionados ao prurido, como por exemplo, mordiscamento, lambedura, avulsão pilar, alterações comportamentais, entre outros. O prurido em si deve ser caracterizado quanto à intensidade, distribuição e classificado através de escalas de gravidade. Existem diversas escalas recomendadas, mas a mais utilizada são a escala linear de 0 a 10, em que o tutor da uma nota ao prurido do animal baseado em sua intensidade, e a escala visual analógica de prurido, em que o tutor avalia o prurido do seu animal baseado nas apresentações clínicas descritas de forma gradual, ao longo que uma régua graduada de zero a 10 centímetros. Nas duas últimas, o tutor indica onde o seu animal se encontra nos gráficos, baseado na descrição de cada parte (LARSSON e LUCAS, 2015). A escala visual analógica de prurido, ou *pruritus visual analogue scale* (PVAS*),* foi validada em um estudo com 713 cães para o diagnóstico da DAC. Quando comparada à escala linear de 0 a 10, os autores observaram que os clientes eram muito influenciados pela presença de números, desta forma, melhores resultados foram alcançados com a escala validada por eles. Para mais informações sobre o estudo, recomenda-se a leitura do trabalho que a originou (RYBNÍČEK et al., 2009). As escalas de prurido devem ser utilizadas a cada visita para avaliar a evolução do diagnóstico e tratamento. Além de avaliar o grau de prurido, também recomenda-se avaliar o grau de gravidade das lesões dermatológicas. Para tal, foram desenvolvidos índices de gravidade, sendo o mais recentemente validado o CADESI IV (OLIVRYet al., 2014).

É importante lembrar também que uma das características mais marcantes da DA é a tendência ao desenvolvimento de otites alérgicas recorrentes com consequente infecção secundária por fungos e bactérias, que requerem atenção especial na manutenção destes animais. Ocasionalmente, pode haver apresentação de manifestações extra cutâneas, como conjuntivite (LOURENÇO-MARTINS et al., 2011), rinite, espirro reverso e distúrbios gastrointestinais. Entretanto, é muito incomum que tais sinais clínicos estejam presentes (LARSSON e LUCAS, 2015; MILLER et al., 2013; WILHEM et al*.,* 2011). Entretanto, é muito incomum que tais sinais clínicos estejam presentes. Além disto, pacientes atópicos tem maior tendência ao desenvolvimento de outras alergopatias, como dermatite alérgica a picada de pulgas (DAPP) e dermatite de contato alérgico (MILLER et al., 2013).

Para correta avaliação do prurido do animal, é necessário que se conheça as formas principais de manifestação deste sintoma por cães. Nesta espécie, o ato de lamber-se, mordiscar-se e friccionar o corpo contra objetos e anteparos apresentam as principais manifestações pruríticas. (LARSSON e LUCAS, 2015). E a distribuição das lesões concentra-se principalmente na região periocular, perilabial, intergital, axilar, abdominal, inguinal e perianal. Entretanto, quando da ocorrência de piodermite superficial, as lesões podem estar localizadas na região dorsal. Além disto, distribuição lesional associada à raça é bastante descrito e foi comprovado por Wilhem e colaboradores (WILHEM et al*.,* 2011).

É importante lembrar que as infecções secundárias são manifestações clínicas muito importantes de DA, sendo que, muitas vezes, é a queixa principal do tutor, ao menos no primeiro atendimento. As infecções mais comuns são as piodermites e otites causadas por *Staphylococcus pseudintermedius*, as micoses superficiais e otites causadas por *Malassezia* sp. Ambos os microrganismos são parte do microbioma cutâneo de cães saudáveis. Entretanto, animais atópicos apresentam grande tendência a supercrescimento na pele de cães com DA (MILLER *et al.*, 2013).

As principais alterações que ocorrem no tegumento de animais atópicos que favorecem esta disbiose com predomínio destas espécies de microrganismos são: a maior aderência de *S. pseudintermedius* nos queratinócitos, redução da produção de peptídeos antimicrobianos e ruptura da integridade da barreira cutânea por alterações estruturais e traumaticamente em decorrência do prurido. Sendo assim, o tratamento adequado da DA, com controle do prurido e prevenção de infecções secundárias é essencial para que este ciclo seja rompido (KOCH, 2015; SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016).

4. Diagnóstico

Até o presente momento, não exitem testes definitivos para diagnóstico da DA, bem como inexistem sinais clínicos patognomônicos desta enfermidade. Assim sendo, o diagnóstico deve ser baseado no histórico, sinais clínicos e exclusão de doenças pruriginosas de apresentação clínica semelhante. Recentemente, um subgrupo do *International Committee for Allergic Diseases in Animals* (ICADA) (http://icada.org), antiga *International Task Force on Canine Atopic Dermatitis* (ITFCAD), publicou no periódico BMC *Veterinary Research,* em acesso aberto, um protocolo para diagnóstico de DA baseado pesquisas extensivas na literatura científica disponível *online* e em anais de importantes congressos internacionais (HENSEL et al., 2015). Este protocolo visa padronizar e auxiliar médicos veterinários que atuam na clínica e pesquisadores no diagnóstico desta doença, que é, por muitas vezes, desafiador. As informações contidas adiante, na sessão de diagnóstico desta revisão, são baseadas neste trabalho científico, e serão apresentadas a seguir. Quando complementações forem realizadas, os devidos créditos serão dados a seus autores.

4.1 Diagnóstico diferencial e exclusão de doenças pruriginosas com manifestações clínicas semelhantes a DAC.

A exclusão de diagnósticos diferenciais de um cão que é apresentado ao clínico apresentando os sinais clínicos de DA, deve ser feita baseado no histórico, exame físico e exames complementares, quando necessários. As principais doenças que podem se confundir com DA são: dermatitopatias parasitárias, dermatite trofoalérgica, piodermite bacteriana e malasseziose cutânea. Para este diagnóstico de exclusão, o grupo propõe a realização dos passos um a quatro.

4.1.1 Exclusão de puliciose, dermatite alérgica à picada de pulgas e outros ectoparasitas

Apesar de os sinais clínicos de animais com DAPP serem variáveis, o padrão lesional mais comumente associado a esta doença encontra-se na região lombossacral, base da cauda e face caudal dos membros pélvicos. Ainda que a puliciose seja associada à visualização de pulgas, isto nem sempre é observado, pois, devido ao fato do ciclo biológico das pulgas concentrar-se em sua maioria, no ambiente, muitas vezes os parasitas não são visíveis e até mesmo o tutor nega a existência da infestação. Além disto, para animais alérgicos, não é necessário que haja intensa parasitose para que os sinais clínicos se manifestem. O profissional deve estar atento também a fato de que muitos cães com DA apresentam também hipersensibilidade à alérgenos de pulgas.

A prevalência de DAPP depende da região onde o animal vive. Sendo que áreas de clima tropical e subtropical podem apresentar infestação perene, em áreas temperadas tendem a ser sazonais e em regiões áridas, muito elevadas ou muito frias, praticamente inexistentes. Entretanto, a

possibilidade de viagens a locais endêmicos deve ser sempre investigada, mesmo em casos em que se considere inexistente a infestação.

Animais que apresentem lesões em locais não tipicamente afetados por DAPP, como por exemplo região interdigital e orelhas, muito provavelmente DAPP não é o único problema. O clínico deve sempre buscar pulgas e seus dejetos por exame direto, pelo teste de *Mackenzie,* e/ou uso do pente fino. Entretanto, para que a DAPP seja excluída quando da inexistência dos anteriores, diagnóstico terapêutico com controle adequado é requerido, lembrando-se sempre que nenhum anti-pulgas é completamente eficiente e que as pupas podem sobreviver até 174 dias no ambiente. Os autores recomendam o uso de pulicidas sistêmicos de ação rápida, por serem provavelmente mais efetivos e rápidos na redução do prurido. Todos os animais contactantes devem ser tratados da mesma forma.

É essencial que seja feita também a exclusão de outras doenças parasitárias, além da puliciose. As principais doenças a serem consideradas, devido ao quadro pruriginoso são: escabiose, otoacaríase, queiletielose, infestação por piolhos e trombiculíase. A demodiciose, apesar de não ser uma doença pruriginosa, pode ser encontrada a associada à piodermite bacteriana, assim o quadro geral apresentará prurido. Os exames necessários para exclusão de parasitoses cutâneas consistem em parasitológico de raspado cutâneo superficial e pronfundo, exame direto de cerúmen, tricograma e impressões por fita adesiva. Devido à grande dificuldade de se encontrar *Sarcoptes scabiei* nos exames parasitológicos de raspado cutâneo, ainda que o resultado dos mesmos seja negativo, recomenda-se a realização de diagnóstico terapêutico da doença a fim de eficiente exclusão. Os autores recomendam que isto seja feito, já que se sabe que este ácaro pode provocar reação cruzada com os ácaros da poeira doméstica nos testes alérgicos.

4.1.2 Diagnóstico e tratamento de infecções estafilocócicas ou levedúricas

Como já mencionado anteriormente nesta revisão, cães com DAC tem maior predisposição a infecções cutâneas secundárias por *S. pseudintermedius* e *Malassezia spp.* Quando as lesões sugestivas destas infecções estiverem presentes, recomenda-se a realização de exame citológico por decalque, impressões por fita adesiva e aspiração de pústulas íntegras. Em caso de evidenciação de infecções, é recomendado o tratamento apropriado das mesmas antes de prosseguir com o diagnóstico de DA, já que piodermites e malassezioses cutâneas podem ser pruriginosas quando primárias, além de intensificarem o quadro de DA e até mesmo atuarem como desencadeadoras de crise.

4.1.3 Exclusão de alérgenos alimentares

Reações adversas a alimentos podem ser causadas por dois mecanismos diferentes, um não imunomediado, que é a intolerância, e o outro uma hipersensibilidade mediada por IgE, que é a hipersensibilidade alimentar. Alérgenos alimentares podem causar hipersensibilidades com apresentação clínica indistinguível à DA, e também atuarem como causadores de crises alérgicas nestes animais. Desta forma, em todos os casos de DAC não sazonal a dermatite trofoalérgica deve ser excluída por dieta hipoalergênica restrita por, no mínimo, oito semanas. Os principais alérgenos alimentares em cães são: carne bovina, derivados lácteos, frango e trigo. A dieta de eliminação deve ser feita com proteínas a que o animal não tenha ainda sido exposto. Entretanto, a maioria das dietas comerciais possuem uma grande quantidade de ingredientes, dificultando a seleção de uma dieta apropriada. Apesar de as dietas com proteína hidrolisada serem uma boa

opção, a maioria é feita a base de soja ou frango, sendo assim, alguns animais alérgicos a estes componentes podem não responder positivamente. A dieta de eliminação pode ser feita com dieta comercial ou caseira, sendo os ingredientes mais indicados o coelho, canguru, cavalo, entre outros disponíveis na região. As dietas caseiras são as consideradas mais restritas e seguras, caso preparadas adequadamente. Sendo assim, caso o animal não responda à dieta comercial, recomenda-se novo teste com a dieta caseira. A resposta à dieta hipoalergênica de eliminação pode ser total, caso seja a única causa do quadro clínico (hipersensibilidade alimentar ou dermatite atópica induzida por alimentos), ou parcial, nos casos em que o alérgeno alimentar participa da patogenia da DA (dermatite atópica induzida por alimentos e alérgenos ambientais). Entretanto, a resposta positiva só pode se confirmada após a realização da reexposição à dieta anterior e observação de recidiva dos sinais clínicos. Para o sucesso da dieta de eliminação, é essencial a educação do tutor para que não sejam fornecidos petiscos e medicamentos não permitidos durante o período do diagnóstico.

4.2 Interpretação detalhada do histórico e manifestações clínicas a partir da aplicação dos critérios de Favrot *(*FAVROT et al., 2010*)*.

Favrot e colaboradores (2010), por meio de análise estatística complexa de uma grande quantidade de casos de DA, desenvolveram dois conjuntos de dados clínicos com correlação máxima com a doença (Quadro 2). Para mais informações sobre a metodologia e resultados do trabalho, recomenda-se ir diretamente ao artigo publicado pela equipe (FAVROT et al., 2010). No grupo 1, se foram preenchidos cinco dos oito critérios, a sensibilidade é de 85,4% e a especificidade é de 79,1%. No grupo 2, com cinco dos sete critérios, a sensibilidade é de 77,2% e a especificidade de 83%. Já se forem preenchidos seis critérios dos oito no grupo 1, a sensibilidade é reduzida a 58,2% e a especidade passa a 88,5%. Com os mesmo seis critérios em sete, no grupo 2, a sensibilidade é de 42% e a especificidade é de 93,7%. Favrot e colaboradores (2010) recomendam que, no contexto prático, seja usado o grupo 1, com cinco critérios positivos, para teste de triagem de DA.

Grupo 1	Grupo 2
1- Surgimento dos sinais clínicos até os três anos de idade	1- Surgimento dos sinais clínicos até os três anos de idade
2- Vida intradomiciliar (*indoor)*	2- Vida intradomiciliar (indoor)
3- Prurido responsivo a corticosteroides	3- Prurido alesional no início do quadro clínico
4- Infecções levedúricas crônicas e recorrentes	4- Podopatia bilateral dos membros torácicos
5- Podopatia bilateral dos membros torácicos	5- Pavilhão auricular afetado
6- Pavilhão auricular afetado	6- Margens dos pavilhões auriculares não afetadas
7- Margens dos pavilhões auriculares não afetadas	7- Área dorsolombar não afetada
8- Área dorsolombar não afetada	

Quadro 5: Critérios de Favrot. Os autores recomendam que seja usado o set 1, com cinco critérios positivos, para teste de triagem no contexto prático da clínica e dermatologia veterinária (FAVROT et al., 2010).

4.3 Avaliação da reatividade da pele por teste intradérmico ou sorológico, tradicionalmente referidos como testes alérgicos.

Os testes alérgicos devem ser feitos apenas quando o tutor tem o interesse de iniciar um protocolo de imunoterapia e não deve ser usado como método de triagem de DA, apenas como confirmatório. Ou seja, só se deve pensar em realizar estes testes quando o diagnóstico da doença já tiver concluído. Alérgenos alimentares não podem ser avaliados por testes alérgico, assim, não são recomendados para exclusão destes. Alguns dermatologistas utilizam os testes alérgicos para evidenciação dos alérgenos positivos com o intuito de eliminação ou redução do contato com os mesmos, mas isto apresenta pouco sucesso se usado como medida terapêutica única (HENSEL et al., 2015; MILLER et al., 2013). O teste alérgico pode ser realizado tanto pelo método intradérmico quando sorológico. Apesar de os dermatologistas frequentemente preferirem o teste intradérmico, o sorológico tem as suas vantagens, tais como: não requer sedação, menos traumático por não exigir repetidas injeções, não requer tricotomia, requer menor tempo para realização e apresenta menor interferência de drogas em suas reações. Entretanto, o teste sorológico mensura apenas IgE circulante, não levando em conta outros mecanismos patogênicos da doença e tem maior probabilidade de resultados positivos em animais não atópicos. Ambos os testes estão ainda despadronizados e suspeita-se de que isto possa estar causando resultados falso-positivos e falso-negativos. Além disto, a ALD apresenta quadro clínico indistinguivel da DA, mas não é possível se evidenciar reações IgE positivas tanto no teste intradérmico, quanto no sorológico. Entretanto, a realização destes testes é um requisito para a diferenciação entre DA e ALD, embora não haja diferenças significativas na terapia das duas doenças, apenas que não se pode realizar imunoterapia nos casos de DAL, por razões óbvias. Apesar das falhas de cada teste, os resultados de imunoterapia não é significativamente diferente se baseada em um ou em outro, a taxa de sucesso é a mesma. Cuidado deve ser tomado quanto às drogas utilizadas pelo paciente no momento do teste e o tempo necessário de suspensão das mesmas previamente ao procedimento. As principais drogas que causam alterações nos testes intradérmico e sorológico e o tempo necessário de descontinuação prévia estão sintetizados no Quadro 3 (HENSEL et al., 2015).

Droga	Tempo/Intradérmico	Tempo/Sorológico
Antihistamínicos	Sete dias	Provavelmente não interfere
Glicocorticoides orais de curta duração	14 dias	Não interfere
Glicocorticoides injetáveis de longa duração	Mínimo de 28 dias	Mínimo de 28 dias
Glicocorticoides tópicos	14 dias	Não interfere
Ciclosporina	Não interfere	Não interfere
Oclacitinib	Provavelmente não interfere	Provavelmente não interfere

Quadro 6: Principais drogas usadas no tratamento da DAC, sua interferência com os testes alérgicos e o tempo necessário de interrupção prévia ao procedimento (HENSEL et al., 2015).

5. Tratamento

A conscientização e educação do cliente são essenciais para o seu comprometimento com a terapia e consequente sucesso. Eles devem sempre ser alertados quanto a natureza crônica e incurável da

doença, quanto ao alto custo do também laborioso tratamento de manutenção. Os pacientes podem ser bem controlados para que haja minimização dos sinais clínicos e melhoria da qualidade de vida. Entretanto, a condição nunca poderá ser curada, recorrências e complicações são esperadas e o resultado do tratamento depende em grande parte de seu nível de comprometimento. É frequente a frustração dos clientes tanto com o alto custo quanto com a dificuldade do controle adequado. Desta forma, é essencial que haja uma boa relação entre o médico veterinário e o tutor do animal para minimizar as dificuldades de uma doença já bastante complicada (MILLER et al*.,* 2013). Assim como para o diagnóstico, ICADA também publicou recentemente as diretrizes para o tratamento da DA, em atualização ao primeiro artigo de diretrizes para a doença, publicado em 2010, ambos baseados em evidências. Sendo assim, as informações contidas nesta parte de tratamento serão baseadas no que está sendo recomendado por ICADA e, quando complementações forem necessárias, os devidos créditos serão acrescentados. Por algumas vezes, ICADA recomenda o uso de determinadas formulações comerciais, já que os estudos realizados e baseados em evidências foram feitos com os mesmos e não há dados publicados sobre outras formulações, nestes casos, estes produtos serão mencionados. Isto não significa que produtos similares não possam funcionar. Em situações diferentes, os autores fizeram menção ao princípio ativo (OLIVRY, et al*.*, 2015). Para mais informações a respeito das drogas recomendadas, seus mecanismos de ação e possíveis efeitos colaterais, recomenda-se a consulta de compêndio de drogas para uso dermatológico (KOCH et al., 2012).

5.1 Eliminação e redução do contato com alérgenos

A eliminação ou redução do contato com alérgenos é indicada quando possível. Lamentavelmente, isto é muito difícil em se tratando de pólens. Banhos frequentes podem reduzir a penetração percutânea destes. Para evitar o contato com ácaros, recomenda-se cobrir a cama do animal com capas anti-ácaros e lavar semanalmente com água fervente, reduzir a exposição a tapetes, utilizar aspirador de pó com frequência e utilizar ar condicionado para reduzir a temperatura e umidade ambiental. Estas medidas podem reduzir consideravelmente a concentração de ácaro intradomiciliar e são consideradas bastante úteis. No caso de gramíneas e outras plantas, o contato do cão com estes vegetais deve ser evitado pela retirada dos mesmos do local onde vive. Estas recomendações são utilizadas tanto para controle de fase aguda e crônica da DA (MILLER et al*.,* 2013; OLIVRY, et al*.*, 2015).

5.2 Tratamento da fase aguda da dermatite atópica

Para o tratamento de DA em fase aguda e crises, ICADA recomenda três abordagens principais: o tratamento de infecções secundárias (otites, piodermites e malasseziose cutânea), banhos frequentes com xampu não irritante, uso de corticosteroides por via tópica e tratamento com giclocorticóides ou oclacitinib por via oral.

Em relação aos banhos, é recomendado o uso de xampus emolientes contendo lipídeos, açúcares complexos e antissépticos, visto que estes ativos promovem um alívio modesto na intensidade do prurido. Provavelmente a frequência dos banhos seja o fator mais importante para estes resultados, já que auxilia na remoção dos alérgenos da pele e pelos e na recomposição da barreira epidérmica. ICADA observou boas evidência especificamente com o uso dos xampus Allermyl® (Virbac) e Douxo Calm® (Ceva). A frequência dos banhos deve ser, no mínimo, semanal. Em casos graves, pode ser feito até mesmo diariamente com água fria e produtos a base de aveia coloidal. (MILLER et al., 2013). É interessante também o uso de produtos sem enxague ou

xampus com componentes que aumentam o efeito residual e prolongam o tempo de ação dos ativos, como por exemplo quitosan e o complexo *Spherulites*® (Virbac)

Glicocorticoides tópicos em *spray* como o Cortavance® (Virbac) e Genesis® (Virbac) são eficazes para o tratamento localizado de crises da DA. Outras formulações teoricamente também podem benéficas, mas a segurança e a eficiência dependerão da potência do glicocorticóide presente na formulação. Corticosteróides tópicos são indicados para lesões localizadas, principalmente, e em curto espaço de tempo, para que sinais adversos como atrofia cutânea não ocorram. A duração do tratamento e a frequência devem ser baseados em cada caso e, teoricamente, deve ser interrompido após a melhora da crise.

Considerando os medicamentos de uso oral para alívio rápido do prurido e inflamação as drogas recomendadas são os glicocorticoides, o oclacitinib e o lokivetmab. Este último não está incluso no consenso de Hensel e colaboradores porque não havia sido lançado ainda no momento do seu lançamento. Entretanto, o produto (Cytopoint®) apresenta boa eficácia no controle agudo do prurido (MICHELS et al., 2016; MOYAERT et al., 2017). Dentre os glicocorticoides, os de escolha são a prednisona, prenisolona ou metilprednisolona na dose de 0,5 a 1,0 mg/kg a cada 12 ou 24 horas. Glicocorticóides de depósito não são recomendados. Já o oclacitinb (Apoquel®, Zoetis) pode ser prescrito na dose de 0,4 a 0,6 mg/kg, a cada 12 horas, por até 14 dias e apresenta redução rápida na redução do prurido grave. O uso concomitante de glicocorticóides e oclacitinib não é recomendado por risco potencial de desenvolvimento de imunossupressão.

O lokivetmab (Cytopoint®, Zoetis) é uma forma terapêutica que foi lançada pela Zoetis nos Estados Unidos da América no final do ano de 2015, com primeiro acesso apenas para dermatologistas certificados. Este medicamento consiste em um anticorpo monoclonal caninizado que neutraliza seletivamente a IL-31, citocina responsável por transmitir o sinal de prurido para o sistema nervoso central. A sua forma de aplicação é por via subcutânea, uma vez ao mês, na dose de 1-2 mg/kg. O medicamento pode ser usado tanto nas fases agudas como crônicas da doença, já que demonstrou redução do prurido em 24 horas em 80% dos cães (MICHELS et al., 2016; MOYAERT et al., 2017). Em um estudo financiado pela Zoetis, Moyaert e colaboradores compararam a eficácia de lokivetmab com a ciclosporina e não observaram diferenças na capacidade de redução do prurido dos dois fármacos (51,90% *versus* 43,72%, respectivamente) e não foram observados efeitos colaterais relacionados ao lokivetmab durante seis meses de avaliação (MOYAERT et al., 2017). Esta droga ainda não está disponível no mercado brasileiro. De acordo com as recomendações do fabricante, disponíveis em seu endereço eletrônico, o medicamento é muito seguro e não são observadas interações medicamentosas com drogas conhecidas (https://www.zoetisus.com/products/dogs/cytopoint/safety_othermedications.aspx).

Em pacientes antes bem controlados que apresentarem crises e o protocolo anterior de tratamento não estiver funcionando adequadamente como anteriormente, é recomendada a repetição da dieta hipoalergênica de exclusão, pois como alérgenos alimentares podem provocar crises em pacientes com DA, pode ter ocorrido sensibilização aos mesmos. O controle do prurido em animais com hipersensibilidade alimentar ou DA induzida por alimentos com corticosteróides é pobre.

5.3 Tratamento da dermatite atópica de forma crônica

No manejo dos pacientes atópicos a longo prazo, ou seja, na doença crônica, os autores recomendam que a abordagem terapêutica seja multimodal e baseada nos seguintes pilares:

banhos frequentes, aplicação de formulações tópicas contendo ácidos graxos e ceramidas, suplementação com ácidos graxos essenciais e o uso de imunomoduladores por via tópica e oral.

Os benefícios dos banhos são os mesmos mencionados para o controle da fase aguda. O tipo do xampu deve ser escolhido de acordo com o caso. Na grande maioria das vezes, os xampus emolientes são os mais indicados. Entretanto, no caso de distúrbios de queratinização ou infecções secundárias frequentes, por exemplo, melhor controle pode ser alcançado caso seja selecionado um produto com ação nestes problemas.

Administração por via oral de produtos contendo principalmente ômega-3 e ômega-6 ou até mesmo dietas enriquecidas podem auxiliar na recomposição da barreira epidérmica, aumentar o brilho e a qualidade dos pelos. Além disto, ácidos graxos essenciais possuem ação anti-inflamatória discreta e podem auxiliar no controle do prurido. Entretanto, o resultado é muito limitado, não sendo esta medida recomendada em monoterapia para a DA, apenas como adjuvante. Até o momento, não existem evidências de dose e proporção de ômega-3/ômega-6 mais indicadas no controle da DA. Os benefícios da suplementação de ácidos graxos essenciais em cães com DA provavelmente só são passíveis de avaliação após dois meses de uso contínuo.

Formulações tópicas contendo ceramidas, colesterol e ácidos graxos essenciais podem auxiliar na normalização na composição lipídica da matriz extracelular do estrato córneo de cães com DA. Entretanto, evidências que suportem esta hipótese ainda são necessárias para comprová-la. Como monoterapia para DA, a aplicação destas formulações não é indicada, mas como adjuvante, os resultados podem ser promissores. Acredita-se que o uso concomitante de lipídeos tópicos com a suplementação oral dos mesmos não melhora significativamente a recomposição da barreira epidérmica que a utilização de uma forma ou outra isoladamente. Assim, o efeito da suplementação tópica na normalização dos lipídeos do estrato córneo é provavelmente mínimo em animais já suplementados por via oral.

Existem evidências de que o uso de glicocorticóides por via tópica apresenta alta eficácia, entretanto, há também o risco de atrofia cutânea secundária. Recomenda-se então a aplicação intermitente, após um período de indução feito diariamente. Tacrolimus por via tópica apresenta resultados semelhantes aos glicocorticóides, sem o inconveniente de causar atrofia cutânea. Entretanto, é uma droga que apresenta alto custo.

As principais drogas imunomoduladoras utilizadas para o tratamento crônico de DA são a prednisona, prednisolona, metilprednisolona, ciclosporina, oclacitinib e lokivetmab, pois são eficazes no tratamento de DA crônica, para manutenção. Glicocorticóides e oclacitinib possuem efeito mais rápido que a ciclosporina, que leva em média quatro a seis semanas para que o controle seja alcançado. Entretanto, prednisolona e o oclacitinib (PANTERI et al., 2016) pode ser associada à ciclosporina nas primeiras três semanas para acelerar a melhora clínica, com segurança. A associação prolongada destas drogas não é recomendada pelo maior risco de imunossupressão. Os glicocorticóides devem ser administrados em um intervalo e dose de 0,5 – 1,0 mg/kg a cada 12 ou 24 horas até remissão dos sinais, depois deve ser reduzida gradualmente até se alcançar a menor possível para manter a remissão dos sinais clínicos. Ciclosporina deve ser administrada intervalo e dose de 5 mg/kg, a cada 24 horas, por quatro a seis semanas. Após este período, a dose deve ser reduzida e a frequência aumentada o máximo possível para manter a remissão dos sinais clínicos. Oclacitinib (Apoquel®, Zoetis) deve ser administrado a 0,4 - 0,6 mg/kg a cada 12 horas, por 14 dias. Depois, a manutenção deve ser feita com administrações a cada 24 horas. O uso de concomitante de xampus emolientes, suplementação de ácidos graxos

essenciais e antihistamínicos podem auxiliar na redução da dose destes medicamentos imunossupressores e também auxiliar no melhor controle clínico, por potencialização dos efeitos. O lokivetmab (Cytopoint®, Zoetis) também pode ser usado para o controle da DA a longo prazo, na dose de 1-2 mg/kg, por via subcutânea, a cada quatro a oito semanas (MICHELS et al., 2016; MOYAERT et al., 2017)

Em animais que estejam fazendo uso contínuo de imunomoduladores por via oral, devem ser requeridos exames complementares para avaliação das funções hepática, renal, glicemia e urinálise/urocultura, em uma frequência mínima de duas vezes ao ano, para monitorar possíveis efeitos colaterais.

Apesar da ausência de evidências que comprovem a eficácia do uso de antihistamínicos em monoterapia e para controle da fase aguda da DA, estas drogas podem ser benéficas em associação com outras e na prevenção de crises, para reduzir a liberação de histamina, pois, em cães, os benefícios são mínimos após a liberação deste mediador, pois não é tão relevante à patogenia da doença.

O termo imunoterapia refere-se à administração de uma mistura de alérgenos, por via subcutânea ou sublingual, em doses gradualmente crescentes. Os mecanismos de ação não são completamente elucidados, mas aparentemente ocorre uma modulação da resposta imune de T_H2 dominante, para T_H1 dominante. Alguns estudos têm mostrado também a ativação de resposta T*reg*. O objetivo final da imunoterapia é promover tolerância aos alérgenos. A resposta da terapia é variável individualmente, mas acredita-se que o sucesso é observado em média em 60% dos pacientes. O tempo para que isso ocorra também é variável e pode levar de quatro meses a um ano para que os primeiros sinais de melhora sejam observados. Existe uma grande variedade de protocolos utilizados, mas o mais frequentemente utilizado é a administração de doses crescentes a cada três dias nos primeiros 45 dias, depois manter em dose de manutenção a cada 21 dias (MILLER et al., 2013). Os membros da ICADA acreditam que a imunoterapia alérgeno-específica seja um modo eficiente e seguro de redução dos sinais clínicos da DA e deve ser encorajada.

7. Referências

A. NØDTVEDT; A. EGENVALL; K. BERGVAL; Å HEDHAMMAR. Incidence of and risk factors for atopic dermatitis in a Swedish popuplation of insured dogs. **Veterinary Record**, v. 159, p. 241–246, 2006.

ASAHINA, R.; MAEDA, S. A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 16-e5, 2017.

BARROS ROQUE, J.; O'LEARY, C. A.; KYAW-TANNER, M.; LATTER, M.; MASON, K.; SHIPSTONE, M.; VOGELNEST, L.; DUFFY, D. L. Haplotype sharing excludes canine orthologous Filaggrin locus in atopy in West Highland White Terriers. **Animal Genetics**, v. 40, n. 5, p. 793–794, out. 2009.

BEXLEY, J.; NUTTALL, T. J.; HAMMERBERG, B.; HALLIWELL, R. E. Co-sensitization

and cross-reactivity between related and unrelated food allergens in dogs – a serological study. **Veterinary Dermatology**, v. 28, n. 1, p. 31-e7, 2017.

BIZIKOVA, P.; PUCHEU-HASTON, C. M.; EISENSCHENK, M. N. C.; MARSELLA, R.; NUTTALL, T.; SANTORO, D. Review: Role of genetics and the environment in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 26. p. 79-83, 2015.

BRENNINKMEIJER, E. E. A.; SPULS, P. I.; LEGIERSE, C. M.; LINDEBOOM, R.; SMITT, J. H. S.; BOS, J. D. Clinical differences between atopic and atopiform dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 3, p. 407–414, 2008.

CHERVET, L.; GALICHET, A.; MCLEAN, W. H. I.; CHEN, H.; SUTER, M. M.; ROOSJE, P. J.; MÜLLER, E. J. Missing C-terminal filaggrin expression, NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. **Experimental Dermatology**, v. 19, n. 8, p. 343–346, 2010.

CHOI, S. J.; SONG, M. G.; SUNG, W. T.; LEE, D. Y.; LEE, J. H.; LEE, E. S.; YANG, J. M. Comparison of Transepidermal Water Loss, Capacitance and pH Values in the Skin between Intrinsic and Extrinsic Atopic Dermatitis Patients. **Journal of Korean Medical Science**, v. 18, n. 1, p. 93–96, 2003.

DECKERS, I. A. G.; MCLEAN, S.; LINSSEN, S.; MOMMERS, M.; VAN SCHAYCK, C. P.; SHEIKH, A. Investigating International Time Trends in the Incidence and Prevalence of Atopic Eczema 1990–2010: A Systematic Review of Epidemiological Studies. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e39803, 2012.

ELIAS, P. M.; SCHMUTH, M. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. . v. 42, n. 2, p. 157–162, 2008.

FOLSTER-HOLST, R.; PAPE, M.; BUSS, Y. L.; CHRISTOPHERS, E.; WEICHENTHAL, M. Low prevalence of the intrinsic form of atopic dermatitis among adult patients. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 61, n. 5, p. 629–632, 2006.

FANTON, N.; SANTORO, D.; CORNEGLIANI, L.; MARSELLA, R. Increased filaggrin-metabolizing enzyme activity in atopic skin: A pilot study using a canine model of atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, n. January, 2017.

FAVROT, C.; STEFFAN, J.; SEEWALD, W.; PICCO, F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 1, p. 23–31, 2010.

GEORAS, S. N.; CHEADLE, C.; BERGER, A. E. Tight Junction Defects in Atopic Dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 127, n. 3, p. 773–786, 2012.

GRICE, E. a. The skin microbiome: potential for novel diagnostic and therapeutic approaches to cutaneous disease. **Seminars in cutaneous medicine and surgery**, v. 33, n. 2, p. 98–103, 2014.

GUPTA, J.; GRUBE, E.; ERICKSEN, M. B.; STEVENSON, M. D.; LUCKY, A. W.; SHETH, A. P.; ASSA'AD, A. H.; KHURANA HERSHEY, G. K. Intrinsically defective skin barrier function in children with atopic dermatitis correlates with disease severity. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 121, n. 3, p. 725–730.e2, mar. 2008.

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

HE, R.; OYOSHI, M. K.; GARIBYAN, L.; KUMAR, L.; ZIEGLER, S. F.; GEHA, R. S. TSLP acts on infiltrating effector T cells to drive allergic skin inflammation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 33, p. 11875–11880, 2008.

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

HIGHTOWER, K.; MARSELLA, R.; FLYNN-LURIE, A. Effects of age and allergen exposure on transepidermal water loss in a house dust mite-sensitized beagle model of atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 1, p. 89–96, 2010.

HIJNEN, D. J.; DE BRUIN-WELLER, M.; OOSTING, B.; LEBRE, C.; DE JONG, E.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.; KNOL, E. Serum thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) levels in allergic diseases: TARC and CTACK are disease-specific markers for atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 2, p. 334–340, 2004.

HILL, P. B.; DEBOER, D. J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): Environmental allergens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, n. 3–4, p. 169–186, 2001.

HILLIER, A.; GRIFFIN, C. E. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): Incidence and prevalence. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, n. 3–4, p. 147–151, 2001.

HOFFMANN, A. R.; PATTERSON, A. P.; DIESEL, A.; LAWHON, S. D.; LY, H. J.; STEPHENSON, C. E.; MANSELL, J.; STEINER, J. M.; DOWD, S. E.; OLIVRY, T.; SUCHODOLSKI, J. S. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

IIO, A.; MOTOHASHI, T.; KUNISADA, T.; YASUHIRA, Y.; KAMISHINA, H.; MAEDA, S. Preferential gene transcription of T helper 2 cytokines in peripheral CCR4+CD4+ lymphocytes in dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 3, p. 199–204, 2014.

INMAN, A. O.; OLIVRY, T.; DUNSTON, S. M.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; GATTO, H. Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids in normal and atopic dogs. **Veterinary pathology**, v. 38, n. 6, p. 720–3, nov. 2001.

.

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

JAHNZ-ROZYK, K.; TARGOWSKI, T.; PALUCHOWSKA, E.; OWCZAREK, W.; KUCHARCZYK, A. Serum thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine and eotaxin as markers of severity of atopic dermatitis. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 60, n. 5, p. 685–688, 2005.

KAKINUMA, T.; NAKAMURA, K.; WAKUGAWA, M.; MITSUI, H.; TADA, Y.; SAEKI, H.; TORII, H.; ASAHINA, A.; ONAI, N.; MATSUSHIMA, K.; TAMAKI, K. Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: Serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 107, n. 3, p. 535–541, 2001.

KIM, H.-J.; CRONIN, M.; AHRENS, K.; PAPASTAVROS, V.; SANTORO, D.; MARSELLA, R. A comparative study of epidermal tight junction proteins in a dog model of atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 40-e11, 2016.

KARIMKHANI, C.; SILVERBERG, J. I.; DELLAVALLE, R. P. Defining intrinsic vs. extrinsic atopic dermatitis. **Dermatology Online Journal**, v. 21, n. 6, p. 4–8, 2015.

KLUKOWSKA-RÖTZLER, J.; CHERVET, L.; MÜLLER, E. J.; ROOSJE, P.; MARTI, E.; JANDA, J. Expression of thymic stromal lymphopoietin in canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, 2013.

KOCH, S. What is new in the diagnosis and management of canine atopic dermatitis? **Today's veterinary practice**, n. May/Jun 2015, p. 95–102, 2015.

KOCH, S.; TORRES, S. M. F.; PLUMB, D. D. **Canine and Feline Dermatology Handbook**. Willey-Blackwell, 2012.

KONG, H. H.; SEGRE, J. a. Skin Microbiome: Looking Back to Move Forward. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 933–939, 2012.

KULTHANAN, K.; BOOCHANGKOOL, K.; TUCHINDA, P.; CHULAROJANAMONTRI, L. Clinical features of the extrinsic and intrinsic types of adult-onset atopic dermatitis. **Asia Pacific Allergy**, v. 1, n. 2, p. 80, 2011.

LANCTO, C. A.; TORRES, S. M. F.; HENDRICKSON, J. A.; MARTINS, K. V.; RUTHERFORD, M. S. Altered expression of antimicrobial peptide genes in the skin of dogs with atopic dermatitis and other inflammatory skin conditions. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 4. p.414-420. 2013.

LARSSON, C. E.; LUCAS, R. **Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária**. 1. ed. São Caetano do Sul: Interbook, 2015.

LAUBER, B.; MOLITOR, V.; MEURY, S.; DOHERR, M. G.; FAVROT, C.; TENGVALL, K.; BERGVALL, K.; LEEB, T.; ROOSJE, P.; MARTI, E. Total IgE and allergen-specific IgE and IgG antibody levels in sera of atopic dermatitis affected and non-affected Labrador- and Golden retrievers. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 149, n. 1–2, p. 112–8, 15 set. 2012.

LEUNG, D. Y. M.; BIEBER, T. Atopic dermatitis. **Lancet**, v. 361, n. 9352, p. 151–160, 2003.

LEUNG, T. F.; WONG, C. K.; CHAN, I. H. S.; IP, W. K.; LAM, C. W. K.; WONG, G. W. K. Plasma concentration of thymus and activation-regulated chemokine is elevated in childhood asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 3, p. 404–409, 2002.

LIAN, T. M.; HALLIWELL, R. E. Allergen-specific IgE and IgGd antibodies in atopic and normal dogs. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 66, n. 3–4, p. 203–23, 11 dez. 1998.

LOURENÇO-MARTINS, A. M.; DELGADO, E.; NETO, I.; PELETEIRO, M. C.; MORAIS-ALMEIDA, M.; CORREIA, J. H. D. Allergic conjunctivitis and conjunctival provocation tests in atopic dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 14, n. 4, p. 248–256, 2011.

MAEDA, S.; MAEDA, S.; OHNO, K.; KAJI, N.; HORI, M.; FUJINO, Y.; TSUJIMOTO, H. Protease-activated receptor-2 induces proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in canine keratinocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 153, n. 1–2, p. 17–25, 2013.

MAEDA, S.; TSUKUI, T.; SAZE, K. I.; MASUDA, K.; OHNO, K.; TSUJIMOTO, H.; IWABUCHI, S. Production of a monoclonal antibody to canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and detection of TARC in lesional skin from dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, n. 1–2, p. 83–92, 2005.

MARSELLA, R. Does filaggrin expression correlate with severity of clinical signs in dogs with atopic dermatitis? **Veterinary dermatology**, v. 24, n. 2, p. 266-e59, abr. 2013.

MARSELLA, R.; OLIVRY, T.; CARLOTTI, D.-N. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 22, n. 3, p. 239–248, 2011.

MARSELLA, R.; SAMUELSON, D.; DOERR, K. Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. **Veterinary dermatology**, v. 21, n. 1, p. 81–8, fev. 2010.

MCCANDLESS, E. E.; RUGG, C. a.; FICI, G. J.; MESSAMORE, J. E.; ALEO, M. M.; GONZALES, A. J. Allergen-induced production of IL-31 by canine Th2 cells and identification of immune, skin, and neuronal target cells. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 157, n. 1–2, p. 42–48, 2014.

MEURY, S.; MOLITOR, V.; DOHERR, M. G.; ROOSJE, P.; LEEB, T.; HOBI, S.; WILHELM, S.; FAVROT, C. Role of the environment in the development of canine atopic dermatitis in Labrador and golden retrievers. **Veterinary Dermatology**, v. 22, n. 4, p. 327–334, 2011.

MICHELS, G. M.; RAMSEY, D. S.; WALSH, K. F.; MARTINON, O. M.; MAHABIR, S. P.; HOEVERS, J. D.; WALTERS, R. R.; DUNHAM, S. A. A blinded, randomized, placebo-controlled, dose determination trial of lokivetmab (ZTS-00103289), a caninized, anti-canine IL-31 monoclonal antibody in client owned dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 27, n. 6, p. 478-e129, 2016.

MILLER, A. M. Role of IL-33 in inflammation and disease. **Journal of Inflammation**, v. 8, n. 1, p. 22, 2011.

MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K. L. **Small Animal Dermatology**. [s.l.] Elsevier, 2013.

MORITA, A.; KIKUOKA, S.; HORIKAWA, T.; BITO, T.; YAMADA, H.; KANDA, M.; SASAKURA, K.; TAMAKI, M.; HIRAI, K.; SUZUKI, R.; SUGITA, K. Evaluation of human thymus and activation-regulated chemokine concentrations in blood using a new sandwich ELISA based on monoclonal antibodies. **Clinica Chimica Acta**, v. 322, n. 1–2, p. 67–75, 2002.

MOSER, M.; LEO, O. Key concepts in immunology. **Vaccine**, v. 28, n. SUPPL. 3, p. 2–13, 2010.

MOYAERT, H.; VAN BRUSSEL, L.; BOROWSKI, S.; ESCALADA, M.; MAHABIR, S. P.; WALTERS, R. R.; STEGEMANN, M. R. A blinded, randomized clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to ciclosporin in client-owned dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, p. 1–13, 2017.

MUELLER, R. S.; OLIVRY, T.; PRÉLAUD, P. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (2): common food allergen sources in dogs and cats. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 9, 2016.

MULLIN, J.; CARTER, S.; WILLIAMS, N.; MCEWAN, N.; NUTTALL, T. Transcription of canine toll-like receptor 2, ??-defensin 1 and ??-defensin 103 in infected atopic skin, non-infected atopic skin, healthy skin and the CPEK cell line. **Veterinary Microbiology**, v. 162, n. 2–4, p. 700–706, 2013.

NOVAK, N.; BIEBER, T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 2, p. 252–262, 2003.

NOVEMBRE, E.; CIANFERONI, a; LOMBARDI, E.; BERNARDINI, R.; PUCCI, N.; VIERUCCI, a. Natural history of "intrinsic" atopic dermatitis. **Allergy**, v. 56, n. 5, p. 452–453, 2001.

OLIVRY, T. Is the skin barrier abnormal in dogs with atopic dermatitis? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 144, n. 1–2, p. 11–16, nov. 2011.

OLIVRY, Thierry et al. Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 77-e25, 2014.

OLIVRY, T.; DEBOER, D. J.; FAVROT, C.; JACKSON, H. a.; MUELLER, R. S.; NUTTALL,

T.; PRÉLAUD, P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 210, 2015.

OLIVRY, T.; DEBOER, D. J.; PRÉLAUD, P.; BENSIGNOR, E. Food for thought: pondering the relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. **Veterinary Dermatology**, v. 18, n. 6, p. 390–391, 2007.

OLIVRY, T.; HILL, P. B. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IX): The controversy surrounding the route of allergen challenge in canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, n. 3–4, p. 219–225, 2001.

OLIVRY, T.; MOORE, P. F.; AFFOLTER, V. K.; NAYDAN, D. K. Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. **Archives of dermatological research**, v. 288, n. 10, p. 579–85, set. 1996.

OLIVRY, T.; WOFFORD, J.; PAPS, J. S.; DUNSTON, S. M. Stratum corneum removal facilitates experimental sensitization to mite allergens in atopic dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 22, n. 2, p. 188–196, 2011.

OSAWA, R.; AKIYAMA, M.; SHIMIZU, H. Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders. **Allergol.Int.**, v. 60, n. 1440–1592 (Electronic), p. 1–9, 2011.

OTSUKA, A.; NOMURA, T.; RERKNIMITR, P.; SEIDEL, J. A.; HONDA, T.; KABASHIMA, K. The interplay between genetic and environmental factors in the pathogenesis of atopic dermatitis. **Immunological Reviews**, v. 278, n. 1, p. 246–262, 2017.

OTT, H.; STANZEL, S.; OCKLENBURG, C.; MERK, H. F.; BARON, J. M.; LEHMANN, S. Total serum IgE as a parameter to differentiate between intrinsic and extrinsic atopic dermatitis in children. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 89, n. 3, p. 257–261, 2009.

OTT, H.; WILKE, J.; BARON, J. M.; HÖGER, P. H.; FÖLSTER-HOLST, R. Soluble immune receptor serum levels are associated with age, but not with clinical phenotype or disease severity in childhood atopic dermatitis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV**, v. 24, n. 4, p. 395–402, 2010.

PALMER, C. N. A.; IRVINE, A. D.; TERRON-KWIATKOWSKI, A. et al. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. **Nature Genetics**, v. 38, n. 4, p. 441–446, 2006.

PANTERI, A.; STREHLAU, G.; HELBIG, R.; PROST, C.; DOUCETTE, K. Repeated oral dose tolerance in dogs treated concomitantly with ciclosporin and oclacitinib for three weeks. **Veterinary Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 22-e7, 2016.

PIEKUTOWSKA, a.; PIN, D.; RÈME, C. a.; GATTO, H.; HAFTEK, M. Effects of a Topically Applied Preparation of Epidermal Lipids on the Stratum Corneum Barrier of Atopic Dogs. **Journal of Comparative Pathology**, v. 138, n. 4, p. 197–203, 2008.

PLAGER, D. A.; TORRES, S. M. F.; KOCH, S. N.; KITA, H. Gene transcription abnormalities in canine atopic dermatitis and related human eosinophilic allergic diseases. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 149, n. 1–2, p. 136–142, 2012.

PÓNYAI, G.; HIDVÉGI, B.; NÉMETH, I.; SAS, A.; TEMESVÁRI, E.; KÁRPÁTI, S. Contact and aeroallergens in adulthood atopic dermatitis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 22, n. 11, p. 1346–1355, 2008.

POPA, I.; REMOUE, N.; HOANG, L. T.; PIN, D.; GATTO, H.; HAFTEK, M.; PORTOUKALIAN, J. Atopic dermatitis in dogs is associated with a high heterogeneity in the distribution of protein-bound lipids within the stratum corneum. **Archives of dermatological research**, v. 303, n. 6, p. 433–40, ago. 2011.

PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J.-M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, n. 12, p. 1063–1072, 2008.

PUCHEU-HASTON, C. M. Atopic dermatitis in the domestic dog. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 2, p. 299–303, 2016.

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

PUCHEU-HASTON, C. M.; BIZIKOVA, P.; MARSELLA, R.; SANTORO, D.; NUTTALL, T.; EISENSCHENK, M. N. C. Review: Lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1-T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 26, n. 2, p. 124-e32, 2015b.

REITER, L. V.; TORRES, S. M. F.; WERTZ, P. W. Characterization and quantification of ceramides in the nonlesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared with controls. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 4, p. 260–266, 2009.

ROQUE, J. B.; O'LEARY, C. A.; KYAW-TANNER, M.; LATTER, M.; MASON, K.;

SHIPSTONE, M.; VOGELNEST, L.; DUFFY, D. High allergen-specific serum immunoglobulin E levels in nonatopic West Highland white terriers. **Veterinary dermatology**, v. 22, n. 3, p. 257–66, jun. 2011.

ROQUE, J. B.; O'LEARY, C. a; KYAW-TANNER, M.; DUFFY, D. L.; SHIPSTONE, M. Real-time PCR quantification of the canine filaggrin orthologue in the skin of atopic and non-atopic dogs: a pilot study. **BMC research notes**, v. 4, n. 1, p. 554, 2011b.

ROUSSEL, A. J. J.; BRUET, V.; MARSELLA, R.; KNOL, A. C.; BOURDEAU, P. J. Tight junction proteins in the canine epidermis: A pilot study on their distribution in normal and in high IgE-producing canines. **Article The Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 4679, p. 46–51, 2015.

RYBNÍČEK, J.; LAU-GILLARD, P. J.; HARVEY, R.; HILL, P. B. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 115–122, 2009.

SANO, Y.; MASUDA, K.; TAMAGAWA-MINEOKA, R.; MATSUNAKA, H.; MURAKAMI, Y.; YAMASHITA, R.; MORITA, E.; KATOH, N. Thymic stromal lymphopoietin expression is increased in the horny layer of patients with atopic dermatitis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 171, n. 3, p. 330–337, 2013.

SANTORO, D. **29th Proceedings of the North American Veterinary Dermatology Forum. AMP's structure and function**. 2015.

SANTORO, D.; BUNICK, D.; GRAVES, T. K.; SEGRE, M. Evaluation of canine antimicrobial peptides in infected and noninfected chronic atopic skin. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, 2013a.

SANTORO, D.; MARSELLA, R.; AHRENS, K.; GRAVES, T. K.; BUNICK, D. Altered mRNA and protein expression of filaggrin in the skin of a canine animal model for atopic dermatitis. **Veterinary dermatology**, v. 24, n. 3, p. 329–36, e73, jun. 2013b.

SANTORO, D.; MARSELLA, R.; PUCHEU-HASTON, C. M.; EISENSCHENK, M. N. C.; NUTTALL, T.; BIZIKOVA, P. Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host-micro-organism interaction. **Veterinary Dermatology**, p. 1-11, 2015.

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

SCHMID, P.; SIMON, D.; SIMON, H. . Epidemiology , clinical features , and immunology of

the “‘ intrinsic ’” (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). **Allergy**, v. 56, p. 841–849, 2001.

SHAW, S. C.; WOOD, J. L. N.; FREEMAN, J.; LITTLEWOOD, J. D.; HANNANT, D. Estimation of heritability of atopic dermatitis in Labrador and Golden Retrievers. **American journal of veterinary research**, v. 65, n. 7, p. 1014–20, jul. 2004.

SHIMADA, K.; YOON, J.-S.; YOSHIHARA, T.; IWASAKI, T.; NISHIFUJI, K. Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. **Veterinary dermatology**, v. 20, n. 5–6, p. 541–6, out. 2009.

SON, J. H.; CHUNG, B. Y.; KIM, H. O.; PARK, C. W. Clinical Features of Atopic Dermatitis in Adults Are Different according to Onset. **@BULLET J Korean Med Sci**, v. 32, p. 1360–1366, 2017.

SOUMELIS, V.; RECHE, P. A.; KANZLER, H. et al. Human epithelial cells trigger dendritic cell–mediated allergic inflammation by producing TSLP. **Nature Immunology**, v. 3, n. 7, p. 673–680, 2002.

STAHL, J.; PAPS, J.; BÄUMER, W.; OLIVRY, T. Dermatophagoides farinae house dust mite allergen challenges reduce stratum corneum ceramides in an experimental dog model of acute atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 6, 2012.

TENGVALL, K.; KIERCZAK, M.; BERGVALL, K.; OLSSON, M. et al. Genome-Wide Analysis in German Shepherd Dogs Reveals Association of a Locus on CFA 27 with Atopic Dermatitis. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 5, p. 1–12, 2013.

TENGVALL, K.; KOZYREV, S.; KIERCZAK, M.; BERGVALL, K. et al. Multiple regulatory variants located in cell type-specific enhancers within the PKP2 locus form major risk and protective haplotypes for canine atopic dermatitis in German shepherd dogs. **BMC genetics**, v. 17, n. 1, p. 97, 2016.

WEIDINGER, S.; NOVAK, N. Atopic dermatitis. **The Lancet**, v. 387, n. 10023, p. 1109–1122, 2016.

WILHEM, S.; KOVALIK, M.; FAVROT, C. Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 22, n. 2, p. 143–149, 2011.

WILLIAMS, H.; STEWART, A.; VON MUTIUS, E.; COOKSON, W.; ANDERSON, H. R. Is eczema really on the increase worldwide? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.

121, n. 4, 2008.

WOLFF, K.; GOLDSMITH, L. A.; KATZ, S. I.; GILCHREST, B. A.; PALLER, A. S.; LEFFELL, D. J. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. Seventh ed. [s.l.] McGraw-Hill Companies, 2008.

WOOD, S. H.; OLLIER, W. E.; NUTTALL, T.; MCEWAN, N. A.; CARTER, S. D. Despite identifying some shared gene associations with human atopic dermatitis the use of multiple dog breeds from various locations limits detection of gene associations in canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 138, n. 3, p. 193–197, 2010.

YAMAGUCHI, H.; HIRASAWA, N.; ASAKAWA, S.; OKITA, K.; TOKURA, Y. Intrinsic atopic dermatitis shows high serum nickel concentration. **Allergology International**, v. 64, n. 3, p. 282–284, 2015.

YOON, J.-S.; NISHIFUJI, K.; SASAKI, A.; IDE, K.; ISHIKAWA, J.; YOSHIHARA, T.; IWASAKI, T. Alteration of stratum corneum ceramide profiles in spontaneous canine model of atopic dermatitis. **Experimental dermatology**, v. 20, n. 9, p. 732–6, set. 2011.

CAPÍTULO II

Aspectos epidemiológicos da dermatite atópica em cães atendidos no hospital veterinário universitário na University of Minnesota, em Saint Paul, Minnesota/USA, entre 2007 e 2015

Resumo

A dermatite atópica (DA) é uma doença pruriginosa, inflamatória e crônica que afeta diversas espécies, incluindo cães e humanos. Em cães, é a alergopatia mais frequente e geralmente aparece entre os seis e 36 meses de idade, com quadro progressivo. Os sinais clínicos são caracterizados principalmente por prurido, eritema, lesões de auto-traumatismo, infecções recorrentes e otite recidivante. Os objetivos deste estudo foram avaliar o perfil epidemiológico, a intensidade dos sinais clínicos da DA e criar um indicador de gravidade da doença em cães atópicos atendidos no hospital universitário da University of Minnesota, em Saint Paul, no estado de Minnesota (EUA), entre 2007 e 2015. Primeiramente, realizou-se um estudo retrospectivo dos prontuários de 269 pacientes e as informações extraídas e analisadas foram: sexo, raça, idade de surgimento dos primeiros sinais clínicos, sazonalidade, presença de sinais respiratórios, presença de conjuntivite, realização de dieta hipoalergênica, resposta à dieta hipoalergênica e porcentagem de tempo intradomiciliar. Posteriormente, 175 cães que apresentaram um acompanhamento de no mínimo quatro visitas foram selecionados para a avaliação áreas corpóreas afetadas, grau de prurido e protocolos de tratamento utilizados e criação do indicador de severidade da dermatite atópica (CADSI), que foi criado a partir de uma Análise de Componentes Principais incluindo as variáveis prurido e número de áreas corpóreas afetadas. A frequência de dermatite atópica em relação à clínica geral foi de 1,97% e em relação às dermatopatias foi de 32,82%. Não houve diferença na frequência de machos e fêmeas. As raças com maior risco de desenvolvimento da doença foram american Staffordshire terrier (OR=4,47, *p*=0,000), buldogue inglês (OR = 3,28, *p*=0,007) e soft cotton wheaten terrier (OR = 5,44, *p*=0.000). Observou-se que este grupo de cães de Minnesota apresentou maior frequência de rinite (17,47%) que o descrito na literatura. A maioria dos cães apresentou quadro clínico perene (63,90%) e entre os sazonais, houve predomínio absoluto de crises na primavera/verão (95,87%). Quando o CADSI foi correlacionado às variáveis epidemiológicas, observou-se que a resposta positiva à dieta hipoalergênica está relacionada à maior gravidade da DA (*p* = 0,013). Desta forma, concluiu-se que o perfil epidemiológico dos cães atópicos deste estudo foi muito semelhante ao já descrito na literatura, exceto pela maior frequência de rinite e maior índice de gravidade nos atópicos induzidos por alimentos.

Palavras-chave: alergia, atopia, dermatite atópica, prurido, dermatologia, canino, cão.

Abstract

Atopic dermatitis (AD) is a chronic inflammatory pruritic skin disease that affects many species, including dogs and humans. In dogs, it is the most common allergic disease and usually has its onset between six and 36 months of age, with progressive development. The main clinical features are pruritus, erythema, self-inflicted lesions, recurrent infections and relapsing otitis. The aims of this study were to evaluate the epidemiological features, the intensity of clinical sings of atopic dermatitis and create a severity index for AD in atopic dogs seen at the Veterinary Teaching Hospital of the University of Minnesota, in Saint Paul, Minnesota (USA) from 2007 and 2015.

Primarily, a retrospective survey of the medical records of 269 dogs was performed and the following information were extracted: sex, breed, age at disease onset, seasonality, presence of respiratory signs, presence of conjunctivitis, performance of food trial, food trial response and percentage of time spent indoors. Later, 175 patients that had at least four follow-up visits were selected to an overtime assessment of the number body regions affected, pruritus level and treatment protocol and to create the Canine Atopic Dermatitis Severity Index (CADSI) created by a Principal Component method assembling the mean pruritus level and mean number of areas affected across visits. The frequency of atopic dermatitis among the general hospital population was 1.97% and 32.82% among the skin diseases. No differences were seen regarding gender predisposition. The breeds that showed the higher risk of developing atopic dermatitis were the American Staffordshire Terrier (OR=4.47, p=0.000), the English Bulldog (OR = 3.28, p=0.007) and the Soft Cotton Wheaten Terrier (OR = 5.44, p=0.000). Moreover, a higher frequency of rhinitis (17.47%) was seen in the patients from Minnesota, compared to the data from the literature. Most of the dogs presented non-seasonal clinical signs (63.90%) and when seasonality was observed, there was a vast predominance of flares in spring/summer (95.87%). When CADSI was correlated to the epidemiological variables, it was shown that a positive response to the food trial was associated with higher disease severity (p = 0.013). In conclusion, the dogs from our study presented similar epidemiological features of atopic dermatitis as reported in the literature, except for the higher frequency of rhinitis and the greater disease severity in the dogs with food induced atopic dermatitis.

Keywords: allergy, atopy, atopic dermatitis, pruritus, dermatology, canine, dog.

INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica, recorrente e pruriginosa, associada a anticorpos IgE mais comumente voltados a alérgenos ambientais (HALLIWELL, 2006). Em cães, as dermatites trofoalérgicas, ou seja, causadas por alérgenos alimentares, e a dermatite atópica, historicamente, sempre foram consideradas entidades distintas. As reações adversas a alimentos são caracterizadas por mecanismos imuno-mediados e não imuno-mediados e apresentam manifestações clínicas diversas, tais como, distúrbios gastrointestinais, urticária, angioedema e sinais que mimetizam dermatite atópica (FAVROT et al., 2010). O fato de alérgenos alimentares serem capazes provocar sinais clínicos indistinguíveis de dermatite atópica levou a *International Task Force on Canine Atopic Dermatitis* (ICADA) a reconhecer que proteínas de alimentos também podem desencadear crises da doença (OLIVRY et al., 2007). Desta forma, a doença é denominada dermatite atópica induzida por alimentos (DAIA) ou dermatite atópica *sensu lato* quando os alérgenos alimentares são reconhecidos com um dos causadores dos sinais clínicos, e dermatite atópica *sensu stricto* (DA) quando o quadro é causando estritamente por alérgenos ambientais. Entretanto, é incorreto inferir que toda reação adversa a alimentos com manifestações cutâneas é DAIA, quando na realidade, a última trata-se exclusivamente da dermatopatia alérgica com sinais clínicos típicos de dermatite atópica que apresenta melhora parcial ou total no quadro após dieta de eliminação com proteína exótica ou hidrolisada e recidiva dos sinais clínicos após reintrodução da dieta anterior (PUCHEU-HASTON et al., 2015; PUCHEU-HASTON, 2016). Além da distinção dos conceitos de DAIA e DA, é importante também salientar a definição da condição que abrange os pacientes que apresentam sinais clínicos de uma doença inflamatória e pruriginosa, com características também não

distinguíveis da dermatite atópica, mas em que não é possível se documentar anticorpos do tipo IgE alérgeno-específicos em ambos os testes alérgicos sorológico e intradérmico. Esta doença foi então chamada de dermatite atópica-*like* (ALD) (HALLIWELL, 2006).

Em humanos, a dermatite atópica apresenta prevalência em torno de 20% em crianças e 10% em adultos (LEUNG e BIEBER, 2003; WILLIAMS et al., 2008; DECKERS et al., 2012; WEIDINGER e NOVAK, 2016; SON et al., 2017). Nesta espécie, as manifestações clínicas são mais comuns na primeira infância, com gradual desaparecimento até a adolescência. Já em cães, os sinais clínicos geralmente aparecem em média entre os seis meses e três anos de idade, com progressiva intensificação do quadro, sem que ocorra a tendência ao desaparecimento da doença na fase adulta. Além disto, sugere-se que, quando há reação a proteínas alimentares, os sinais clínicos tendem a ocorrer em idades extremas, muito jovens ou senis (WOLFF et al., 2008; FAVROT et al., 2010; BIZIKOVA et al., 2015).

Em cães, a prevalência é variável e já foi relatada como sendo de 1-10% dos casos atendidos na clínica geral (NØDTVEDT et al., 2006; SAITO e RHOADS, 2012; KHOSHNEGAH et al., 2013; SANTOS e SANTOS, 2016) e 3-30% dos cães com doenças de pele (HILLIER & GRIFFIN, 2001; A. NØDTVEDT et al., 2006; HILL et al., 2006; KHOSHNEGAH et al., 2013).

Observa-se em humanos uma predisposição sexual feminina na dermatite atópica (SCHMID et al, 2001; NOVAK & BIEBER, 2003; BRENNINKMEIJER et al., 2008; CHANTE et al., 2015; YAMAGUCHI et al., 2015), em cães, não existem diferenças significativas quanto ao gênero (ZUR et al., 2002; NØDTVEDT et al., 2006; TARPATAKI et al., 2006; FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011; BRUET et al., 2012; KHOSHNEGAH et al., 2013; MAZRIER et al., 2016).

Diversos estudos avaliaram predisposição racial na dermatite atópica e várias raças já foram incriminadas como mais sucetíveis à doença. Dentre elas, o Labrador retriever, Golden retriever, Pastor Alemão, Buldogue Francês e West Highland White Terrier são as mais frequentemente encontradas nos estudos (ZUR et al., 2002; TARPATAKI et al., 2006; PICCO et al., 2008; JAEGER et al., 2010; BRUET et al., 2012). Entretanto, há grande variação regional nas raças mais predispostas à dermatite atópica no local, sendo muito difícil determinar raças predispostas em todo o mundo (JAEGER et al., 2010).

A DA é uma doença de apresentação clínica multifacetada. O prurido primário, ou *sine materia* é o principal sintoma em humanos e em animais. O termo *sine materia* refere-se ao fato de o prurido ser inicialmente alesional e ocorrer em áreas de pele visivelmente íntegra. Sendo assim, nas fases iniciais, ou agudas, é mais comum que o animal apresente apenas pele eritematosa associada, ou não, a lesões sugestivas de autotraumatismo por prurido intenso, como excoriações, alopécia e erosão. Com a cronificação, a tendência é o surgimento de feotriquia, hiperpigmentação, liquenificação, alopécia mais pronunciada e, em alguns casos, até a formação de cicatrizes e úlcerações por lambedura constante. Lesões como pápulas, pústulas e crostas melicéricas são comuns em todas as fases da doença e são frequentemente associadas a infecções bacterianas secundárias (LARSSON e LUCAS, 2015). O quadro pode ser perene ou sazonal e as principais regiões afetadas são os espaços interdigitais, orelhas, perilabial, axila e abdômen (FAVROT et al., 2010; HENSEL et al., 2015). Geralmente, os primeiros sinais clínicos surgem entre seis e 36 meses de idade, com tendência progressiva (PICCO et al., 2008; FAVROT et al., 2010; BRUET et al., 2012). Além das manifestações cutâneas, embora menos frequentes, podem

estar associados distúrbios gastrointestinais, respiratórios ou oftalmológicos (PICCO et al., 2008; FAVROT et al., 2010; LOURENÇO et al., 2011).

Considerando as variações regionais na epidemiologia da dermatite atópica, este estudo teve como objetivo a caracterização do perfil epidemiológico, avaliação da intensidade dos sinais clínicos e a criação de um indicador de gravidade da DA em cães atópicos que atenderam aos critérios de inclusão estabelecidos, atendidos no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, no município de Saint Paul, estado de Minnesota, Estados Unidos da América (EUA), entre 2007 e 2015.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de dados

Realizou-se um estudo retrospectivo das fichas clínicas dos cães atendidos entre 2007-2015 na University of Minnesota (UMN), College of Veterinary Medicine, Minnesota/USA. Para a seleção dos prontuários dos cães, realizou-se uma busca no sistema do hospital veterinário, utilizando-se das seguintes palavras-chave: dermatite atópica, atopia, alergia, teste alérgico intradérmico (IDT), teste alérgico sorológico (SE) cão e canino. A partir desta busca, 2.691 casos foram recrutados inicialmente e posteriormente, criteriosamente selecionados a partir dos seguintes critérios: (i) diagnóstico de dermatite atópica por um dermatologista certificado pelo *American College of Veterinary Dermatology* (ACVD) e (ii) registros de realização de testes alérgicos utilizando IDT e SE ambos na mesma consulta. Baseado no critério (i), 1.233 cães foram selecionados. Após a aplicação do critério (ii), foram selecionados 275 casos e seis destes foram excluídos, pois não apresentavam os resultados dos testes alérgicos acessíveis. Desta forma, 269 casos foram incluídos no estudo. As seguintes informações foram extraídas dos prontuários: gênero, raça, idade de surgimento dos primeiros sinais clínicos, sazonalidade, presença de sinais respiratórios, presença de conjuntivite, realização de dieta hipoalergênica, resposta à dieta hipoalergênica, porcentagem de tempo intradomiciliar, áreas corpóreas afetadas, grau de prurido e protocolos de tratamento utilizados.

Protocolos de testes alérgicos

O teste intradérmico (IDT) foi realizado após a tosquia de uma janela retangular na lateral do tórax dos cães, marcação dos pontos de aplicação e injeção intradérmica de 0,05ml de 65 alérgenos ambientais (Stallergens Greer®, Lenoir, NC, USA). As reações foram avaliadas 15 minutos após o término das aplicações e avaliadas subjetivamente em uma escala de intensidade de 0 a 4+, baseado nos controles negativo (salina) e positivo (histamina). Os cães foram sedados para o teste com dexmedetomidina por via endovenosa, na dose de 0,004 mg/kg. O teste sorológico (SE) foi realizado no laboratório de referência IDEXX, usando o kit de teste Greer Aller-g-complete® kit (Stallergenes Greer®, Lenoir, NC, USA). De acordo com os resultados dos testes alérgicos, os cães foram classificados em dois grupos, dermatite atópica (AD) ou dermatite atópica-*like* (ALD). Os cães que não apresentaram nenhuma reação positiva em ambos IDT e SE, foram classificados como ALD, enquanto os que apresentaram uma ou mais reações positivas no IDT e/ou no SE, foram classificados como AD. No IDT, foram consideradas positivas as reações que receberam uma graduação maior ou igual a 2+ e associadas a eritema. Já no SE, foram consideradas positivas as reações maiores ou iguais a 300 EAU (*Elisa Absorbance Units*), segundo recomendações do laboratório IDEXX.

Delineamento experimental e análise estatística

Primeiramente, os dados epidemiológicos de todos os 269 pacientes incluídos no estudo foram descritos. Nesta análise, as variáveis de interesse inclusas foram: sexo e status reprodutivo, raça, idade de surgimento dos primeiros sinais clínicos, sazonalidade dos mesmos, classificação como AD ou ALD baseado no resultado dos testes alérgicos, presença de sinais respiratórios, presença de conjuntivite, realização de dieta hipoalergênica, resposta à dieta hipoalergênica e porcentagem de tempo intradomiciliar.

Posteriormente, objetivou-se avaliar a gravidade das manifestações clínicas da dermatite atópica, resposta ao protocolo de tratamento empregado, de forma indireta e criar do indicador de gravidade da DA. Como esta é uma doença crônica e multifatorial, nem sempre é possível se atingir o controle dos sinais clínicos no primeiro protocolo de tratamento prescrito. Desta forma, estabeleceu-se que apenas os animais com um mínimo de quatro consultas de acompanhamento poderiam ser incluídos nesta parte do experimento, pois os autores consideraram que este é um número mínimo médio adequado para se atingir a terapia de manutenção. Sendo assim, 175 casos preencheram este critério estabelecido.

Devido à natureza retrospectiva do estudo, não foi possível incluir a classificação das lesões na avaliação da gravidade da dermatite atópica, pois não havia padronização das descrições nos prontuários. Desta forma, avaliou-se a extensão das lesões nas regiões corpóreas, cada área afetada foi contabilizada como um local. Além disso, as áreas corpóreas afetadas na primeira visita foram documentadas, a fim de se calcular as áreas mais frequentemente lesionadas, antes da terapia. A intensidade do prurido, graduada em uma escala de 0 a 10 (quanto mais próximo de 10, mais intenso), foi extraída dos prontuários e era fornecida pelos proprietários baseado em avaliação verbal, antes de 2009, ou através da escala de prurido analógica visual validada (PVAS) para cães, após 2009 (RYBNÍČEK et al., 2009). O grau de prurido foi posteriormente classificado em três categorias de gravidade, da seguinte forma: leve: 2.0-3.5; moderado: 3.6-5.5 e grave: 5.6-10 (Thierry Olivry, comunicação pessoal)[1].

O protocolo de tratamento utilizado na manutenção dos pacientes também foi avaliado e classificado nos seguintes escores: 1: imunoterapia alérgeno-específica (ASIT) e/ou anti-histamínicos e/ou ácidos graxos essenciais; 2: uma droga imunomoduladora (glicocorticoides por via oral, ciclosporina, oclacitinib, lokivetmab); 3: duas ou mais drogas imunomoduladoras associadas. Foi considerado tratamento de manutenção o protocolo terapêutico capaz de controlar a doença ao longo do tempo, tendo sido utilizado com maior frequência. Para se avaliar a resposta ao protocolo terapêutico de forma indireta, utilizou-se um modelo de regressão marginal linear para prurido e número de áreas corpóreas afetadas. Neste modelo, realiza-se a contabilização da correlação entre medidas repetidas.

Finalmente, objetivou-se criar um indicador de gravidade da DA que representasse a gravidade da doença e que possibilitasse a comparação entre os indivíduos e com as variáveis epidemiológicas a fim de se identificar de fatores correlacionados a um pior prognóstico clínico.

---

[1] Thierry Olivry, comunicação pessoal por envio de manuscrito ainda não publicado de autoria dos membros da ICADA *(International Committee on Allergic Diseases of Animals*) pela lista de e-mails vetderm@lists.ncsu.edu

Assim, foi criado o *Canine Atopic Dermatitis Severity Index* (CADSI) a partir de um Análise de Componentes Principais, inicialmente com as variáveis "grau médio de prurido ao longo das visitas", "número médio de áreas corpóreas afetadas ao longo das visitas" e "escore de tratamento". Entretanto, após realização da primeira análise, verificou-se que o escore de tratamento exercia peso próximo a zero no CADSI. Desta forma, decidiu-se por incluir apenas as variáveis "grau médio de prurido ao longo das visitas" e "número médio de áreas corpóreas afetadas ao longo das visitas". Posteriormente, o valor do CADSI foi comparado às variáveis epidemiológicas utilizando-se os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis.

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* R versão 3.2.4 (R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/> R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014). Os resultados foram considerados significativos quando o valor de $P \geq 0.05$.

RESULTADOS

Dados epidemiológicos

Durante o período estudado, de 2007 a 2015, um total de 62.534 cães foram atendidos no hospital universitário da UMN. Destes 62.534 cães, 3.756 (6,0%) foram diagnosticados com dermatopatias e 1.233 foram diagnosticados com dermatite atópica. A frequência da dermatite atópica na clínica geral foi de 1,97% e entre as todas as dermatopatias foi de 32,82%. Após a aplicação dos critérios de inclusão, 269 cães foram selecionados. A análise descritiva das variáveis sexo e status reprodutivo, idade de surgimento dos primeiros sinais clínicos, sazonalidade dos mesmos, classificação como AD ou ALD, presença de sinais respiratórios, presença de conjuntivite, realização de dieta hipoalergênica, resposta à dieta hipoalergênica e porcentagem de tempo em ambiente intradomiciliar está representada na Tabela 1.

Tabela 1. Análise de frequências das variáveis epidemiológicas dos animais com dermatite atópica selecionados para o estudo, atendidos no hospital universitário da University of Minnesota, Minnesota/EUA, entre 2007 e 2015.

Variáveis		Animais	
		N	%
Classificação como AD ou ALD	AD	228	84,75%
	ALD	41	15,24%
Sexo	Fêmea	128	47,58%
	Macho	141	52,42%
Sazonalidade	Sazonal	97	36,01%
	Perene	172	63,90%
Estações	Primavera e Verão	93	95,87%
	Outono e inverno	4	4,12%
Realização de dieta hipoalergênica	Não	47	17,47%
	Sim	222	82,53%
Resposta positiva à dieta hipoalergênica	Não	196	88,29%
	Sim	26	11,71%
Sinais respiratórios	Nenhum	217	80,67%
	Rinite	47	17,47%
	Tosse	5	1,86%
Conjuntivite	Não	221	82,16%
	Sim	48	17,84%
Variáveis		**Média (desvio-padrão)**	
Idade de surgimento da doença		20,19 (17,75)	
Porcentagem de tempo diário intradomiciliar		84,2% (15,2%)	

As raças mais frequentes nos animais estudados foram o Labrador Retriever (22,39%), Golden Retriever (10,94%) e o Pastor Alemão (5,97%). A figura 1 representa a frequência de raças encontradas. Entretanto, estas raças estão entre as mais populares nos EUA. Desta forma, quando a frequência de cães das raças encontradas no presente estudo foi comparada à população canina que foi atendida no hospital no mesmo período (n=62,534), american Staffordshire terrier (OR=4,47; p=0,000), buldogue inglês (OR = 3,28; p=0,007) e soft cotton wheaten terrier (OR = 5,44; p=0.000) foram consideradas as raças com o maior risco de desenvolver dermatite atópica. Os cães da raça pug também apresentaram um valor de p marginalmente significativo (OR = 2,00; p = 0,052) quanto à maior predisposição à dermatite atópica. A comparação da frequência das raças presentes no grupo experimental com a população geral atendida de 2007 a 2015 está representada na Tabela 2.

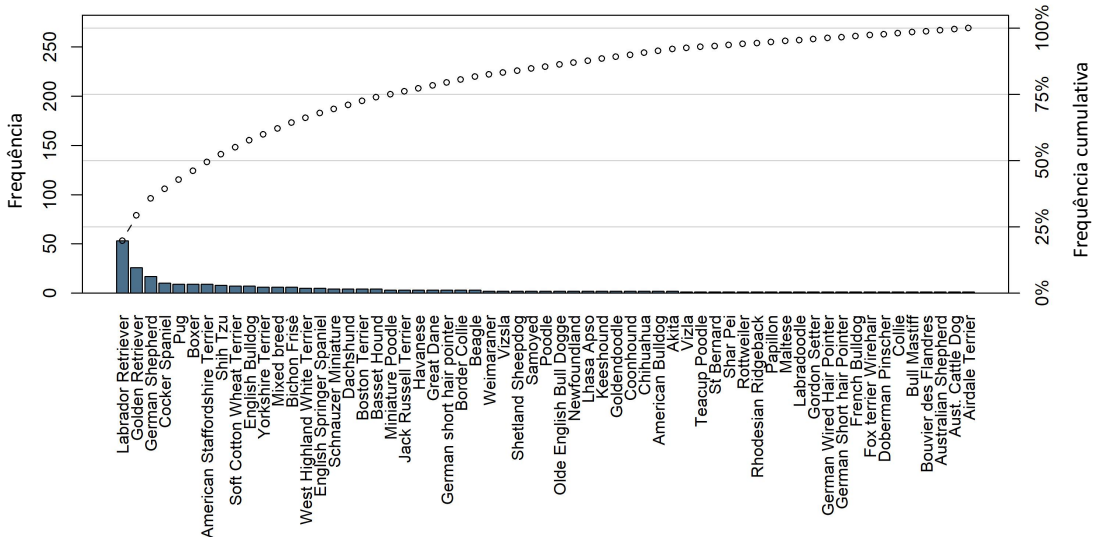

Figura 1. Frequência de raças caninas presentes no grupo de cães incluídos no estudo "Aspectos epidemiológicos da dermatite atópica em cães atendidos no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, em Saint Paul, Minnesota/USA, entre 2007 e 2015", *n* = 269.

Tabela 2. Comparação da frequência das raças entre a população geral atendida entre 2007-2015 no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, em Saint Paul, MN, EUA.

Raça	Total	Nº de casos	%	O.R.	C.I. - 95%	P-value
Airedale Terrier	215	1	0,47%	1,07	[0,32; 8,09]	0,605
Akita	114	2	1,75%	4,10	[1,47; 18,19]	0,087
American Bulldog	237	2	0,84%	1,96	[0,70; 8,61]	0,271
American Staffordshire	485	9	1,86%	4,47	[2,46; 9,09]	0,000
Australian Cattle Dog	174	1	0,57%	1,33	[0,40; 10,02]	0,528
Australian Shepherd	697	1	0,14%	0,33	[0,10; 2,46]	0,380
Basset Hound	501	4	0,80%	1,87	[0,83; 5,37]	0,171
Beagle	1202	3	0,25%	0,57	[0,23; 1,92]	0,500
Bichon Frisè	939	6	0,64%	1,49	[0,74; 3,54]	0,306
Border Collie	930	3	0,32%	0,74	[0,30; 2,50]	0,803
Boston Terrier	634	4	0,63%	1,47	[0,65; 4,22]	0,356
Bouvier des Flandres	42	1	2,38%	5,51	[1,64; 42,90]	0,166
Boxer	1482	9	0,61%	1,42	[0,79; 2,88]	0,308
Bull Mastiff	93	1	1,08%	2,49	[0,74; 18,93]	0,330
Chihuahua	972	2	0,21%	0,47	[0,17; 2,05]	0,452
Cocker Spaniel	1459	10	0,69%	1,61	[0,91; 3,15]	0,150
Collie	395	1	0,25%	0,58	[0,18; 4,37]	1,000
Coonhound	175	2	1,14%	2,66	[0,95; 11,72]	0,174
Dachshund	1128	4	0,35%	0,82	[0,36; 2,34]	1,000

Doberman Pinscher	519	1	0,19%	0,44	[0,13; 3,32]	0,731
English Bulldog	507	7	1,38%	3,28	[1,70; 7,32]	0,007
English Spring Spaniel	1128	5	0,44%	1,03	[0,49; 2,64]	0,818
Fox Terrier Wirehair	163	1	0,61%	1,42	[0,43; 10,7]	0,505
French Bulldog	383	1	0,26%	0,60	[0,18; 4,51]	1,000
German S Hair Pointer	579	4	0,69%	1,61	[0,71; 4,63]	0,321
German Shepherd Dog	2935	17	0,58%	1,37	[0,87; 2,29]	0,194
German W Hair Pointer	168	1	0,60%	1,37	[0,41; 10,38]	0,516
Golden Retriever	4711	26	0,55%	1,31	[0,89; 2,00]	0,201
Goldendoodle	232	2	0,86%	2,00	[0,72; 8,8]	0,263
Gordon Setter	113	1	0,88%	2,04	[0,61; 15,52]	0,386
Great Dane	606	3	0,50%	1,15	[0,47; 3,86]	0,748
Havanese	336	3	0,89%	2,08	[0,84; 7,04]	0,177
Jack Russell Terrier	645	3	0,47%	1,08	[0,44; 3,63]	0,759
Keeshond	125	2	1,60%	3,74	[1,34; 16,54]	0,101
Labradoodle	92	1	1,09%	2,51	[0,75; 19,14]	0,328
Labrador Retriever	9746	53	0,54%	1,32	[0,99; 1,81]	0,064
Lhasa Apso	358	2	0,56%	1,29	[0,47; 5,66]	0,669
Maltese Dog	674	1	0,15%	0,34	[0,10; 2,55]	0,379
Miniature Poodle	783	3	0,38%	0,88	[0,36; 2,98]	1,000
Miniature Schnauzer	1097	4	0,36%	0,84	[0,37; 2,41]	1,000
Mixed Breed Dog	1676	6	0,36%	0,82	[0,41; 1,95]	0,849
Newfoundland	416	2	0,48%	1,11	[0,40; 4,86]	0,701
Olde English Bull Dogge	139	2	1,44%	3,36	[1,20; 14,84]	0,121
Papillon	200	1	0,50%	1,15	[0,35; 8,70]	0,578
Pug	1062	9	0,85%	2,00	[1,11; 4,06]	0,052
Rhodesian Ridgeback	142	1	0,70%	1,63	[0,49; 12,31]	0,458
Rottweiler	738	1	0,14%	0,31	[0,09; 2,32]	0,386
Samoyed	216	2	0,93%	2,15	[0,77; 9,46]	0,238
Shar-pei	179	1	0,56%	1,29	[0,39; 9,74]	0,538
Shetland Sheepdog	762	2	0,26%	0,60	[0,22; 2,63]	0,777
Shih tzu	1626	8	0,49%	1,14	[0,61; 2,42]	0,698
Soft Cotton Wheaten	309	7	2,27%	5,44	[2,81; 12,2]	0,000
Saint Bernard	210	1	0,48%	1,10	[0,33; 8,28]	0,596
Standard Poodle	639	2	0,31%	0,72	[0,26; 3,15]	1,000
Teacup Poodle	35	1	2,86%	6,61	[1,96; 51,90]	0,140
Vizsla	341	3	0,88%	2,05	[0,83; 6,93]	0,182
Weimaraner	348	2	0,57%	1,33	[0,48; 5,83]	0,664
West Highland White	582	5	0,86%	2,01	[0,95; 5,19]	0,108
Yorkshire Terrier	1555	6	0,39%	0,89	[0,44; 2,11]	1,000

Gravidade da dermatite atópica antes do início do tratamento

Considerando a abordagem numérica do grau de prurido na primeira visita, a média foi 6,51 (D.P.= 2,06). A análise numérica do prurido na primeira visita está representada na figura 2A. Na abordagem categórica, que classifica o grau de prurido em intervalos de intensidade, observou-se

que a maioria dos animais apresentou prurido grave (5,6-10), como pode ser observado na figura 3. O número médio de lesões na primeira visita está representado na figura 2B, e teve uma média de 3,8 (D.P. = 1,83).

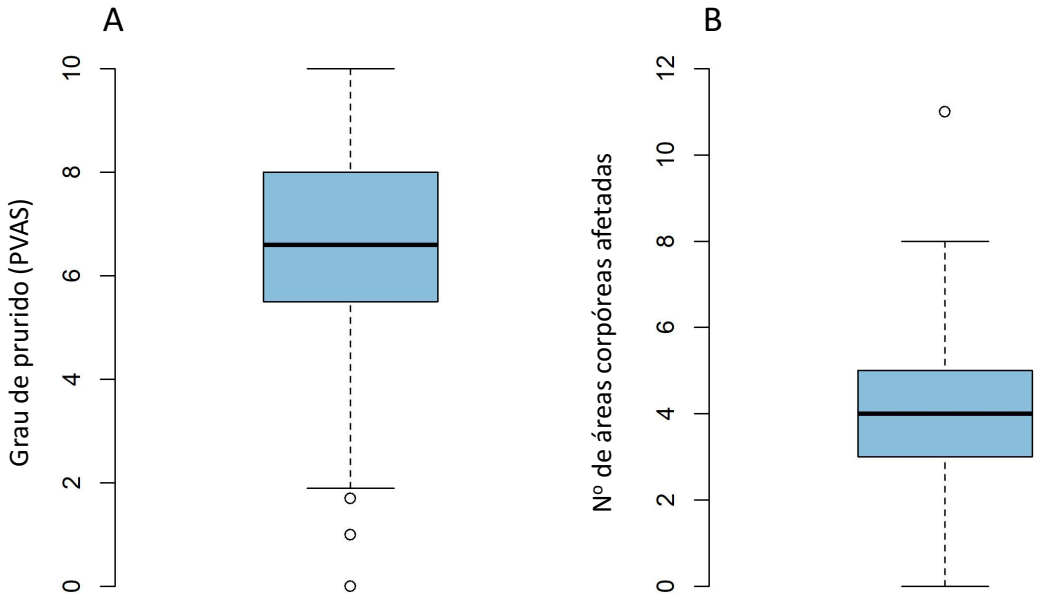

Figura 2. A: Grau médio de prurido na primeira visita. B: Número médio de áreas afetadas na primeira visita. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers; n =175*.

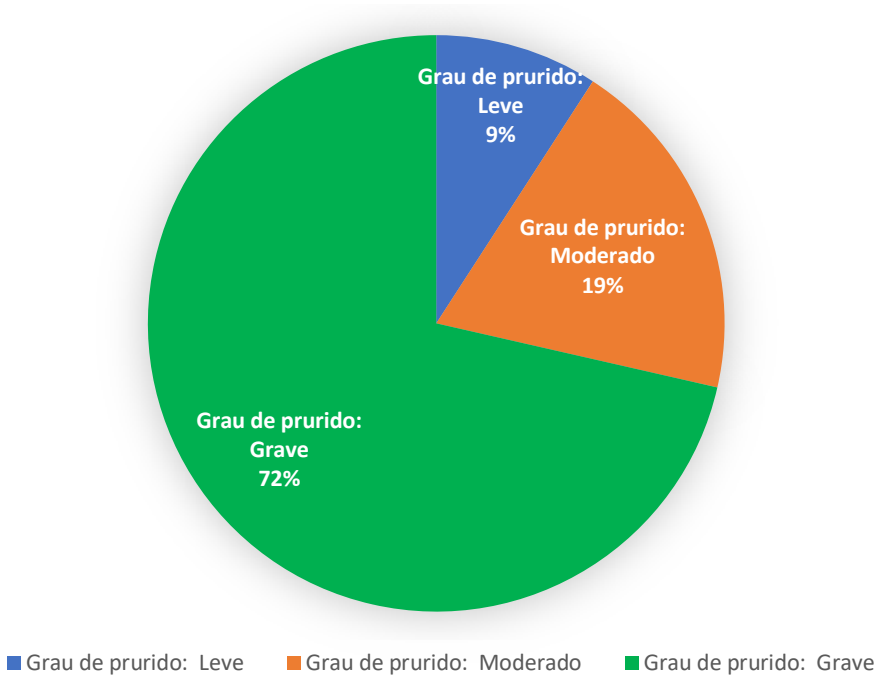

Figura 3. Distribuição quanto ao grau de prurido na primeira visita de 175 cães atendidos no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, EUA entre 2007 e 2015. Leve: 2,0-3,5; Moderado: 3,8-5,5; Grave: 5,8-10,0.

Em relação às áreas corpóreas afetadas, observou-se que as mais comumente acometidas foram região interdigital, coxas, abdômen, região perilabial, dorso, região inguinal, axilas e orelhas. As regiões menos afetadas foram ombros e cotovelos. Além disto, a frequência de animais apresentando prurido alesional (*sine materia*) foi consideravelmente baixa, a menor de todas. Estes resultados estão representados na figura 4.

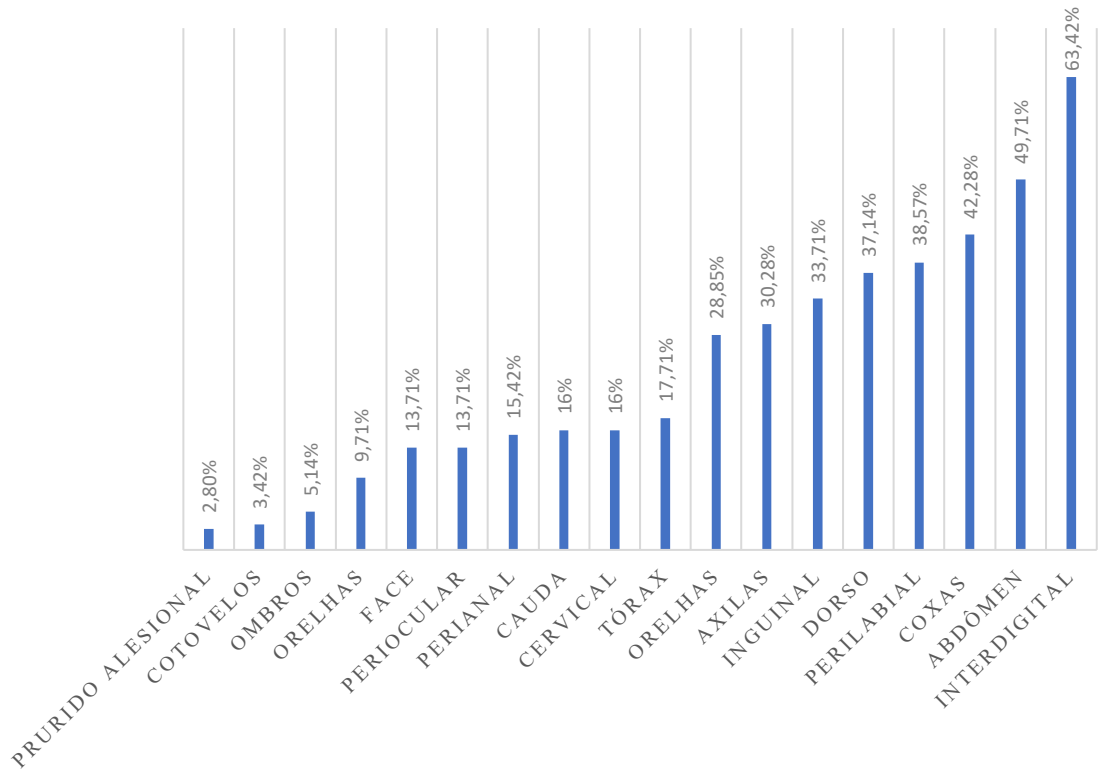

Figura 4. Frequência de áreas afetadas na primeira visita de 175 cães atendidos no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, EUA entre 2007 e 2015.

Protocolos de tratamento utilizados

Em relação aos protocolos de tratamento, o escore 2 foi o mais frequentemente utilizado (113/175; 64,57%), seguido pelo escore 1 (53/175; 30,29%) e pelo escore 3 (9/175, 5.17%). Estes resultados estão representados no gráfico 5. A frequência de tratamentos imunomoduladores mais utilizados nos pacientes do estudo está representada no figura 6.

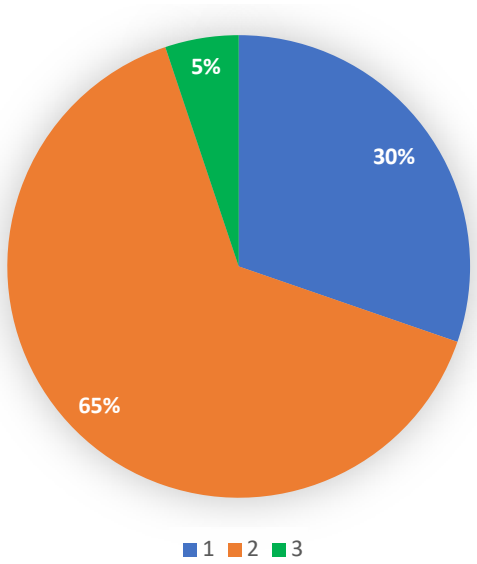

Figura 5. Distribuição quanto ao escore de tratamento de manutenção utilizado em 175 cães atendidos no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, EUA entre 2007 e 2015. 1: imunoterapia alérgeno-específica (ASIT) e/ou anti-histamínicos e/ou ácidos graxos essenciais; 2: uma droga imunomoduladora (glicocorticoides por via oral, ciclosporina, oclacitinib, lokivetmab); 3: duas ou mais drogas imunomoduladoras associadas.

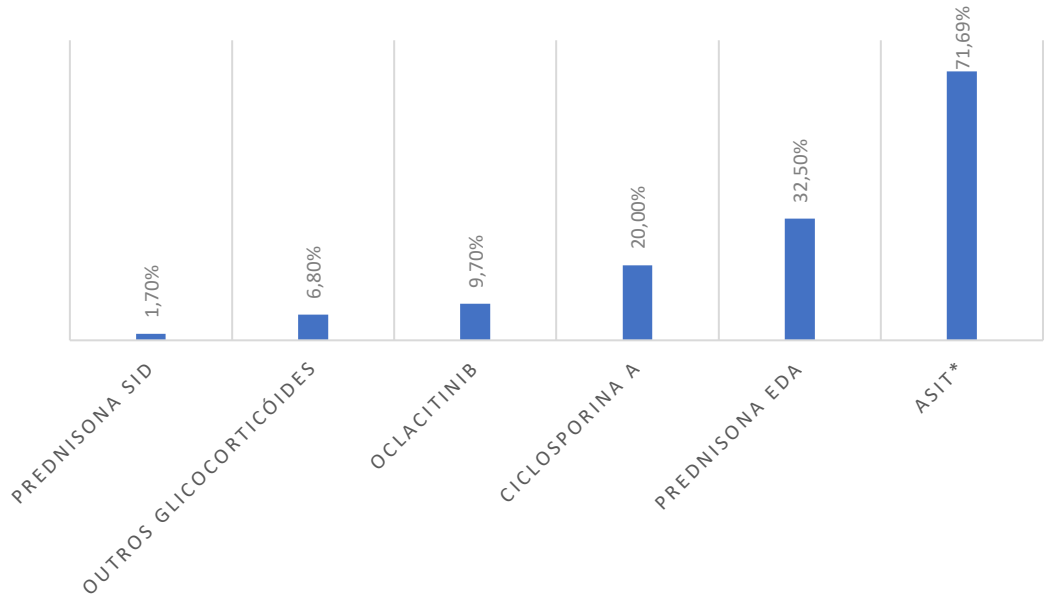

Figura 6. Frequência das drogas imunomoduladoras utilizadas nos 175 cães com dermatite atópica atendidos no hospital veterinário universitário da University of Minnesota, EUA entre 2007 e 2015. EDA: em dias alternados, a cada 48 horas. SID: a cada 24 horas. *ASIT: frequência calculada apenas nos 159 cães classificados como AD, ou seja, os que possuíam reações positivas nos testes alérgicos.

Modelo de regressão marginal linear para redução de prurido e lesões ao longo das visitas

Por este método objetivou-se avaliar a evolução do grau de prurido e número de áreas corpóreas afetadas ao longo do tempo. Em média, os 175 cães compareceram ao hospital oito vezes para serem examinados. Desta forma, considerou-se apenas as primeiras oito visitas de todos os pacientes (*n*=175) porque a partir deste número, uma quantidade muito pequena de cães estava representada. Houve redução significativa no prurido (p = 0,000) e no número de áreas corpóreas afetadas (p = 0,000). Estes resultados estão representados no figura 7.

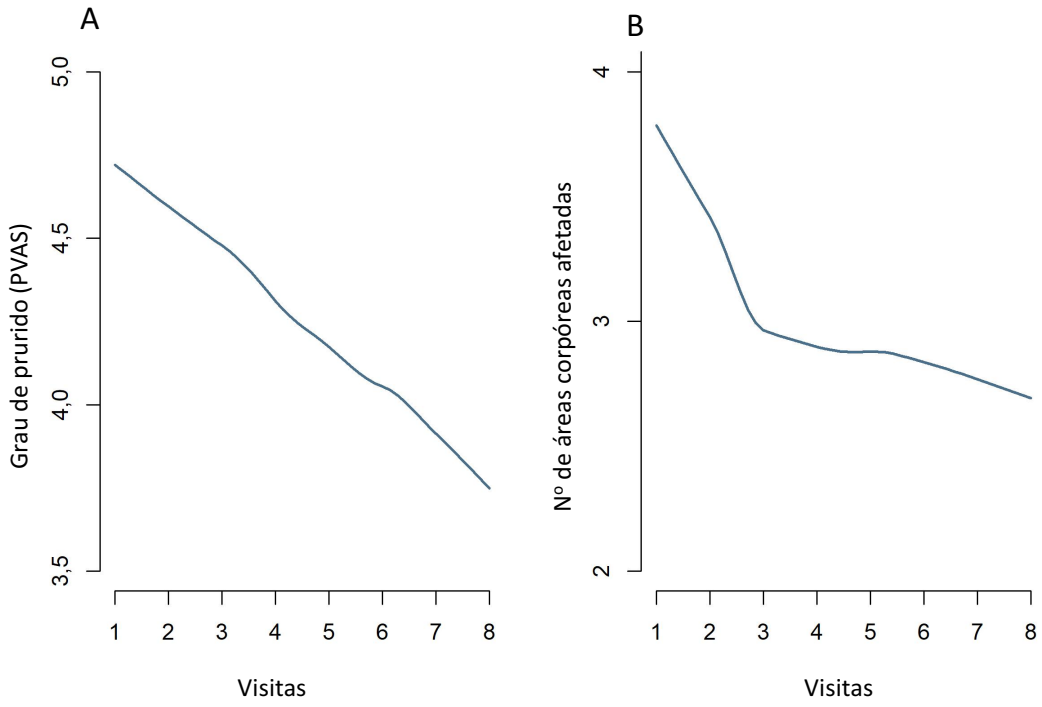

Figura 7. Modelo marginal linear para grau de prurido e número de áreas afetadas. Observa-se nestas curvas uma tendência decrescente ao longo das oito primeiras visitas; *n=175*.

Indicador de gravidade da dermatite atópica (CADSI)

De acordo com a Análise das Componentes Principais, observou-se que o indicador de gravidade da doença será tão maior quanto forem os valores das variáveis. Observou-se também correlação de Spearman positiva entre grau de prurido e número de áreas afetadas (r = 0,18; p = 0,021). Cabe ressaltar que os indicadores foram padronizados para a escala de 0 a 1, sendo que valores mais próximos de 1 indicam maior gravidade da doença. Dessa forma, é possível observar que a média do indicador foi de 0,36 (D.P. = 0,16). Na Tabela 3 está apresentada a comparação do indicador de gravidade com todas as variáveis epidemiológicas. Os animais que apresentaram resposta positiva à dieta hipoalergênica obtiveram CADSI significativamente maior (p = 0,013). Não

houve diferença significativa ($p > 0,05$) nas demais variáveis epidemiológicas qualitativas em relação ao indicador de gravidade. Não houve também correlação significativa com a idade de surgimento da doença (r = 0,02; $p = 0,757$) e porcentagem do tempo diária intradomiciliar (r = -0,07; $p = 0,319$). Após observarmos que a gravidade da dermatite atópica foi maior nos pacientes com DAIA, decidimos comparar as variáveis clínicoepidemiológicas (sazonalidade, raça, sexo, presença de sinais respiratórios/conjuntivite, idade de surgimento, porcentagem de tempo intradomiciliar, grau de prurido e número de áreas afetadas na primeira visita) entre estes e os pacientes com dermatite atópica não induzida por alimentos e não encontramos nenhuma diferença estatística significativa ($p > 0,05$).

Tabela 3. Comparação do indicador de gravidade da dermatite atópica com as variáveis epidemiológicas qualitativas e quantitativas.

Variáveis		Indicador (CADSI)					Valor de *p*
		Méd.	D.P.	1º Q	2º Q	3º Q	
Grupo	AD	0,36	0,01	0,24	0,34	0,44	0,353[1]
	ALD	0,38	0,03	0,30	0,38	0,48	
Sazonalidade	Sazonal	0,35	0,03	0,22	0,30	0,42	0,248[2]
	Perene	0,28	0,07	0,21	0,21	0,32	
	Perene com crises sazonais	0,37	0,01	0,26	0,36	0,47	
Sexo/Status reprodutivo	Fêmea	0,36	0,02	0,23	0,34	0,45	0,951[2]
	Macho	0,37	0,02	0,26	0,34	0,43	
Realização de dieta hipoalergênica	Não	0,34	0,04	0,24	0,32	0,37	0,242[1]
	Sim	0,36	0,01	0,25	0,35	0,47	
Resposta positiva à dieta hipoalergênica	Não	0,35	0,01	0,23	0,33	0,43	0,013[1]*
	Sim	0,42	0,03	0,35	0,43	0,51	
Sinais respiratórios	Nenhum	0,36	0,02	0,23	0,34	0,43	0,411[1]
	Rinite	0,38	0,02	0,32	0,39	0,45	
	Tosse	0,38	0,09	0,28	0,30	0,49	
Conjuntivite	Não	0,36	0,02	0,24	0,34	0,43	0,270[1]
	Sim	0,37	0,02	0,27	0,38	0,46	

Variáveis	Valor de *r*	Valor de *p*
Idade de surgimento da doença	r = 0,02[3]	$p = 0,757$[3]
Porcentagem de tempo diário intradomiciliar	r = -0,07[3]	$p = 0,319$[3]

[1] Mann-Whitney; [2]Kruskal-Wallis. [3]Correlação de Spearman. Méd: media. D.P.: desvio-padrão. AD: grupo dermatite atópica. ALD: dermatite atópica-like. CADSI: *canine atopic dermatitis severity index.* *Valor de $p \leq 0,05$, significativo

DISCUSSÃO

A frequência de dermatite atópica canina em relação a todos os cães atendidos no hospital universitário da UMN (1,97%) no período de 2007 a 2015 , foi semelhante à observada (1-10%) em outros estudos dos EUA, Iran, Suécia e Brasil (NØDTVEDT et al., 2006; SAITO e RHOADS, 2012; KHOSHNEGAH et al., 2013; SANTOS e SANTOS, 2016). A frequência da doença entre as dermatopatias (32,82%) também está dentro do que foi relatado em outros estudos (HILLIER e GRIFFIN, 2001; A. NØDTVEDT et al., 2006; HILL et al., 2006; KHOSHNEGAH et al., 2013).

No presente estudo, 41 cães foram classificados como ALD (15,24%) e 228 como AD (87,75%). A frequência de ALD foi menor que a apresentada (26,6%) por Prelaud e colaboradores (PRELAUD e COCHET-FAIVRE, 2007), mas está dentro da frequência relatada em humanos (10-45%) (SCHMID et al., 2001; CHOI et al., 2003; NOVAK e BIEBER, 2003; PÓNYAI et al., 2008; OTT et al., 2009, 2010; KULTHANAN et al., 2011). De acordo com o conhecimento do autor, o trabalho de Prelaud e colaboradores (PRELAUD e COCHET-FAIVRE, 2007), publicado em forma de resumo em um evento, é o único publicado até o momento sobre a frequência de ALD em cães.

Não houve predisposição sexual ao desenvolvimento de dermatite atópica no presente estudo, assim como observado nos resultados de outros estudos (ZUR et al., 2002; NØDTVEDT et al., 2006; TARPATAKI et al., 2006; FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011; BRUET et al., 2012; KHOSHNEGAH et al., 2013; MAZRIER et al., 2016). Quanto à sazonalidade dos sinais clínicos, a maioria dos pacientes apresentou doença em curso perene (63,90%), ainda que Minnesota seja um estado localizado na zona de clima temperado dos EUA, apresentando grandes alterações climáticas durante as estações do ano e um inverno bastante rigoroso. Esta tendência ao curso clínico perene faz sentido já que os ácaros da poeira doméstica são os principais alérgenos envolvidos na patogenia da dermatite atópica (HILL e DEBOER, 2001; NUTTALL et al., 2006) e estão presentes em grandes concentrações nos ambientes domésticos. Além disso, com a industrialização e o estilo de vida ocidental, o tempo de intradomiciliar aumentou consideravelmente, intensificando a exposição aos ácaros. Os pacientes deste estudo permaneciam em média 84,2% do seu dia dentro do ambiente doméstico, confirmando a afirmação anterior. No critério de diagnóstico de dermatite atópica proposto por Favrot e colaboradores (2010), a vida intradomiciliar é um fator de risco para o desenvolvimento da doença, assim como é observado em humanos. Entre os pacientes sazonais, as crises ocorriam na primavera/verão na grande maioria (95,87%). Estas são as estações do ano que apresentam as mais altas temperaturas ambientais no estado de Minnesota, com umidade excessiva e intensa polinização pela flora local, gerando crises nos indivíduos alérgicos a pólens, principalmente. No inverno, a temperatura sofre intensa queda, mudando totalmente as condições climáticas. A proporção de animais com manifestações sazonais entre 20-30% e o predomínio de crises na primavera/verão também foi observada em outros estudos (TARPATAKI et al., 2006; FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011; BRUET et al., 2012). Apesar de ter sido realizado na Califórnia, um estado que não apresenta alterações climáticas extremas nas estações, o estudo de Zur e colaboradores demonstrou um predomínio de animais com manifestações clínicas sazonais (62%), diferente dos nossos resultados encontrados para os animais de Minnesota (ZUR et al., 2002). Alguns cães apresentam manifestação sazonal nas fases iniciais da doença, entretanto, ao menos 50% destes com o passar do tempo passarão a manifestar sinais clínicos perenes, que é o padrão mais comum da dermatite atópica (NESBITT e ACKERMAN, 1998; MILLER et al., 2013).

Neste estudo, 222 cães (82,5%) foram submetidos à dieta hipoalergênica, destes apenas 26 (11,7%) apresentaram resposta positiva e confirmada pela recidiva do prurido após a reintrodução da dieta anterior. Os motivos para a não realização da dieta em 47 cães (17,5%) foram principalmente o não comprometimento dos proprietários com a dieta restrita ou mesmo a recusa em realizá-la quando proposto. Favrot e colaboradores demonstraram que DAIA e a DA sensu strictu possuem sinais clínicos indistinguíveis (FAVROT et al., 2010). Isto associado ao fato de alérgenos alimentares sabidamente serem considerados como possíveis desencadeadores de crises de dermatite atópica (HALLIWELL, 2006; OLIVRY et al., 2007), os autores consideraram que a não realização da dieta hipoalergênica não impossibilitou o diagnóstico dos mesmos como

atópicos. No presente estudo, os 26 cães (11,7%) que apresentaram DAIA também apresentaram sensibilização a alérgenos ambientais, já que foram submetidos a testes alérgicos para elaboração de imunoterapia quando possível e tratados com imunomoduladores quando houve necessidade. Outros estudos também demonstraram frequência de DAIA entre 10-20%, assim como o presente estudo (TARPATAKI et al., 2006; FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011). No Brasil, Iran e na Suiça, estudos demonstraram frequências (em torno de 3%) ainda menores de animais com hipersensibilidade a alimentos (PICCO et al., 2008; KHOSHNEGAH et al., 2013; SANTOS e SANTOS, 2016). Estima-se que em torno de 20% dos pacientes com dermatite atópica também sejam alérgicos a alérgenos alimentares, demonstrando melhora total ou parcial após a dieta de eliminação (NESBITT e ACKERMAN, 1998; MILLER et al., 2013). Os resultados do presente estudo estão abaixo desta estimativa relatada nos livros texto de referência em Dermatologia Veterinária, isso provavelmente se deve ao fato de os animais que apresentaram melhora total após a dieta de eliminação não terem sido incluídos na análise, já que não foram submetidos a testes alérgicos, um dos critérios de inclusão.

A grande maioria dos pacientes não apresentou nenhum sinal respiratório (80,67%). Dos sinais respiratórios, o mais comum foi rinite (17,47%), ainda que pouco frequente. Na literatura, a frequência relatada de rinite em cães com dermatite atópica é em torno de 7% (FAVROT et al., 2010; WILHEM et al, 2011), consideravelmente menor que no presente estudo. Entretanto, estes estudos envolvem cohortes maiores de animais e envolvem 15 países diferentes. A maior frequência de rinite nos pacientes do nosso estudo pode estar associada tanto ao menor número amostral quanto a características regionais dos cães que vivem no estado de Minnesota (EUA). Além disso, as alterações respiratórias, por serem pouco comuns em cães alérgicos, podem estar sendo subdiagnosticadas e dissociadadas da DA na rotina clínica. Por vezes, perguntas relacionadas ao sistema respiratório não fazem parte da anamnese dermatológica, nem mesmo é realizado exame clínico apropriado deste sistema durante consultas dermatológicas. Quarenta e oito (17,84%) dos cães do presente estudo apresentaram conjuntivite associada aos sinais clínicos de dermatite atópica. Em outros estudos, a frequência de conjuntivite nos cães atópicos foi em torno de 20%, semelhante ao resultado encontrado neste estudo (FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011). Entretanto, em um estudo realizado por veterinários oftalmologistas, a frequência de conjuntivite nos pacientes caninos atópicos avaliados foi de aproximadamente 60%, sugerindo que a conjuntivite pode ser uma subdiagnosticada principalmente entre os dermatólogos (LOURENÇO-MARTINS et al., 2011). Isto posto, os resultados do presente estudo atentam para a necessidade de atenção por parte dos dermatólogos a alterações extracutâneas que podem estar relacionadas à dermatite atópica, como a rinoconjuntivite, e por vezes necessitam tratamento adequado associado ao controle da alergopatia de base.

A idade média de aparecimento da dermatite atópica foi de 20,20 meses (D.P. = 17,80), mínima de três meses e máxima de 144 meses. Estes resultados estão de acordo com outros estudos publicados (ZUR et al., 2002; TARPATAKI et al., 2006; FAVROT et al., 2010; WILHEM et al, 2011; BRUET et al., 2012) e o aparecimento dos sinais clínicos antes dos três anos de idade é um dos fatores de risco para dermatite atópica propostos nos critérios de Favrot (FAVROT et al., 2010). Quando comparamos as idades de surgimento dos sinais clínicos entre os cães com DAIA e DA sensu stricto, não observamos diferença significativa, diferente do que foi concluído por outros estudos (PICCO et al., 2008; FAVROT et al., 2010) que demonstraram que a DAIA tende surgir mais cedo que a DA sensu stricto.

As raças com maior predisposição ao desenvolvimento de dermatite atópica neste estudo não foram de acordo com outras publicações (ZUR et al., 2002; TARPATAKI et al., 2006; PICCO et

al., 2008; JAEGER et al., 2010; BRUET et al., 2012) e incluíram o american Staffordshire terrier, o buldogue inglês e o soft cotton wheaten terrier. Um estudo realizado na Austrália por Mazrier e colaboradores na Universidade de Sidney, também observou maior risco de desenvolvimento de dermatite atópica nestas raças (MAZRIER et al., 2016) e Favrot e colaboradores relatam super-representação de buldogues entre seus cães atópicos (FAVROT et al., 2010). O pug apresentou um valor de *p* marginalmente significativo (*p*=0,052), apesar de não ter havido significância estatística, provavelmente este dado apresenta relevância já que é uma raça citada na literatura como predisposta à doença (MAZRIER et al., 2016). As raças mais numerosas no estudo tiveram sua frequência muito similar à da população geral atendida no hospital durante o período de 2007-2015, já que são raças muito comuns no país. Desta forma, a super-representação destas no nosso banco de dados de cães atópicos (labrador retrievers, pastores alemães e golden retrievers) se deu apenas pelo fato de serem raças comuns e numerosas, não por uma real predisposição dos mesmos à doença. Além disso, diferenças de predisposição racial são esperadas, pois varia significativamente de acordo a localização geográfica (JAEGER et al., 2010; MAZRIER et al., 2016).

A média do grau de prurido estimado pelos proprietários na primeira visita foi 6,51(D.P.= 2,06), caracterizado como prurido grave e foi muito semelhante à encontrada em outros estudos, antes dos tratamentos serem iniciados (BRUET et al., 2012; COSGROVE et al., 2015; MOYAERT et al., 2017). Não foram encontrados estudos na literatura para comparar os resultados obtidos para o número de áreas afetadas na primeira visita. A maioria dos estudos avaliando extensão de lesões em cães utiliza algum sistema de escore, por exemplo CADESI IV (OLIVRY et al., 2014), como forma de avaliação e não somente o número de áreas afetadas. Contudo, neste estudo não foi possível a utilização deste método, pois ele leva em consideração a localização, o tipo e a intensidade das lesões e estas informações não estavam disponíveis de forma padronizada no banco de dados, por se tratar de um estudo retrospectivo. Ao longo do tempo, houve redução significativa no grau de prurido e número de áreas afetadas, indicando que o tratamento foi eficaz na redução da intensidade dos sinais clínicos, como esperado. O mesmo pode ser observado em outros estudos avaliando eficácia de tratamentos diversos (BRUET et al., 2012; COSGROVE et al., 2015; MOYAERT et al., 2017).

Em relação às regiões corpóreas afetadas, observou-se que as mais comumente acometidas foram a região interdigital, coxas, abdômen, região perilabial, dorso, região inguinal, axilas e orelhas. e estes resultado está de acordo com o que foi relatado em outros estudos (FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011; BRUET et al., 2012; HENSEL et al., 2015). Todas estas áreas as relatadas nos livros-texto de referência em dermatologia veterinária como as preferenciais na topografia da dermatite atópica, possivelmente por serem regiões com maior rarefação pilosa e menor espessura da epiderme, tornando mais fácil a penetração de alérgenos (NESBITT e ACKERMAN, 1998; MILLER et al., 2013; LARSSON e LUCAS, 2015).

A maior parte dos pacientes foi tratada com um protocolo classificado como escore 1 (30%) ou escore 2 (65%). Em apenas 5% foi necessária a associação do escore 3. Estes protocolos foram selecionados para utilização a longo prazo nos pacientes e estão de acordo com o consenso de tratamento de dermatite atópica mais recente (OLIVRY et al., 2015). Neste consenso, a ICADA recomenda com evidências de eficácia o uso dos glicocorticoides, ciclosporina e oclacitinib no manejo crônico da dermatite atópica canina. Em relação ao uso de anti-histamínicos, o consenso classifica como intervenções provavelmente pouco ou nada eficazes no manejo crônico da dermatite atópica em cães e recomenda seu uso a longo prazo para a prevenção da degranulação de mastócitos, de maneira adjuvante no tratamento. Em relação à suplementação com ácidos

graxos essenciais, também são considerados como agentes que podem promover uma melhora discreta nos sinais clínicos da doença, principalmente associado à melhora na barreira cutânea, mas sua utilização em monoterapia não é recomendada. Dentre os imunomodulares mais utilizados, a prednisona em dias alternados foi a mais frequente (32,5%), seguida pela ciclosporina A (20,0%). Estes resultados provavelmente diferem do que ocorre na rotina atual, no ano de 2018, já que outras drogas imunomoduladoras como o oclacitinib e o lokivetmab estão disponíveis. Durante a maior parte do período entre 2007-2015, nos EUA, só estavam registrados para o tratamento da dermatite atópica canina os glicocorticoides e a ciclosporina A. Entretanto, a eficácia da ciclosporina A no controle da doença ocorre em aproximadamente 60% dos pacientes (FORSYTHE & PATERSON, 2014), além de apresentar maior custo na manutenção do paciente atópico ($50-$170 dólares americanos para 30 dias de tratamento, https://www.1800petmeds.com/Atopica+For+Dogs-prod10658.html, consulta em 19/11/2017) quando comparada à prednisona ($10-$15 dólares americanos para 30 dias de tratamento, https://www.1800petmeds.com/Atopica+For+Dogs-prod10658.html, consulta em 19/11/2017). Cerca em 80% dos cães atópicos apresentam prurido responsivo à corticosteroides (FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011) e a prednisona, na menor dose e intervalo mais longo possível, é o de escolha entre os glicocorticoides por não ser de depósito, apresentar menor potência e consequentemente menos intensidade de efeitos colaterais (OLIVRY et al., 2015). O oclacitinib apresentou baixa frequência de utilização porque só foi lançado em 2013, assim como o lokivetmab que só está disponível nos EUA a partir de 2015. Em relação à ASIT, a eficácia relatada deste tratamento em cães com dermatite atópica é moderada, em torno de 60-70%. Todavia, é recomendada pela ICADA como uma modalidade terapêutica segura e capaz de modificar o curso da doença, ou ao menos reduzir a dose de drogas imunomoduladoras a longo prazo (OLIVRY et al., 2015). A frequência de utilização de ASIT nos pacientes do presente estudo foi 71,69%, semelhante à eficácia relatada na literatura (MILLER et al., 2013; OLIVRY et al., 2015). A ASIT é considerada uma das principais abordagens terapêuticas para a dermatite atópica e a de escolha de alguns autores, que consideram que deve ser sempre encorajada pelos profissionais devido à sua segurança e capacidade de modificação do curso da doença sem os efeitos colaterais indesejados dos imunomoduladores (MILLER et al., 2013; LARSSON e LUCAS, 2015; PUCHEU-HASTON, 2016) e a alta frequência da utilização de ASIT nos pacientes deste estudo corrobora com estas recomendações.

Quando as variáveis epidemiológicas foram comparadas ao CADSI, não foram encontradas diferenças significativas, exceto para a resposta à dieta hipoalergênica. Os cães que apresentaram melhora após a dieta de eliminação, confirmada pela recidiva do prurido após a reintrodução da dieta anterior, apresentaram um CADSI significativamente maior que os que não responderam positivamente. As proteínas alimentares estão associadas aos alérgenos ambientais na patogênese da dermatite atópica destes pacientes, indicando uma maior amplitude de sensibilização a alérgenos, maior intensidade da resposta imune de hipersensibilidade e, consequentemente, maior gravidade da doença. Outros estudos demonstraram que a DAIA e a DA sensu stricto são indistinguíveis clinicamente (PICCO et al., 2008; FAVROT et al., 2010). O presente estudo confirma o que foi concluído anteriormente, já que não foram observadas diferenças clínico-epidemiológicas entre estes dois grupos de cães. Entretanto, quando as variáveis prurido e áreas afetadas foram analisadas em conjunto no CADSI, observou-se maior de gravidade da dermatite atópica nos pacientes com DAIA. Não foram encontrados na literatura estudos com metodologia semelhante para discutir esses resultados. Sendo assim, mais estudos são necessários para validar o CADSI como um eficiente indicador preditor de gravidade da doença e ratificar os resultados encontrados no presente estudo.

CONCLUSÕES

A partir dos resultados expostos, pode-se concluir que as características epidemiológicas da dermatite atópica do grupo amostral de Minnesota (EUA) estão de acordo com o relatado na literatura, em quase todos os parâmetros, exceto pela maior frequência de rinite. Este dado é relevante e chama a atenção dos clínicos e dermatológos para esta e outras alterações não dermatológicas, como a conjuntivite, que podem estar relacionadas à dermatite atópica e são muitas vezes sub-diagnosticadas. As raças de cães mais suscetíveis foram o American Staffordshire terrier, o buldogue Inglês e o soft cotton wheaten terrier. Além disso, observou-se maior índice de gravidade (CADSI) nos pacientes com dermatite atópica induzida por alimentos, o que pode sugerir maior hiper-reatividade do sistema imune tegumentar nestes pacientes.

REFERÊNCIAS

A. NØDTVEDT; A. EGENVALL; K. BERGVAL; Å HEDHAMMAR. Incidence of and risk factors for atopic dermatitis in a Swedish popuplation of insured dogs. **Veterinary Record**, v. 159, p. 241–246, 2006.

BIZIKOVA, P.; SANTORO, D.; MARSELLA, R.; NUTTALL, T.; EISENSCHENK, M. N. C.; PUCHEU-HASTON, C. M. Review: Clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 26, p. 79–83, 2015.

BRENNINKMEIJER, E. E. A.; SPULS, P. I.; LEGIERSE, C. M.; LINDEBOOM, R.; SMITT, J. H. S.; BOS, J. D. Clinical differences between atopic and atopiform dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 3, p. 407–414, 2008.

BRUET, V.; BOURDEAU, P. J.; ROUSSEL, A.; IMPARATO, L.; DESFONTIS, J. C. Characterization of pruritus in canine atopic dermatitis, flea bite hypersensitivity and flea infestation and its role in diagnosis. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 6, 2012.

CHANTE, K.; SILVERBERG, J. I.; DELLAVALLE, R. P. Defining intrinsic vs. extrinsic atopic dermatitis. **Dermatology Online Journal**, v. 21, n. 6, p. 4–8, 2015.
CHOI, S. J.; SONG, M. G.; SUNG, W. T.; LEE, D. Y.; LEE, J. H.; LEE, E. S.; YANG, J. M. Comparison of Transepidermal Water Loss, Capacitance and pH Values in the Skin between Intrinsic and Extrinsic Atopic Dermatitis Patients. **Journal of Korean Medical Science**, v. 18, n. 1, p. 93–96, 2003.

COSGROVE, S. B.; CLEAVER, D. M.; KING, V. L.; GILMER, A. R.; DANIELS, A. E.; WREN, J. A.; STEGEMANN, M. R. Long-term compassionate use of oclacitinib in dogs with atopic and allergic skin disease: Safety, efficacy and quality of life. **Veterinary Dermatology**, v. 26, n. 3, p. 171-e35, 2015.

DECKERS, I. A. G.; MCLEAN, S.; LINSSEN, S.; MOMMERS, M.; VAN SCHAYCK, C. P.; SHEIKH, A. Investigating International Time Trends in the Incidence and Prevalence of Atopic Eczema 1990–2010: A Systematic Review of Epidemiological Studies. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e39803, 2012.

FAVROT, C.; STEFFAN, J.; SEEWALD, W.; PICCO, F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 1, p. 23–31, 2010.

FORSYTHE, P.; PATERSON, S. Ciclosporin 10 years on: indications and efficacy. **The Veterinary record**, v. 174 Suppl, 2014.
HALLIWELL, R. Revised nomenclature for veterinary allergy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 114, n. 3–4, p. 207–208, 2006.

HENSEL, P.; SANTORO, D.; FAVROT, C.; HILL, P.; GRIFFIN, C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 196, 2015. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1746-6148/11/196>.
HILL, P. B.; DEBOER, D. J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): Environmental allergens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, n. 3–4, p. 169–186, 2001.

HILL, P. B.; LO, A.; EDEN, C. A. N.; HUNTLEY, S.; MOREY, V.; RAMSEY, S.; RICHARDSON, C.; SMITH, D. J.; SUTTON, C.; TAYLOR, M. D.; THORPE, E.; TIDMARSH, R.; WILLIAMS, V. Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. **The Veterinary record**, v. 158, n. 16, p. 533–9, 2006.

HILLIER, A.; GRIFFIN, C. E. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): Incidence and prevalence. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, n. 3–4, p. 147–151, 2001.

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

KHOSHNEGAH, J.; MOVASSAGHI, A. R.; RAD, M. Survey of dermatological conditions in a population of domestic dogs in Mashhad, northeast of Iran (2007-2011). **Veterinary research forum : an international quarterly journal**, v. 4, n. 2, p. 99–103, 2013.

KULTHANAN, K.; BOOCHANGKOOL, K.; TUCHINDA, P.; CHULAROJANAMONTRI, L. Clinical features of the extrinsic and intrinsic types of adult-onset atopic dermatitis. **Asia Pacific allergy**, v. 1, n. 2, p. 80–6, 2011.

LARSSON, C. E.; LUCAS, R. **Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária**. 1. ed. São Caetano do Sul: Interbook, 2015.

LEUNG, D. Y. M.; BIEBER, T. Atopic dermatitis. **Lancet**, v. 361, n. 9352, p. 151–160, 2003.

LOURENÇO-MARTINS, A. M.; DELGADO, E.; NETO, I.; PELETEIRO, M. C.; MORAIS-ALMEIDA, M.; CORREIA, J. H. D. Allergic conjunctivitis and conjunctival provocation tests in atopic dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 14, n. 4, p. 248–256, 2011.

MAZRIER, H.; VOGELNEST, L. J.; THOMSON, P. C.; TAYLOR, R. M.; WILLIAMSON, P. Canine atopic dermatitis: Breed risk in Australia and evidence for a susceptible clade. **Veterinary Dermatology**, v. 27, n. 3, p. 167-e42, 2016.

MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K. L. **Small Animal Dermatology**. [s.l.] Elsevier, 2013.

MOYAERT, H.; VAN BRUSSEL, L.; BOROWSKI, S.; ESCALADA, M.; MAHABIR, S. P.; WALTERS, R. R.; STEGEMANN, M. R. A blinded, randomized clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to ciclosporin in client-owned dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, p. 1–13, 2017.

NESBITT, G. H.; ACKERMAN, L. J. **Canine & Feline Dermatology**. Trenton: Veterinay Learning Systems, 1998.

NØDTVEDT, A.; BERGVALL, K.; HEDHAMMAR, Å.; EGENVALL, A. Incidence of and risk factors fo atopic dermatitis in a swedish population of insured dogs. **Veterinary Record**, v. 159, n. 8, p. 241–246, 2006.

NOVAK, N.; BIEBER, T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 2, p. 252–262, 2003.

NUTTALL, T. J.; HILL, P. B.; BENSIGNOR, E.; WILLEMSE, T. House dust and forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 17, n. 4, p. 223–235, 2006.

OLIVRY, T.; DEBOER, D. J.; FAVROT, C.; JACKSON, H. a.; MUELLER, R. S.; NUTTALL, T.; PRÉLAUD, P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). **BMC Veterinary Research**, v. 11, n. 1, p. 210, 2015.

OLIVRY, T.; DEBOER, D. J.; PRÉLAUD, P.; BENSIGNOR, E. Food for thought: pondering the relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. **Veterinary Dermatology**, v. 18, n. 6, p. 390–391, 2007.

OLIVRY, T.; SARIDOMICHELAKIS, M.; NUTTALL, T.; BENSIGNOR, E.; GRIFFIN, C. E.; HILL, P. B. Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 77-e25, 2014.

OTT, H.; STANZEL, S.; OCKLENBURG, C.; MERK, H. F.; BARON, J. M.; LEHMANN, S. Total serum IgE as a parameter to differentiate between intrinsic and extrinsic atopic dermatitis in children. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 89, n. 3, p. 257–261, 2009.

OTT, H.; WILKE, J.; BARON, J. M.; HÖGER, P. H.; FÖLSTER-HOLST, R. Soluble immune receptor serum levels are associated with age, but not with clinical phenotype or disease severity in childhood atopic dermatitis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV**, v. 24, n. 4, p. 395–402, 2010.

PICCO, F.; ZINI, E.; NETT, C.; NAEGELI, C.; BIGLER, B.; RÜFENACHT, S.; ROOSJE, P.; GUTZWILLER, M. E. R.; WILHELM, S.; PFISTER, J.; MENG, E.; FAVROT, C. A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 3, p. 150–155, 2008.

PÓNYAI, G.; HIDVÉGI, B.; NÉMETH, I.; SAS, A.; TEMESVÁRI, E.; KÁRPÁTI, S. Contact and aeroallergens in adulthood atopic dermatitis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 22, n. 11, p. 1346–1355, 2008.

PRELAUD, N.; COCHET-FAIVRE, N. A retrospective study of 21 cases of canine atopic-like dermatitis. **Blackwell Publishing, Ltd. 22nd Annual Congress of the ESVD-ECVD**, v. 18, n. September, p. 385, 2007.

PUCHEU-HASTON, C. M. Atopic dermatitis in the domestic dog. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 2, p. 299–303, 2016.

PUCHEU-HASTON, C. M.; BIZIKOVA, P.; EISENSCHENK, M. N. C.; SANTORO, D.; NUTTALL, T.; MARSELLA, R. Review: The role of antibodies, autoantigens and food allergens in canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 26, n. 2, p. 115-e30, 2015.

RYBNÍČEK, J.; LAU-GILLARD, P. J.; HARVEY, R.; HILL, P. B. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 115–122, 2009.
SAITO, E. K.; RHOADS, C. Prevalência de atopica canina. **Veterinary Focus**, v. 25, n. 2, p. 26–28, 2012.

SANTOS, M. G. O.; SANTOS, M. M. Perfil da dermatite atópica canina em Salvador - Brasil. p. 839–843, 2016.

SCHMID, P.; SIMON, D.; SIMON, H. . Epidemiology , clinical features , and immunology of the “‘ intrinsic ’” (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). **Allergy**, v. 56, p. 841–849, 2001.

SON, J. H.; CHUNG, B. Y.; KIM, H. O.; PARK, C. W. Clinical Features of Atopic Dermatitis in Adults Are Different according to Onset. **@BULLET J Korean Med Sci**, v. 32, p. 1360–1366, 2017.

TARPATAKI, N.; PÁPA, K.; REICZIGEL, J.; VAJDOVICH, P.; VÖRÖS, K. Prevalence and features of canine atopic dermatitis in Hungary. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 54, n. 3, p. 353–366, 2006.

WEIDINGER, S.; NOVAK, N. Atopic dermatitis. **The Lancet**, v. 387, n. 10023, p. 1109–1122, 2016.

WILHEM, S.; KOVALIK, M.; FAVROT, C. Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 22, n. 2, p. 143–149, 2011.

WILLIAMS, H.; STEWART, A.; VON MUTIUS, E.; COOKSON, W.; ANDERSON, H. R. Is eczema really on the increase worldwide? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 4, 2008.

WOLFF, K.; GOLDSMITH, L. A.; KATZ, S. I.; GILCHREST, B. A.; PALLER, A. S.; LEFFELL, D. J. **Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine**. Seventh ed. [s.l.] McGraw-Hill Companies, 2008.

YAMAGUCHI, H.; HIRASAWA, N.; ASAKAWA, S.; OKITA, K.; TOKURA, Y. Intrinsic atopic dermatitis shows high serum nickel concentration. **Allergology International**, v. 64, n. 3, p. 282–284, 2015.

ZUR, G.; WHITE, S. D.; IHRKE, P. J.; KASS, P. H.; TOEBE, N. Canine atopic dermatitis : a retrospective study of 266 cases examined at the University of California , Davis , 1992 – 1998 . Part I .Clinical features and allergy testing results. **Science**, p. 103–111, 2002.

CAPÍTULO III

Comparação das características clínicas e epidemiológicas de dermatite atópica e dermatite atópica-like em cães atendidos em um hospital veterinário universitário em Saint Paul, Minnesota/USA, entre 2007 e 2015

Resumo

Em humanos, a dermatite atópica pode ser dividida em extrínseca (EAD) e intrínseca (IAD), dependendo da presença ou ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos, respectivamente. As manifestações clínicas dos dois tipos são muito similares. Entretanto, observa-se que o grau de prurido e a intensidade das lesões cutâneas são mais leves em IAD quando comparado com EAD. Em cães dermatite atópica-like (ALD) apresenta manifestações clínicas indistinguíveis da dermatite atópica *sensu stricto* (AD). Entretanto, anticorpos IgE alérgeno-específicos não podem ser detectados na ALD, o que sugere que esta seja a correlata canina da IAD. De acordo com o conhecimento dos autores, os dados publicados na literatura referentes à ALD são escassos. O objetivo deste estudo foi descrever as características clínicas e epidemiológicas de cães com ALD e comparar com AD. Realizou-se um estudo retrospectivo dos prontuários de 269 cães atendidos em um hospital universitário em Minnesota (EUA), entre 2007 e 2015. Os pacientes foram divididos em dois grupos (ALD e AD) baseado nos resultados dos testes alérgicos. Se ambos os testes intradérmico e sorológico fossem negativos, os cães eram agrupados em ALD, se ao menos um fosse positivo, AD. Foram avaliados e comparados entre os grupos dados epidemiológicos, gravidade da doença de acordo com o grau de prurido, número de áreas afetadas, protocolo de tratamento de manutenção e resposta à terapia. A partir do grau médio de prurido e do número médio de áreas corpóreas ao longo das visitas, foi criado um índice de gravidade da dermatite atópica (CADSI) para avaliar a gravidade da doença em cada paciente e comparar entre os grupos ALD e AD. No grupo AD foram incluídos 228 cães (84,76%) e 41 no grupo ALD (15,24%). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos nas variáveis epidemiológicas. Em relação à predisposição racial, o Bichon Frisé apresentou mais risco de desenvolver ALD (O.R.=5,05; p = 0,024). Não houve diferença significativa no grau médio de prurido e número de áreas afetadas na primeira visita ($P \geq 0,4$) ou durante o tratamento ($P \geq 0.4$) entre os grupos, bem como na evolução dessas variáveis ao longo das visitas ($P \geq 0.06$), pois o grau de redução foi similar. Quando o CADSI foi comparado entre os grupos, não houve diferença (P = 0,353). Em conclusão, não foram encontradas diferenças clínico-epidemiológicas entre os grupos ALD e AD. Entretanto, estudos prospectivos com uma coorte maior de cães são necessários para ratificar os resultados encontrados.

Palavras-chave: atopia, dermatite atópica, dermatite atópica intríseca, dermatite atópica extrínseca, dermatite atópica-like, dermatologia, cães.

Abstract

In humans, atopic dermatitis is divided in two disease subsets, extrinsic atopic dermatitis (EAD) and intrinsic atopic-dermatitis (ALD), according to the presence of absence of allergen-specific IgE antibodies, respectively. The clinical features of EAD and IAD are very similar. However, it has been shown that the extent and severity of skin lesions and the pruritus level are milder in IAD compared to ALD patients. Canine atopic-like dermatitis (ALD) has identical clinical manifestations to atopic dermatitis *sensu stricto* (AD); however, allergen-specific IgE cannot be detected in this disease subset, suggesting that it can be the IAD's canine correlate. The study aim was to compare clinical and epidemiological features of dogs with ALD and AD. Atopic dogs with available intradermal and serum allergy test results were retrospectively selected in a veterinary teaching hospital in Minnesota (USA), from 2007-2015. Two hundred and sixty-nine dogs met the inclusion criteria and were divided in two groups, ALD or AD according to the allergy testing results. Dogs were enrolled in the ALD group if both allergy tests were negative and in the AD group if at least one test was positive. Epidemiological data, disease severity measured by pruritus level, number of body sites affected and maintenance therapy in addition to response to therapy were compared between the groups. In order to assess disease severity in each patient, the Canine Atopic Dermatitis Severity Index (CADSI) was created using the mean pruritus level and number of affected areas across visits. Two hundred and twenty-eight (84.76%) dogs were included in the AD group and 41 (15.24%) in the ALD. There were no significant differences between the groups regarding the epidemiological variables evaluated. The Bichon Frisé was predisposed to develop ALD (O.R.=5.05, $p = 0.024$). There were no differences in the mean pruritus scores and number of affected body sites at the first visit ($p \geq 0.4$) or during treatment ($p \geq 0.4$) between groups. There were no differences in the reductions of pruritus level and number of body sites affected ($p \geq 0.06$) during treatment between groups. When the CADSI was compared between groups, no differences were found as well ($p = 0.353$). In conclusion, no significant differences in the epidemiological data and clinical features evaluated were noted between dogs with ALD and AD. Prospective studies including larger number of dogs are needed to support our findings.

Keywords: atopy, atopic dermatitis, extrinsic atopic dermatitis, intrinsic atopic dermatitis, atopic-like dermatitis, dermatology, dogs.

INTRODUÇÃO

A dermatite atópica é uma dermatopatia inflamatória e pruriginosa associada a disfunções imunológicas e de barreira cutânea que resulta de uma interação entre fatores genéticos e ambientais (HALLIWELL, 2006; NOMURA & KABASHIMA, 2016; WEIDINGER & NOVAK, 2016). A prevalência da dermatite atópica em crianças está em torno de 20% e afeta 2-7% dos adultos (LEUNG e BIEBER, 2003; WILLIAMS et al., 2008; DECKERS et al., 2012; SON et al., 2017). Em cães, estima-se que a doença afeta 1-10% da população geral e 3-30% dos cães com doenças de pele (HILLIER e GRIFFIN, 2001; A. NØDTVEDT et al., 2006; HILL et al., 2006; KHOSHNEGAH et al., 2013).

Em humanos, a dermatite atópica é classificada em dois fenótipos de acordo com a presença ou ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos contra alérgenos alimentares ou ambientais. O tipo intrínseco (IAD), também denominado dermatite atópica não alérgica, eczema não atópico,

dermatite atopiforme ou síndrome dermatite/eczema não atópico (NOVAK e BIEBER, 2003; JOHANSSON et al., 2004; BRENNINKMEIJER et al., 2008), é caracterizado por demonstrar níveis séricos de IgE total normais e ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos séricos e evidenciados por reações positivas no teste de puntura com alérgenos alimentares e ambientais comuns. Além disto, indivíduos com IAD não apresentam doenças respiratórias associadas nem disfunção na barreira cutânea (CHOI et al., 2003; NOVAK e BIEBER, 2003; BRENNINKMEIJER et al., 2008; TOKURA, 2010; KULTHANAN et al., 2011; MORI, 2011). Por outro lado, o tipo extrínseco (EAD) ou dermatite/eczema atópico alérgico é caracterizado por altos títulos séricos de IgE total, presença de IgE alérgeno-específicos para alérgenos alimentares e ambientais comuns, disfunção de barreira cutânea e doenças respiratórias (CHOI et al., 2003; NOVAK e BIEBER, 2003; JOHANSSON et al., 2004; BRENNINKMEIJER et al., 2008; TOKURA, 2010; KULTHANAN et al., 2011).

A frequência de IAD varia entre 10-45% de todos os pacientes humanos com dermatite atópica (SCHMID et al., 2001; CHOI et al., 2003; NOVAK e BIEBER, 2003; FOLSTER-HOLST et al., 2006; PÓNYAI et al., 2008; OTT et al., 2009, 2010; KULTHANAN et al., 2011) e geralmente ocorre predominantemente em mulheres (SCHMID et al., 2001; NOVAK e BIEBER, 2003; BRENNINKMEIJER et al., 2008; TOKURA, 2010; KARIMKHANI et al., 2015). O aparecimento dos sintomas mais tardiamente também é uma característica de IAD, apesar dos bebês serem mais frequentemente afetados nos dois fenótipos (BRENNINKMEIJER et al., 2008; TOKURA, 2010; KULTHANAN et al., 2011; ROŻALSKI et al., 2016). As manifestações cutâneas dos dois tipos são muito semelhantes (BRENNINKMEIJER et al., 2008; TOKURA, 2010; KULTHANAN et al., 2011; KABASHIMA-KUBO et al., 2012; ROŻALSKI et al., 2016). Entretanto, tem sido demonstrado que a extensão e a intensidade das lesões e o grau de prurido são mais discretos em IAD comparado com EAD (FOLSTER-HOLST et al., 2006; BRENNINKMEIJER et al., 2008; TOKURA, 2010; KARIMKHANI et al., 2015; ROŻALSKI et al., 2016). Ademais, os pacientes com IAD aparentemente apresentam mais frequentemente as pregas infraorbitais de Dennie-Morgan, hiperpigmentação orbital, queilite, ictiose e dobras cervicais anteriores que os pacientes EAD (BRENNINKMEIJER et al., 2008; KULTHANAN et al., 2011; ROŻALSKI et al., 2016). Contudo, características usualmente não associadas com IAD incluem histórico pessoal ou familiar de atopia, doença respiratória, conjuntivite recorrente, hiperlinearidade palmar, pitiríase alba e queratose pilar (FOLSTER-HOLST et al., 2006; BRENNINKMEIJER et al., 2008; TOKURA, 2010; KULTHANAN et al., 2011; ROŻALSKI et al., 2016). É relevante notar que algumas destas características não associadas à ALD estão associadas à disfunção de barreira cutânea e mutações no gene da filagrina (BRENNINKMEIJER et al., 2008; TOKURA, 2010; KULTHANAN et al., 2011; ROŻALSKI et al., 2016).

Recentemente, tem sido demonstrada a predominância de resposta Th2 como uma característica de EAD, enquanto na IAD, ocorre um desvio no sentido de Th1 (SCHMID et al., 2001; TOKURA, 2010; ROGUEDAS-CONTIOS & MISERY, 2011; KABASHIMA-KUBO et al., 2012; ROŻALSKI et al., 2016). Os altos níveis de IFN-γ associados às respostas Th1 podem explicar, ao menos parcialmente, a ausência de anticorpos IgE alérgeno-específicos nos pacientes com IAD (SCHMID et al., 2001; TOKURA, 2010; ROGUEDAS-CONTIOS & MISERY, 2011; KABASHIMA-KUBO et al., 2012; ROŻALSKI et al., 2016). Ademais, a resposta com predomínio de Th1 e a função normal da barreira cutânea observadas em IAD sugerem ausência de sensibilização contra alérgenos protéicos, conhecidos por induzir respostas Th2, e sensibilização então a alérgenos de outra natureza, como metais e haptenos (TOKURA, 2010; KABASHIMA-KUBO et al., 2012; ROŻALSKI et al., 2016).

A dermatite atópica-like (ALD) é definida como uma doença cutânea inflamatória e pruriginosa com características clínicas idênticas às observadas na dermatite atópica (AD), em que anticorpos alérgeno-específicos a não podem ser documentados (HALLIWELL, 2006). Sendo assim, por definição, ALD pode ser considerada a correlata canina da IAD.

De acordo com os conhecimentos dos autores, existe apenas um estudo, publicado sob a forma de resumo, descrevendo e comparando as características clínicas e epidemiológicas de cães com AD e ALD (PRELAUD e COCHET-FAIVRE, 2007). Três outros estudos foram publicados (KAWANO et al., 2013; SUTO et al., 2015; FUJIMURA et al., 2016), mas o diagnóstico de ALD foi feito baseado nos resultados de teste intradérmico e/ou sorológico, não concomitantemente os dois como é rigorosamente exigido para satisfazer o critério de diagnóstico de ALD (HALLIWELL, 2006). Assim, o objetivo deste estudo foi comparar as características clínicas e epidemiológicas de ALD e AD em uma população de cães atópicos diagnosticados de acordo com a definição atual.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta de dados

Realizou-se um estudo retrospectivo das fichas clínicas dos cães atendidos entre 2007-2015 na University of Minnesota (UMN), College of Veterinary Medicine, Minnesota/USA. Para a seleção dos prontuários dos cães, realizou-se uma busca no sistema do hospital veterinário, utilizando-se das seguintes palavras-chave: dermatite atópica, atopia, alergia, teste alérgico intradérmico (IDT), teste alérgico sorológico (SE) cão e canino. A partir desta busca, 2.691 casos foram recrutados inicialmente e posteriormente, criteriosamente selecionados a partir dos seguintes critérios: (i) diagnóstico de dermatite atópica por um dermatologista certificado pelo *American College of Veterinary Dermatology* (ACVD) e (ii) registros de realização de testes alérgicos utilizando IDT e SE ambos na mesma consulta. Baseado no critério (i), 1.233 cães foram selecionados. Após a aplicação do critério (ii), foram selecionados 275 casos e seis destes foram excluídos, pois não apresentavam os resultados dos testes alérgicos acessíveis. Desta forma, 269 casos foram incluídos no estudo. As seguintes informações foram extraídas dos prontuários: gênero, raça, idade de surgimento dos primeiros sinais clínicos, sazonalidade, presença de sinais respiratórios, presença de conjuntivite, realização de dieta hipoalergência, resposta à dieta hipoalergênica, porcentagem de tempo intradomiciliar, áreas corpóreas afetadas, grau de prurido e protocolos de tratamento utilizados.

Protocolos de testes alérgicos

O teste intradérmico (IDT) foi realizado após a tosquia de uma janela retangular na lateral do tórax dos cães, marcação dos pontos de aplicação e injeção intradérmica de 0,05ml de 65 alérgenos ambientais (Stallergens Greer®, Lenoir, NC, USA). As reações foram avaliadas 15 minutos após o término das aplicações e avaliadas subjetivamente em uma escala de intensidade de 0 a 4+, baseado nos controles negativo (salina) e positivo (histamina). Os cães foram sedados para o teste com dexmedetomidina por via endovenosa, na dose de 0,004 mg/kg. O teste sorológico (SE) foi realizado no laboratório de referência IDEXX, usando o kit de teste Greer Aller-g-complete® kit (Stallergenes Greer®, Lenoir, NC, USA). De acordo com os resultados dos testes alérgicos, os cães foram classificados como tendo dermatite atópica *sensu stricto* (AD) ou dermatite atópica-*like* (ALD). Os cães que não apresentaram nenhuma reação positiva em ambos IDT e SE, foram classificados como ALD, enquanto os que apresentaram uma ou mais reações

positivas no IDT e/ou no SE, foram classificados como AD. No IDT, foram consideradas positivas as reações que receberam uma graduação maior ou igual a 2+ e associadas a eritema. Já no SE, foram consideradas positivas as reações maiores ou iguais a 300 EAU (*Elisa Absorbance Units*), segundo recomendações do laboratório IDEXX (Idexx Laboratories, Inc. Westbrook, Maine, USA).

Grupos experimentais

Primeiramente, os dados de todos os cães diagnosticados com dermatite atópica (*n*=269*)* foram analisados em conjunto para se avaliar as características epidemiológicas e a severidade da doença de forma geral. Posteriormente, os cães foram divididos em dois grupos, AD (dermatite atópica) e ALD (dermatite atópica-like) baseado no resultado dos testes alérgicos. Os cães que não apresentaram nenhuma reação positiva em ambos IDT e SE, foram agrupados como ALD, enquanto os que apresentaram uma ou mais reações positivas no IDT e/ou no SE, foram agrupados como CAD. No IDT, foram consideradas positivas as reações que receberam uma graduação maior ou igual a 2+ e associadas a eritema. Já no SE, foram consideradas positivas as reações maiores ou iguais a 300 EAU (*Elisa Absorbance Units*), segundo recomendações do laboratório IDEXX.

Delineamento experimental e análise estatística

Inicialmente, os dados epidemiológicos de todos os 269 pacientes incluídos no estudo foram descritos. Nesta análise, as variáveis de interesse inclusas foram: sexo e status reprodutivo, raça, idade de surgimento dos primeiros sinais clínicos, sazonalidade dos mesmos, classificação como AD ou ALD, presença de sinais respiratórios, presença de conjuntivite, realização de dieta hipoalergência, resposta à dieta hipoalergênica e porcentagem de tempo intradomiciliar.

Posteriormente, objetivou-se descrever e comparar entre os grupos AD e ALD a gravidade das manifestações clínicas e a resposta ao protocolo de tratamento empregado. Como esta é uma doença crônica e multifatorial, nem sempre é possível se atingir o controle dos sinais clínicos no primeiro protocolo de tratamento prescrito. Desta forma, estabeleceu-se que apenas os animais com um mínimo de quatro consultas de acompanhamento poderiam ser incluídos nesta parte do experimento, pois os autores consideram que este é um número mínimo médio adequado para se atingir a terapia de manutenção. Sendo assim, 175 casos preencheram este critério estabelecido.

Para avaliar as diferenças na gravidade da dermatite atópica antes do início do tratamento, a média do grau de prurido e o número de áreas corpóreas afetadas na primeira visita foram comparados entre os grupos utilizando o teste de Mann-Whitney. A intensidade do prurido, graduada em uma escala de 0 a 10 (quanto mais próximo de 10, mais intenso), foi extraída dos prontuários e era fornecida pelos proprietários baseado em avaliação verbal, antes de 2009, ou através da escala de prurido analógica visual validada (PVAS) para cães, após 2009 (RYBNÍČEK et al., 2009). O grau de prurido foi posteriormente classificado em três categorias de gravidade, da seguinte forma: leve: 2.0-3.5; moderado: 3.6-5.5 e grave: 5.6-10 (Thierry Olivry, comunicação pessoal)[2]. Devido

[2] Thierry Olivry, comunicação pessoal por envio de manuscrito ainda não publicado de autoria dos membros da ICADA *(International Committee on Allergic Diseases of Animals*) pela lista de e-mails vetderm@lists.ncsu.edu

à natureza retrospectiva do estudo, não foi possível incluir a classificação das lesões na avaliação da gravidade da dermatite atópica, pois não havia padronização das descrições nos prontuários. Desta forma, avaliou-se a extensão das lesões nas regiões corpóreas, cada área afetada foi contabilizada como um local.

O protocolo de tratamento utilizado na manutenção dos pacientes também foi avaliado e classificado nos seguintes escores: 1: imunoterapia alérgeno-específica (ASIT) e/ou anti-histamínicos e/ou ácidos graxos essenciais; 2: uma droga imunomoduladora (glicocorticoides por via oral, ciclosporina, oclacitinib, lokivetmab); 3: duas ou mais drogas imunomoduladoras associadas. Foi considerado tratamento de manutenção o protocolo terapêutico capaz de controlar a doença ao longo do tempo, tendo sido utilizado com maior frequência. Para se avaliar a resposta ao protocolo terapêutico de forma indireta e comparar entre os grupos AD e ALD, utilizou-se um modelo de regressão marginal linear para prurido e número de áreas corpóreas afetadas. Neste modelo, realiza-se a contabilização da correlação entre medidas repetidas.

Finalmente, objetivou-se criar um indicador de gravidade para dermatite atópica que pudesse representar a severidade da doença de acordo inicialmente com as variáveis "grau médio de prurido ao longo das visitas", "número médio de áreas corpóreas afetadas ao longo das visitas" e "escore de tratamento". Entretanto, após realização da primeira análise, verificou-se que o escore de tratamento exercia peso próximo a zero no índice de gravidade. Desta forma, decidiu-se por incluir apenas as variáveis "grau médio de prurido ao longo das visitas" e "número médio de áreas corpóreas afetadas ao longo das visitas". O indicador de gravidade foi criado a partir do método de análises das Componentes Principais. Posteriormente, o índice foi comparado entre os grupos através do teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis.

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* R versão 3.2.4 (R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/> R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014). Os resultados foram considerados significativos quando o valor de $P \geq 0.05$.

RESULTADOS

Dados epidemiológicos

Duzentos e vinte e oito cães (84,76%) foram classificados como AD e 41 (15,24%) como ALD. Não foram observadas diferenças entre os grupos nas variáveis epidemiológicas apresentadas na tabela 1.

Tabela 1. Comparação das variáveis epidemiológicas entre os grupos AD e ALD de animais com dermatite atópica, atendidos no hospital universitário da University of Minnesota, Minnesota/EUA, entre 2007 e 2015.

Variáveis		Todos os cães		ALD		AD		OR	I.C. - 95%	Valor-*p**
		N	%	N	%	N	%			
Sexo	Fêmea	128	47,6	19	46,3	109	47,8	1,00	-	0,863†
	Macho	141	52,4	22	53,7	119	52,2	0,94	[0,48;1,84]	
Sinais respiratórios	Nenhum	217	80,7	32	78,1	185	81,1	1,00	-	0,393‡
	Rinite	47	17,47	8	19,5	39	17,10	0.82	[0,38;2,14]	
	Tosse	5	1,9	1	2,4	4	1,8	0,34	[0,08;3,46]	
Conjuntivite	Não	221	82,2	33	80,5	188	82,5	1,00	-	0,935†
	Sim	48	17,8	8	19,5	40	17,5	0,78	[0,37;1,93]	
Sazonalidade	Sazonal	97	36,1	11	26,8	86	37,7	1,00	-	0,181†
	Perene	172	63,9	30	73,2	142	62,3	0,61	[0,29;1,27]	
Realização de dieta hipoalergênica	Não	47	17,5	9	22,0	38	16,7	1,00	-	0,550†
	Sim	222	82,5	32	78,1	190	83,3	1,33	[0,65;3,22]	
Resposta positiva à dieta hipoalergênica	Não	196	88,3	29	90,6	167	87,9	1,00	-	1,000‡
	Sim	26	11,7	3	9,4	23	12,1	0,99	[0,36; 3,88]	
Variáveis		**Todos os cães Média (DP)**		**ALD Média (DP)**		**AD Média (DP)**		**O.R.**	**I.C. - 95%**	**Valor-*p****
Idade de surgimento da doença (meses)		20,2 (17,8)		15,8 (11,3)		21,0 (18,6)		1,02	[1,00; 1,05]	0,159§
% Indoors		84,2 (15,2)		87,1 (9,6)		83,6 (16)		0,14	[0,01; 2,55]	0,390§

*P < 0.05 foi considerado significativo; † Teste de Qui-Quadrado; ‡ Teste exato de Fisher; § Teste de Mann-Whitney. OR: *odds ratio*. I.C.: intervalo de confiança. AD: grupo dermatite atópica. ALD: grupo dermatite atópica-like. DP: desvio padrão; *n* = 269.

Quando todos os cães foram comparados à população geral atendida no hospital durante 2007 e 2015 (*n*=62,534), o American Staffordshire Terrier (OR=4,47, *p*=0,000), Buldogue Inglês (OR = 3,28, *p*=0,007) e Soft Cotton Wheaten Terrier (OR = 5,44, *p*=0.000) foram consideradas as raças com o maior risco de desenvolver dermatite atópica. Em relação aos grupos AD e ALD, observou-se que as seguintes raças foram mais predispostas à AD: Soft Cotton Wheaten Terrir (OR = 5,49; $p < 0.001$), American Staffordshire Terrier (OR= 5,49; $p < 0,001$), Buldogue Inglês (OR=3,89; $p = 0.003$) e Labrador Retriever (OR = 1.40; $p = 0.044$). O Bichon Frisé foi a única raça predisposta a desenvolver ALD (OR = 5,05; $p = 0,024$).

Comparação da gravidade da doença entre os grupos AD e ALD

O grau de prurido e o número de áreas corpóreas afetadas na primeira visita e o escore do tratamento de manutenção foram os parâmetros utilizados para avaliar a gravidade da doença antes do tratamento. Não foram observadas diferenças significativas (teste de Mann-Whitney, $p = 0,393$) na média do grau de prurido dos cães do grupo AD (6,5 ± 2,1; intervalo: 0 – 10) e do grupo ALD (6,9 ± 1,9; intervalo: 2 – 9 [Figura 1a]). Quando o grau de prurido foi classificado de acordo com as categorias de gravidade, a maioria dos cães em AD (70,4%) e ALD (81,2%) apresentavam prurido grave (5,6-10). Não houve diferença significativa entre os grupos (teste exato de Fisher, $p = 0,832$) nas frequências de casos com grau de prurido classificado em leve, moderado e grave (Figura 1b).

Não houve diferença significativa (teste de Mann-Whitney, $p = 0,393$) no número médio de áreas corpóreas afetadas entre os grupos AD (3,8 ± 1,8; intervalo: 0-11) e ALD (3,7 ± 2,6; intervalo = 0-8 [Figura 2]). Em relação aos protocolos terapêuticos utilizados, não foram observadas diferenças significativas (teste exato de Fisher, $p = 0,911$) entre os grupos AD e ALD nas frequências de cães recebendo cada modalidade terapêutica categorizada nos escores 1, 2 e 3 (Figura 3).

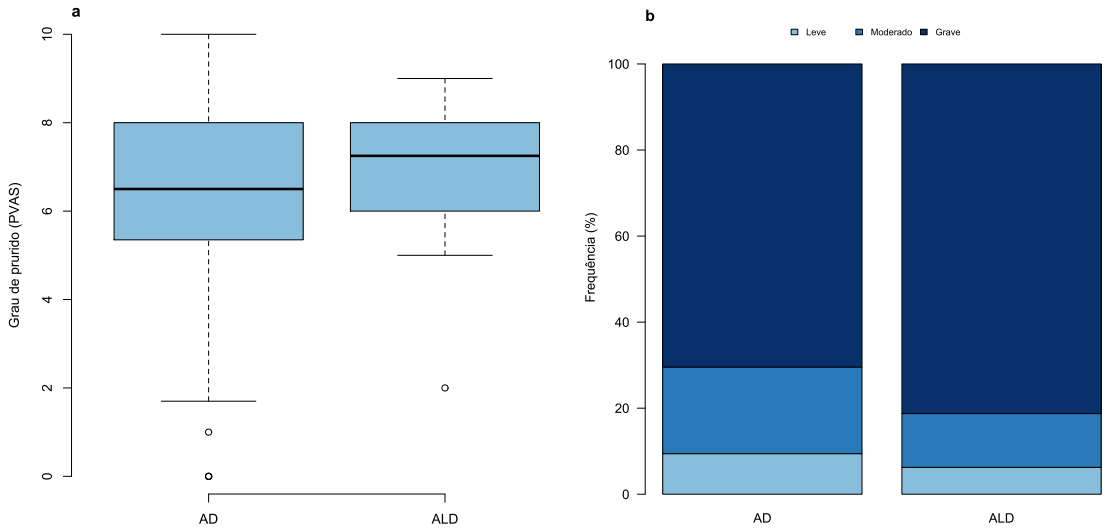

Figura 1. Número de cães incluídos nas análises = 175. (a) Box plot mostrando o grau médio de prurido dos cães dos grupos AD e ALD na primeira visita. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers*. (b) Frequência de cães dos grupos AD e ALD classificados em cada categoria de prurido na primeira visita. Leve: 2,0-3,5; Moderado: 3,6-5,5; Grave: 5,8-10,0.

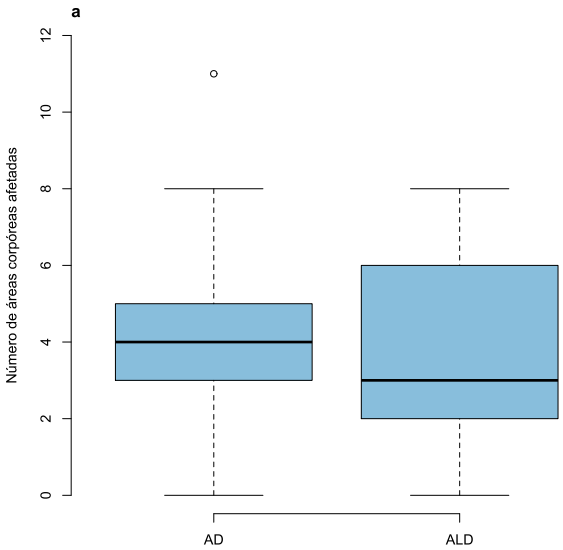

Figura 2. Box plot mostrando o número de áreas corpóreas afetadas em cães com dos grupos AD e ALD na primeira visita. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers.* Número de cães incluídos na análise = 175.

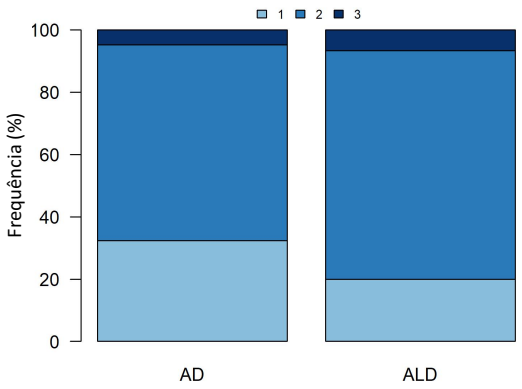

Figura 3. Frequência de cães dos grupos AD e ALD em cada escore de tratamento de manutenção. 1: imunoterapia alérgeno-específica (ASIT) e/ou anti-histamínicos e/ou ácidos graxos essenciais; 2: uma droga imunomoduladora (glicocorticoides por via oral, ciclosporina, oclacitinib, lokivetmab); 3: duas ou mais drogas imunomoduladoras associadas. Número de cães utilizados na amostra = 175.

Comparação da resposta ao tratamento entre os grupos AD e ALD

O grau de prurido e o número de áreas corpóreas afetadas dos cães ao longo das visitas, ou seja, durante o tratamento, foram utilizados como parâmetros para comparar a resposta ao tratamento entre os grupos AD e ALD. Não foram observadas diferenças significativas (teste de Mann-Whitney, $p = 0.440$) no grau médio de prurido entre os grupos AD (4,7 ± 1,4; intervalo: 1,1 – 10) e ALD (4,9 ± 1,1; range = 2,8 – 7,1 [Figura 4a]). Quando o grau médio de prurido foi classificado de acordo com as categorias de gravidade, a maioria dos cães em AD (51,6%) e ALD (68,8%) apresentou prurido moderado (3,8-5,5). Não houve diferença significativa entre os grupos (teste exato de Fisher, $p = 0,300$) nas frequências de casos com grau de prurido classificado em leve, moderado e grave (Figura 4b).

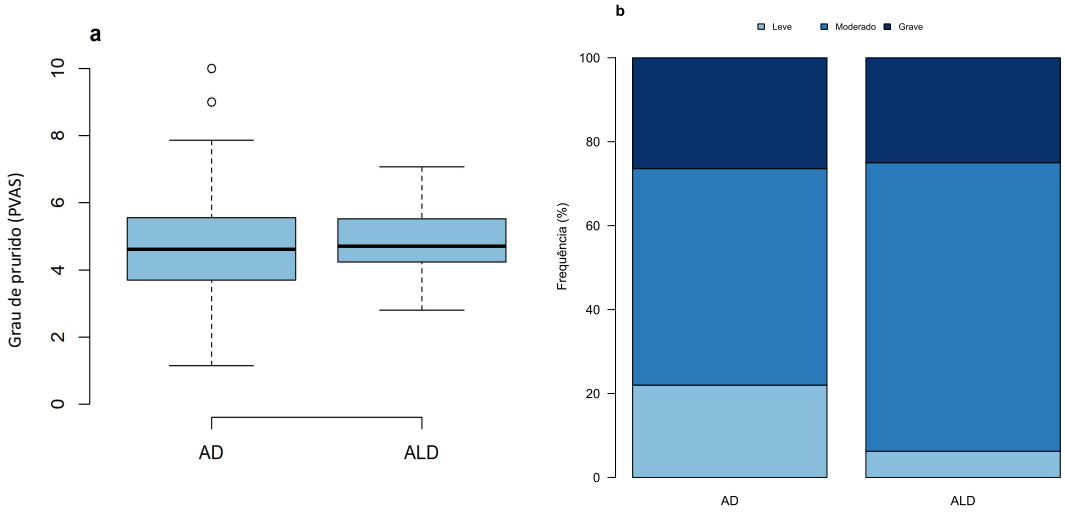

Figura 4. Número de cães incluídos nas análises = 175. (a) Box plot mostrando o grau médio de prurido dos cães dos grupos AD e ALD ao longo das visitas. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers*. (b) Frequência de cães dos grupos AD e ALD classificados em cada categoria de prurido ao longo das visitas. Leve: 2,0-3,5; Moderado: 3,8-5,5; Grave: 5,8-10,0.

Em relação ao número médio de áreas corpóreas afetadas, não houve diferença significativa (teste de Mann-Whitney, $p = 0,975$) entre os grupos AD (3,0 ± 1,2; intervalo: 0,4 – 8,5) e ALD (3,0 ± 1,4; intervalo = 1 – 5,8 [Figura 5]). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos AD e ALD na redução do grau de prurido (modelo de regressão marginal linear, $p = 0,365$) e do número de áreas corpóreas afetadas (modelo de regressão marginal linear, $p = 0,975$) ao longo das visitas.

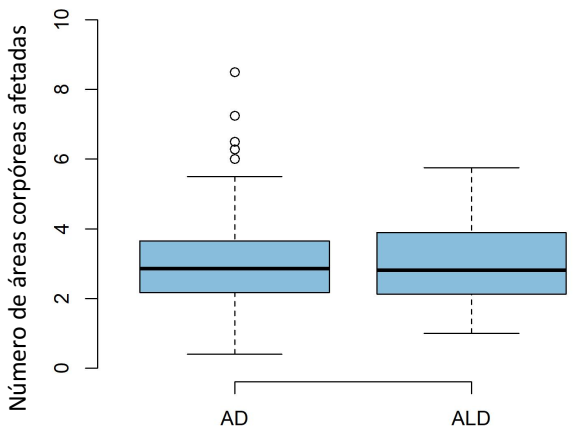

Figura 5. Box plot mostrando o número médio de áreas corpóreas afetadas em cães com dos grupos AD e ALD ao longo das visitas. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers*. Número de cães incluídos na análise = 175.

Comparação do indicador de severidade de dermatite atópica (CADSI) entre os grupos AD e ALD

De acordo com a Análise das Componentes Principais, observou-se que quanto forem os valores das variáveis, maior será o valor de CADSI. Observou-se também correlação de Spearman positiva entre grau de prurido e número de áreas afetadas (r = 0,18; p = 0,021). Cabe ressaltar que os indicadores foram padronizados para a escala de 0 a 1, sendo que valores mais próximos de 1 indicam maior gravidade da doença. Dessa forma, é possível observar que a média do indicador foi de 0,36 (D.P. = 0,16). Não houve diferença significativa na comparação entre os valores médios de CADSI dos cães dos grupos AD e ALD (teste de Mann-Whitney, p = 0,353).

DISCUSSÃO

No presente estudo, ALD representa 15,24% do banco de dados (41/269). A frequência é menor que a de 25,6% relatada por Prelaud e colaboradores (PRELAUD e COCHET-FAIVRE, 2007), mas está dentro dos 10-45% relatados em humanos com IAD (SCHMID et al., 2001; CHOI et al., 2003; NOVAK e BIEBER, 2003; PÓNYAI et al., 2008; OTT et al., 2009, 2010; KULTHANAN et al., 2011a). Além disso, diferente do que ocorre em humanos, em que é observada uma predisposição do sexo feminino em ambas EAD e IAD (SCHMID et al., 2001; NOVAK e BIEBER, 2003; BRENNINKMEIJER et al., 2008; KARIMKHANI et al., 2015; YAMAGUCHI et al., 2015), este estudo e o de Prelaud e colaboradores (PRELAUD e COCHET-FAIVRE, 2007) não encontraram diferenças significativas na distribuição dos sexos entre os grupos.

A idade média de surgimento dos sinais clínicos foi menor nos cães do grupo ALD (15,81; DP = 11,3) comparado aos do AD (21,0; DP = 18,6), entretanto, esta diferença não foi significativa estatisticamente (teste de Mann-Whitney, p = 0,159). Este resultado está de acordo com o que foi

observado por Prelaud e colaboradores (PRELAUD e COCHET-FAIVRE, 2007). Contudo, em pacientes humanos, foi demonstrado pacientes com IAD tendem a manifestar os sintomas da doença em idade mais avançada que EAD (SCHMID et al., 2001; FOLSTER-HOLST et al., 2006; BRENNINKMEIJER et al., 2008; TOKURA, 2010; CHANTE et al., 2015).

Em humanos, IAD é tipicamente não associada a outras doenças atópicas como asma, rinoconjuntivite e dermatite de contato (SCHMID et al., 2001; BRENNINKMEIJER et al., 2008; KULTHANAN et al., 2011; ROŻALSKI et al., 2016). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos AD e ALD em relação à presença de sinais respiratórios e conjuntivite, que foram infrequentes nos nossos pacientes caninos. Conjuntivite foi observada em 17,84% de todos os cães incluídos no estudo e resultados similares foram observados por Wilhem e colaboradores (WILHEM et al., 2011). Todavia, em um estudo conduzido por veterinários oftalmologistas e dermatologistas, a frequência de conjuntivite alérgica em cães atópicos foi de 60%, sugerindo que esta doença pode estar sendo subdiagnosticada, sobretudo entre dermatologistas (LOURENÇO-MARTINS et al., 2011).

As raças com maior predisposição ao desenvolvimento de dermatite atópica neste estudo não foram de acordo com outras publicações (ZUR et al., 2002; TARPATAKI et al., 2006; PICCO et al., 2008; JAEGER et al., 2010; BRUET et al., 2012) e incluíram o American Staffordshire Terrier, Buldogue Inglês e o Soft Cotton Wheaten Terrier. Entretanto, este resultado pode ser explicado uma vez que as predisposições raciais variam significativamente de acordo com a região geográfica. As raças mais predispostas no grupo AD são muito similares àquelas observadas para o grupo inteiro (n = 269) e isto é esperado já que este grupo compreendeu 85% dos cães. O Bichon Frisé foi a única raça predisposta ao desenvolvimento de ALD no presente estudo e o Buldogue Francês foi a única relatada por Prelaud e colaboradores (PRELAUD & COCHET-FAIVRE, 2007), indicando novamente variações regionais.

Pacientes humanos com IAD apresentam escores SCORAD, escore que avalia a gravidade das lesões cutâneas significativamente menores que EAD (FOLSTER-HOLST et al., 2006; BRENNINKMEIJER et al., 2008). Além disso, em um estudo, pacientes com IAD utilizavam tacrolimus, emolientes e anti-histamínicos com frequência significativamente menor que os EAD e relataram melhor qualidade de vida, indicando menor gravidade deste subtipo da dermatite atópica (BRENNINKMEIJER et al., 2008). No presente estudo, o número de áreas corpóreas afetadas e o grau de prurido na primeira visita, juntamente com o indicador CADSI, foram utilizados como parâmetros de avaliação da gravidade da doença. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros citados, ainda que no grupo ALD a frequência de cães apresentando prurido grave na primeira visita tenha sido relativamente maior que em no grupo AD (81,2% *vs* 70,4%). Prelaud e colaboradores (PRELAUD & COCHET-FAIVRE, 2007) também não observaram diferenças significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros clínicos por eles avaliados. Estes resultados sugerem que, em contraste com o que ocorre em humanos, AD e ALD apresentam gravidade similar. Entretanto, estudos retrospectivos com um maior número de cães, especialmente ALD, são necessários para corroborar com esta hipótese e para validar o CADSI como um eficiente indicador preditor de gravidade da dermatite atópica.

O grau de prurido e o número de áreas corpóreas afetadas também foram avaliados durante o tratamento, associados aos escores de tratamento utilizados para a manutenção, a fim de se avaliar indiretamente a resposta terapêutica. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos na média do grau de prurido e do número de áreas corpóreas ou na redução dos mesmos

ao longo das visitas, ou seja, durante o tratamento. Também não houve diferença na frequência da utilização de escores de tratamento de manutenção entre os grupos. Entretanto, apesar de não ter sido significativo estatisticamente, mais cães no grupo ALD (68,8% *vs* 51,6%) apresentaram prurido moderado e menos cães apresentaram prurido leve (6,20% *vs* 22,0%) ao longo das visitas, sugerindo que os cães do grupo ALD possam ser menos responsivos à terapia. Ademais, como a frequência de cada escore de tratamento entre os grupos AD e ALD foi muito similar (1: 30,6 % *vs* 25,0%; 2: 63,8% *vs* 68,8%; 3: 5,6% *vs* 6,3%, respectivamente), estas diferenças nas categorias de prurido tornam-se mais significantes, pois provavelmente não se deram por diferenças no protocolo terapêutico imunomodulador. É interessante notar que Prelaud e colaboradores (PRELAUD & COCHET-FAIVRE, 2007) não observaram nenhuma diferença entre os grupos na resposta aos glicocorticoides, no entanto, significativamente mais cães do grupo AD apresentaram boa resposta à ciclosporina comparado aos ALD (92% *vs* 50%). A relevância destes achados é desconhecida, até o momento.

CONCLUSÕES

Considerando a população de cães com dermatite atópica investigada, exceto a predisposição do bichon frisè à ALD, o presente estudo não encontrou diferenças significativas estatisticamente entre os grupos AD e ALD em nenhuma das variáveis clínicas ou epidemiológicas avaliadas. Devido às diferenças encontradas em relação à literatura humana, a hipótese de que ALD seja a correlata canina da IAD não pôde ser confirmada. Na primeira visita, os cães do grupo ALD apresentaram uma frequência maior de prurido grave que os AD. Ao longo do tratamento, a tendência geral da população foi reduzir o grau de prurido para um nível moderado. Entretanto, os cães de ALD apresentaram uma proporção maior de animais com prurido moderado e menor de prurido leve, quando comparados à AD. Apesar da ausência de significância estatística, estes achados podem indicar maior gravidade no prurido dos cães ALD antes do tratamento e menor resposta à terapia. No entanto, este estudo foi realizado retrospectivamente e com um número limitado de cães, principalmente no grupo ALD, o que torna desconhecida a relevância destes achados, no momento. Quiçá em uma coorte maior de cães, as diferenças entre AD e ALD possam tornar-se mais evidentes e significativas estatisticamente. Futuros estudos prospectivos com um maior grupo amostral são necessários para ratificar os resultados encontrados no presente estudo e investigar mais detalhadamente as diferenças fenotípicas e imunológicas dos dois possíveis subtipos da dermatite atópica.

REFERÊNCIAS

A. NØDTVEDT; A. EGENVALL; K. BERGVAL; Å HEDHAMMAR. Incidence of and risk factors for atopic dermatitis in a Swedish popuplation of insured dogs. **Veterinary Record**, v. 159, p. 241–246, 2006.

BRENNINKMEIJER, E. E. A.; SPULS, P. I.; LEGIERSE, C. M.; LINDEBOOM, R.; SMITT, J. H. S.; BOS, J. D. Clinical differences between atopic and atopiform dermatitis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 58, n. 3, p. 407–414, 2008.

BRUET, V.; BOURDEAU, P. J.; ROUSSEL, A.; IMPARATO, L.; DESFONTIS, J. C. Characterization of pruritus in canine atopic dermatitis, flea bite hypersensitivity and flea

infestation and its role in diagnosis. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 6, 2012.

CHOI, S. J.; SONG, M. G.; SUNG, W. T.; LEE, D. Y.; LEE, J. H.; LEE, E. S.; YANG, J. M. Comparison of Transepidermal Water Loss, Capacitance and pH Values in the Skin between Intrinsic and Extrinsic Atopic Dermatitis Patients. **Journal of Korean Medical Science**, v. 18, n. 1, p. 93–96, 2003.

DECKERS, I. A. G.; MCLEAN, S.; LINSSEN, S.; MOMMERS, M.; VAN SCHAYCK, C. P.; SHEIKH, A. Investigating International Time Trends in the Incidence and Prevalence of Atopic Eczema 1990–2010: A Systematic Review of Epidemiological Studies. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, p. e39803, 2012.

FOLSTER-HOLST, R.; PAPE, M.; BUSS, Y. L.; CHRISTOPHERS, E.; WEICHENTHAL, M. Low prevalence of the intrinsic form of atopic dermatitis among adult patients. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 61, n. 5, p. 629–632, 2006.

FUJIMURA, M.; NAKATSUJI, Y.; ISHIMARU, H. Cyclosporin A Treatment in Intrinsic Canine Atopic Dermatitis (Atopic-like Dermatitis): Open Trial Study. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 19, n. 3, p. 567–572, 2016.

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

HILL, P. B.; LO, A.; EDEN, C. A. N.; HUNTLEY, S.; MOREY, V.; RAMSEY, S.; RICHARDSON, C.; SMITH, D. J.; SUTTON, C.; TAYLOR, M. D.; THORPE, E.; TIDMARSH, R.; WILLIAMS, V. Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. **The Veterinary record**, v. 158, n. 16, p. 533–9, 2006.

HILLIER, A.; GRIFFIN, C. E. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): Incidence and prevalence. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, n. 3–4, p. 147–151, 2001.

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

JOHANSSON, S. G. O.; BIEBER, T.; DAHL, R.; FRIEDMANN, P. S.; LANIER, B. Q.; LOCKEY, R. F.; MOTALA, C.; ORTEGA MARTELL, J. A.; PLATTS-MILLS, T. A. E.; RING, J.; THIEN, F.; VAN CAUWENBERGE, P.; WILLIAMS, H. C. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 113, n. 5, p. 832–836, 2004.

KABASHIMA-KUBO, R.; NAKAMURA, M.; SAKABE, J. ichi; SUGITA, K.; HINO, R.; MORI, T.; KOBAYASHI, M.; BITO, T.; KABASHIMA, K.; OGASAWARA, K.; NOMURA, Y.; NOMURA, T.; AKIYAMA, M.; SHIMIZU, H.; TOKURA, Y. A group of atopic dermatitis

without IgE elevation or barrier impairment shows a high Th1 frequency: Possible immunological state of the intrinsic type. **Journal of Dermatological Science**, v. 67, n. 1, p. 37–43, 2012.

KARIMKHANI, C; SILVERBERG, J. I.; DELLAVALLE, R. P. Defining intrinsic vs. extrinsic atopic dermatitis. **Dermatology Online Journal**, v. 21, n. 6, p. 4–8, 2015.

KAWANO, K.; OUMI, K.; ASHIDA, Y.; HORIUCHI, Y.; MIZUNO, T. The prevalence of dogs with lymphocyte proliferative responses to food allergens in canine allergic dermatitis. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 16, n. 4, p. 735–9, 2013.

KHOSHNEGAH, J.; MOVASSAGHI, A. R.; RAD, M. Survey of dermatological conditions in a population of domestic dogs in Mashhad, northeast of Iran (2007-2011). **Veterinary research forum : an international quarterly journal**, v. 4, n. 2, p. 99–103, 2013.

KULTHANAN, K.; BOOCHANGKOOL, K.; TUCHINDA, P.; CHULAROJANAMONTRI, L. Clinical features of the extrinsic and intrinsic types of adult-onset atopic dermatitis. **Asia Pacific Allergy**, v. 1, n. 2, p. 80, 2011.

LEUNG, D. Y. M.; BIEBER, T. Atopic dermatitis. **Lancet**, v. 361, n. 9352, p. 151–160, 2003.

LOURENÇO-MARTINS, A. M.; DELGADO, E.; NETO, I.; PELETEIRO, M. C.; MORAIS-ALMEIDA, M.; CORREIA, J. H. D. Allergic conjunctivitis and conjunctival provocation tests in atopic dogs. **Veterinary Ophthalmology**, v. 14, n. 4, p. 248–256, 2011.

MORI, T. Comparison of Skin Barrier Function and Sensory Nerve Electric Current Perception Threshold between IgE-High Extrinsic and IgE-Normal Intrinsic Types of Atopic Dermatitis. **Skin Research**, v. 11, p. 11–14, 2011.

NOMURA, T.; KABASHIMA, K. Advances in atopic dermatitis in 2015. **J ALLERGY CLIN IMMUNOL**, v. 138, n. 6, p. 1548–1554, 2016.

NOVAK, N.; BIEBER, T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 112, n. 2, p. 252–262, 2003.

OTT, H.; STANZEL, S.; OCKLENBURG, C.; MERK, H. F.; BARON, J. M.; LEHMANN, S. Total serum IgE as a parameter to differentiate between intrinsic and extrinsic atopic dermatitis in children. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 89, n. 3, p. 257–261, 2009.

OTT, H.; WILKE, J.; BARON, J. M.; HÖGER, P. H.; FÖLSTER-HOLST, R. Soluble immune receptor serum levels are associated with age, but not with clinical phenotype or disease severity in childhood atopic dermatitis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV**, v. 24, n. 4, p. 395–402, 2010.

PICCO, F.; ZINI, E.; NETT, C.; NAEGELI, C.; BIGLER, B.; RÜFENACHT, S.; ROOSJE, P.; GUTZWILLER, M. E. R.; WILHELM, S.; PFISTER, J.; MENG, E.; FAVROT, C. A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. **Veterinary Dermatology**, v. 19, n. 3, p. 150–155, 2008.

PÓNYAI, G.; HIDVÉGI, B.; NÉMETH, I.; SAS, A.; TEMESVÁRI, E.; KÁRPÁTI, S. Contact and aeroallergens in adulthood atopic dermatitis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 22, n. 11, p. 1346–1355, 2008.

PRELAUD, N.; COCHET-FAIVRE, N. A retrospective study of 21 cases of canine atopic-like dermatitis. **Blackwell Publishing, Ltd. 22nd Annual Congress of the ESVD-ECVD**, v. 18, n. September, p. 385, 2007.

ROGUEDAS-CONTIOS, A. M.; MISERY, L. What is intrinsic atopic dermatitis? **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 41, n. 3, p. 233–236, 2011.

ROŻALSKI, M.; RUDNICKA, L.; SAMOCHOCKI, Z. Atopic and non-atopic eczema. **Acta Dermatovenerologica Croatica**, v. 24, n. 2, p. 110–115, 2016.

RYBNÍČEK, J.; LAU-GILLARD, P. J.; HARVEY, R.; HILL, P. B. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 115–122, 2009.
SCHMID, P.; SIMON, D.; SIMON, H. . Epidemiology , clinical features , and immunology of the "' intrinsic '" (non-IgE-mediated) type of atopic dermatitis (constitutional dermatitis). **Allergy**, v. 56, p. 841–849, 2001.

SON, J. H.; CHUNG, B. Y.; KIM, H. O.; PARK, C. W. Clinical Features of Atopic Dermatitis in Adults Are Different according to Onset. **J Korean Med Sci**, v. 32, p. 1360–1366, 2017.

SUTO, A.; SUTO, Y.; ONOHARA, N.; TOMIZAWA, Y.; YAMAMOTO-SUGAWARA, Y.; OKAYAMA, T.; MASUDA, K. Food allergens inducing a lymphocyte-mediated immunological reaction in canine atopic-like dermatitis. **The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science**, v. 77, n. 2, p. 251–4, 2015.

TARPATAKI, N.; PÁPA, K.; REICZIGEL, J.; VAJDOVICH, P.; VÖRÖS, K. Prevalence and features of canine atopic dermatitis in Hungary. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 54, n. 3, p. 353–366, 2006.

TOKURA, Y. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, v. 58, n. 1, p. 1–7, 2010.

WEIDINGER, S.; NOVAK, N. Atopic dermatitis. **The Lancet**, v. 387, n. 10023, p. 1109–1122, 2016.

WILHEM, S.; KOVALIK, M.; FAVROT, C. Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 22, n. 2, p. 143–149, 2011.

WILLIAMS, H.; STEWART, A.; VON MUTIUS, E.; COOKSON, W.; ANDERSON, H. R. Is eczema really on the increase worldwide? **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 121, n. 4, 2008.

YAMAGUCHI, H.; HIRASAWA, N.; ASAKAWA, S.; OKITA, K.; TOKURA, Y. Intrinsic atopic dermatitis shows high serum nickel concentration. **Allergology International**, v. 64, n. 3, p. 282–284, 2015.

ZUR, G.; WHITE, S. D.; IHRKE, P. J.; KASS, P. H.; TOEBE, N. Canine atopic dermatitis : a retrospective study of 266 cases examined at the University of California , Davis , 1992 – 1998 . Part I .Clinical features and allergy testing results. **Science**, p. 103–111, 2002.

CAPÍTULO IV

Microbioma cutâneo bacteriano – revisão de literatura

1. Introdução

A superfície de todo o planeta é habitada por centenas de bilhões de microrganismos que fazem parte do ecossistema, exercendo funções essenciais à vida na Terra. No passado, ano de 1663, Antonie van Leeuwenhoek, inventor do primeiro microscópio, observou pela primeira vez bactérias oriundas de amostras de placas de biofilme dos seus próprios dentes. Assim se deu início à bacterioscopia. Posteriormente, surgiram os métodos de cultivo de microrganismos e adiante o estudo das sequências de DNA, até chegar na metagenômica, que é o sequenciamento massivamente paralelo do material genético de um ecossistema. O objetivo dos estudos metagenômicos é entender quem habita e qual a sua função em um determinado ambiente. A grande vantagem deste tipo de abordagem, em relação aos métodos cultiváveis, é a possibilidade de acessar espécies fastidiosas ou mesmo não cultiváveis e realizar estudos taxonômicos com todos os táxons obtidos daquele meio. A partir desses métodos, pode-se determinar o microbioma bacteriano, fúngico, viral e de arqueia do determinado ecossistema.

Os estudos metagenômicos podem ser realizados de forma específica ou por sequenciamento de todo o DNA. A abordagem específica, em se tratando de microbioma bacteriano, é feito a partir do sequenciamento do 16S rRNA, que é um gene presente em todas as células procariotas. Este possui regiões extremamente conservadas durante o tempo evolutivo e outras hipervariáveis, que permitem a identificação dos diferentes táxons.

Diversas doenças humanas e animais, tais como a dermatite atópica, psoríase e distúrbios gastrintestinais têm sido associados a alterações da microbiota residente. Esta possui funções cruciais tanto na manutenção da saúde do hospedeiro, quanto no processo das enfermidades. Desta forma, devido à desequilíbrios no microbioma, ou disbiose, microrganismos antes inofensivos ou mesmo outros reconhecidamente patogênicos, podem se tornar causadores de infecções importantes.

2. Definição

Os microrganismos, constituem as menores formas de vida do planeta, e são, também, os organismos mais diversos fisiologicamente e, metabolicamente, mais versáteis. Toda a superfície corpórea dos seres vivos é habitada por um número vasto de microrganismos, incluindo bactérias, vírus, fungos, arqueia e ácaros (SABREE & RONDON, 2009). Esta microbiota reside no organismo de humanos e animais como comensais, sem causar distúrbios ao hospedeiro. Sendo assim, nas diversas regiões corpóreas destes indivíduos, tais como a pele, a cavidade oral, os tratos gastrintestinal e urogenital, abrigam comunidades microbianas complexas. Quando o material genético dessas comunidades é determinado por sequenciamento genômico, o termo microbioma passa a ser mais adequado, ou seja, a microbiota é a comunidade comensal e o microbioma é o seu genoma correspondente (KIL & SWANSON, 2011; WEESE, 2013; ZAPATA & QUAGLIARELLO, 2015). Estes são compostos por células individuais, que se diferem de organismos pluricelulares, pois seus componentes podem carregar genomas idênticos e acredita-se que uma porção substancial dessa população seja composta por células clonais. Diversos estudos em humanos e animais saudáveis demonstraram que cada habitat do corpo possui um microbioma singular, formando uma espécie de identificação única do local, que pode ser

comparada à impressão digital de humanos (MORGAN & HUTTENHOWER, 2012; ZAPATA & QUAGLIARELLO, 2015).

3. Gênomica microbiana

Até o século 17, o mundo microscópico ainda era considerado invisível e desconhecido. Entretanto, no ano de 1663, Antonie van Leeuwenhoek, inventor do primeiro microscópio, conseguiu observar, em sua criação, bactérias, oriundas de amostras de placas de biofilme dos seus próprios dentes, as quais batizou de "animáculos", surgindo, assim, a bacterioscopia (CHEN & TSAO, 2013; WIZEMANN et al., 2013). A partir dai, iniciou-se a classificação das bactérias de acordo com o formato observado à microscopia. Em 1884, Robert Koch e Friedrich Loeffler criaram os primeiros meios de cultura, dando início aos primeiros cultivos de bactérias, a partir de amostras provenientes de pessoas doentes, fazendo, desta forma, a primeira associação entre microrganismos e enfermidades, e o estabelecimento do mundo cultivável (CHEN; TSAO, 2013). A partir das observações feitas nestas culturas bacterianas, iniciou-se a classificação de microrganismos cultiváveis, visto que, de acordo com o *Bergey's manual of derterminative bacteriology* (1923), uma espécie somente poderia ser descrita se devidamente cultivada. Entretanto, ao longo dos anos, observou-se que uma vasta quantidade de microrganismos não crescia a partir dos métodos de cultivo tradicionais, o que alertava os microbiologistas para a necessidade de métodos de identificação, não baseados em cultura (SABREE & RONDON, 2009).

Nos anos 1930, foi criado o primeiro microscópio eletrônico, com o qual tornou-se possível a identificação das organelas microbianas. Após o inicio dos estudos de anatomia de microrganismos, a partir de culturas de tipos de pneumococos, descobriu-se a informação genética está codificada na sequencia de nucleotídeos do DNA, pilar estrutural dos estudos genômicos (LEDERBERG, 2000). Desde as últimas décadas, novas tecnologias envolvendo a identificação genômica de microrganismos revolucionaram os conhecimentos sobre o mundo microbiológico que vive acerca dos seres humanos, seja em superfícies terrestres ou em áreas corpóreas de organismos vivos. Estas ferramentas científicas permitiram a identificação não dependente de cultura pura, grande desafio dos microbiologistas do passado. Além disto, proporcionaram, também, a observação da diversidade e abundância da microbiota que reside em diversos locais, e a interação dinâmica entre esta e o ambiente onde vive (WIZEMANN et al,. 2013). O primeiro sequenciamento de um genoma completo levou 13 anos para ser concluído, entretanto, com a evolução das técnicas, este processo ocorre em apenas alguns dias, atualmente (WIZEMANN et al., 2013).

Os métodos dependentes de cultura são frequentemente utilizados para o isolamento e identificação de microrganismos, mesmo após o surgimento dos métodos de sequenciamento genômico. Entretanto, bactérias de crescimento fastidioso são de difícil isolamento, e frequentemente têm seu crescimento inibido por outras espécies. Estes fatores fazem com que estes métodos sejam limitados, pois provocam uma subestimação da diversidade microbiana do ecossistema (KONG, 2011). Os métodos independentes de cultura, que analisam o DNA extraído diretamente da comunidade, sem necessidade de cultivo em meios específicos, permitem a investigação de diversos aspectos do microbioma, tais como diversidade taxonômica e metagenômica funcional (MORGAN & HUTTENHOWER, 2012).

O termo *metagenômica* é utilizado para definir os métodos não dependentes de cultura, baseados em genômica, que são empregados para o estudo de comunidades microbianas complexas dentro

de um determinado ambiente, referindo-se ao material genético presente no mesmo. Os sequenciamentos metagenômicos são massivamente paralelos e têm o objetivo de determinar a composição filogenética do microbioma investigado, e a função/interação entre os seus membros. Estudos metagenômicos podem ser realizados de forma específica, ou seja, a partir de um fragmento do genoma, ou por sequenciamento do genoma completo de todos os microrganismos (KONG, 2011).

O método específico é baseado no sequenciamento de um gene, chamado de marcador, capaz de identificar o genoma que o contém, sem a necessidade de sequenciá-lo completamente. Os marcadores devem ser genes presentes em todos os membros da comunidade e capazes de diferenciar genomas distintos. Para tanto, é necessário que o marcador possua regiões de DNA conservado evolutivamente, para que seja possível a identificação da comunidade em questão, mas também, devem haver regiões hipervariáveis adjacentes que possibilitem, após sequenciamento, a diferenciação de táxons distintos a partir das variações nos pares de bases (MORGAN & HUTTENHOWER, 2012). O gene 16S rRNA é o mais utilizado para estudos de microbioma bacteriano, já que este é comum a todas as células procrariotas. Para a classificação das sequencias encontradas, bibliotecas de 16S rRNA, como a *Ribossomal Database Project* (RDP), *GreenGenes* e *Silva*, contém centenas de milhares de sequencias catalogadas e estão disponíveis *online* (KONG, 2011; MORGAN & HUTTENHOWER, 2012).

Já o método de sequenciamento de genoma completo, ou *whole-genome shotgun,* fragmenta e sequencia todo o DNA existente na amostra, resultando em sequencias menores. Posteriormente, as numerosas leituras originadas são montadas para formar sequencias maiores. Assim, os microrganismos são classificados filogeneticamente e de acordo com a função exercida no meio. Isto é feito a partir da análise dos genes encontrados no genoma completo. É relativamente simples e acessível o sequenciamento apenas do 16S rRNA de uma comunidade, sendo esta caracterizada como uma variedade de sequencias deste marcador, e o número de vezes que cada uma destas sequencias foi identificada, podendo-se então fazer o estudo taxonômico deste microbioma (KONG, 2011; MORGAN & HUTTENHOWER, 2012)

Um grande desafio na analise bioinformática do 16S rRNA é a definição de uma sequencia padronizada para cada membro da comunidade. Apesar deste marcador ser extremamente conservado durante o tempo evolutivo, possui regiões variáveis (V1-V9). Assim, um pequeno número de pares de bases, nestas regiões, sofre modificações em um curto espaço de tempo evolutivo, tornando possível a diferenciação dos grupos taxonômicos a partir disto. Entretanto, devido à ocorrência destas mutações pontuais, dificilmente todos os microrganismos do mesmo grupo taxonômico terão o 16S rRNA idêntico. Além disto, devido ao fato do sequenciamento do 16S rRNA ser feito em apenas uma passagem, as chances de ocorrência de erros de sequenciamento aumentam consideravelmente, e, exigir que as sequencias do mesmo filotipo sejam 100% iguais, seria extremamente conservador e faria com que clones genômicos fossem considerados indivíduos diferentes. Desta forma, para evitar erros, um pequeno grau de divergência é aceitável, sendo 97% o percentual de semelhança mais utilizado na prática. As sequencias quase idênticas que se agrupam por semelhança, ditos clones genômicos, são referidos como *Operacional Taxonomic Unit* (OTU) ou por vezes filotipos. Os OTUs substituem as espécies nos estudos de microbioma, pois muitas vezes a classificação de espécies por estes marcadores não está disponível, sendo possível identificar até no máximo, o gênero dos indivíduos. O processo de classificação das sequencias em OTUs é chamada de *binning,* ou seja, agrupamento das OTUs com graus de semelhança adequados em *bins,* ou ainda táxons, permitindo a analise da comunidade. À medida que as OTUs ou *bins* vão sendo agrupadas em

filos ou outra unidade taxonômica, o microbioma em questão pode ser representado em um gráfico de histograma, demonstrando a diversidade e abundância taxonômica da comunidade. Alternativamente, em microbiomas pouco complexos, estes histogramas podem ser feitos a partir do agrupamento em presença ou ausência de determinado *bin* (MORGAN & HUTTENHOWER, 2012).

Um conceito importante da análise das OTUs é o de diversidade da população, que consiste no número de determinados táxons presentes na amostra, e distribuição taxonômica da comunidade. Isto é muito relevante na saúde de humanos e animais, já que algumas doenças estão sendo associadas à baixa diversidade do microbioma, com o supercrescimento de um ou pequeno número de microrganismos durante desequilíbrio do sistema imune ou deficiência de nutrientes. (HUTTENHOWER et al., 2012). No cálculo da diversidade, para analisar a riqueza, número de táxons, e a distribuição, a proporção de cada táxon, em uma comunidade, é usada a alpha-diversidade, que é a avaliação destas variáveis dentro de uma única amostra. Os métodos utilizados para estes cálculos são principalmente o *Chao1, PD Whole Tree e observed OTUs* e o índice de Shannon, que é um método estatístico. A beta-diversidade é utilizada para análise de diversidade quando o objetivo é comparar diversas populações e determinar a quantidade de táxons compartilhados por elas. Concluindo, a alpha-diversidade é um cálculo estatístico dentro de uma mesma população e a beta-diversidade é um escore de similaridade entre duas populações. A principal forma de analisar a beta-diversidade é pela distância Unifrac, posteriormente gerando os gráficos de análise de coordenadas principais (MORGAN & HUTTENHOWER, 2012).

Ao realizar a avaliação da riqueza de uma amostra de microbioma, deve-se considerar também a contribuição que o ruído técnico vai fazer na diversidade encontrada. Estes ruídos são as falhas técnicas que podem ocorrer durante o sequenciamento das amostras. A modificação de um único par de base em uma sequencia pode criar um novo OTU mesmo em um grau de similaridade de 99%, isto fará com que indivíduos clones sejam tratados como táxons diferentes, aumentando a diversidade erroneamente. Outro ruído importante que pode alterar a riqueza da população é a formação de quimeras, que são sequencias formadas artificialmente pela combinação de duas ou mais sequencias naturais, que passam a ser classificadas como novos OTUs. Entretanto, os programas de bioinformática utilizados para análise de microbioma atualmente são capazes de filtrar e remover adequadamente as sequencias quimera, processo que é essencial para a qualidade da avaliação de diversidade (MORGAN & HUTTENHOWER, 2012).

Em 2009, pesquisadores recrutaram nove pessoas saudáveis, de ambos os gêneros, para coleta de amostra de fezes, cavidade oral, narinas, canal auditivo externo, cabelos do couro cabeludo e diversas regiões de pele, com o objetivo de estudar o microbioma bacteriano de indivíduos saudáveis, a partir do uso de sequenciamento de 16S rRNA. Dentre todas as amostras coletadas de todos os indivíduos, os filos mais frequentes foram Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes. Cada região corpórea possuiu um microbioma singular que refletia as condições do microambiente. Comparando cada habitat entre as pessoas, houve bastante variação individual, entretanto, houve estabilidade entre as amostras coletadas em tempos diferentes, demonstrando que o microbioma tende a permanecer estável em condições fisiológicas, no mesmo individuo (COSTELLO et al., 2009).

O *Human Microbiome Project* é um estudo multicêntrico, internacional, que tem como objetivo caracterizar a microbiota e o microbioma humano. Em 2012, pesquisadores vinculados ao projeto, nos Estados Unidos da América, recrutaram 242 adultos, de ambos os gêneros, de idades entre 18 e 40 anos, para caracterização do seu microbioma bacteriano, utilizando sequenciamento

massivamente paralelo. Amostras foram coletadas de múltiplas regiões corpóreas, incluindo a pele, narinas, cavidade oral, orofaringe, vagina e fezes. Destes indivíduos, foram coletadas amostras novamente de 131, em uma média de 219 dias após a primeira coleta. Este estudo confirmou resultados anteriores que afirmam que cada região corpórea tem um microbioma singular e específico. A cavidade oral e as fezes foram as que apresentaram maior alpha-diversidade, enquanto a vagina apresentou a menor, com predominância de *Lactobacillus*. Em termos de beta-diversidade, a cavidade oral foi a que apresentou a menor e a pele a maior medida, concluindo-se que a primeira foi a que apresentou mais semelhança entre os indivíduos, diferentemente da pele. Nas amostras de trato gastrintestinal, foi observada uma relação inversa entre Bacteroidetes e Firmicutes, sendo que nas amostras onde havia grande concentração do primeiro, o segundo estava representado em pequena quantidade. Considerando a estabilidade do microbioma em relação ao tempo, nos indivíduos que passaram por segundas coletas, observou-se que este permaneceu estável no mesmo indivíduo, mas houve grande variação interpessoal (HUTTENHOWER et al., 2012).

4. Função do microbioma em saúde e doença

A microbiota residente exerce funções cruciais à saúde do hospedeiro, como por exemplo resistência à patógenos, modulação do sistema imune e suporte nutricional (COSTELLO et al., 2009). As superfícies corporais constituem ecossistemas estáveis e ricos em nutrientes, onde os microrganismos se desenvolvem. Esta microbiota libera constantemente uma mistura complexa de metabólitos, vitaminas e nutrientes que enviam sinais ao sistema e influenciam a função do sistema imune do hospedeiro. Desta forma, as defesas das superfícies corpóreas possuem simultaneamente a função de coexistir com estes microrganismos e também de prevenir a invasão de patógenos invasores. Sendo assim, um animal saudável deve apresentar duas reações opostas caminhando paralelamente em equilíbrio. O sistema imune deve tolerar a microbiota e ser capaz de organizar uma resposta rápida que elimine patógenos eficientemente. A seleção de qual resposta será utilizada para cada situação será definida de acordo com a forma como ocorre o processamento de antígenos e dos sinais enviados pela microbiota. Se houver quebra no equilíbrio entre estes processos pró-inflamatórios e anti-inflamatórios, haverá alteração no nível de ativação do sistema imune (TIZARD e JONES, 2017).

A colonização da pele do neonato, estéril na vida pré-natal, se dá a partir do nascimento. Este microbioma inicial apresenta pequena diversidade, e relaciona-se intimamente com o tipo de parto pelo qual ocorreu o nascimento. Neonatos nascidos por parto normal apresentam colonização cutânea mais semelhante àquela presente no canal vaginal da mãe, com predominância de espécies de *Lactobacillus*, enquanto os nascidos por cesariana terão sua pele colonizada primeiramente pelo contato com a pele materna e apresentarão, então, o microbioma similar a esta região, com predominância de espécies de *Staphylococcus* (KONG, 2011; MORGAN e HUTTENHOWER, 2012). Esta exposição a microrganismos na fase inicial da vida determinará como o sistema imune se desenvolverá, já que mamíferos *germ free* apresentam um subdesenvolvimento do sistema imune de mucosas. A microbiota é capaz de estimular os receptores do tipo Toll (TLR) dos enterócitos e promover o desenvolvimento funcional do sistema imune (GENSOLLEN et al., 2016). A microbiota da pele também contribui para esse processo durante a amamentação e o contato com a mãe (BROWN e CLARKE, 2017).

A microbiota intestinal possui funções singulares e essenciais no organismo de humanos e animais saudáveis. Este microbioma tem sido associado a funções metabólicas, inibição da

invasão de patógenos, fortalecimento da mucosa intestinal e modulação do sistema imune. O trato gastrointestinal possui uma mistura complexa de bactérias, arqueia, fungos e vírus. O mais numerosos são as bactérias e estima-se que estejam presentes trilhões indivíduos de espécies variadas. Em mamíferos, há um predomínio dos filos Firmicutes e Bacteroidetes, com uma menor fração de Fusobacteria e Verrucomicrobia. Os mamíferos possuem cerca de 20.000 genes que codificam proteínas, enquanto a sua microbiota em conjunto possui em torno de 10 milhões. Este genoma diverso amplia a função metabólica do animal aumentando por exemplo a capacidade de extrair energia de carboidratos estruturais de vegetais e absorção de vitaminas. Um camundongo com a microbiota convencional necessita de 30% a menos de calorias diariamente para manter seu peso corporal que os camundongos *germ-free* (TIZARD e JONES, 2017).

A partir da ocupação dos nichos intestinais, bactérias comensais bloqueiam a colonização subsequente por espécies patogênicas. Além disso, a microbiota intestinal modifica o microambiente local mantendo o pH e a tensão de oxigênio baixos. Na mucosa intestinal, há mais atividade do sistema imune que em todos os tecidos linfoides juntos (KAMADA et al., 2013a). Estima-se que 80% das células B ativadas do corpo estejam no intestino e a sua função é de defesa contra possíveis invasões microbianas. Entretanto, para que a microbiota intestinal se instale adqueadamente, é necessário que haja um equilíbrio entre as células pró-inflamatórias Th17 e as anti-inflamatórias Treg (KAMADA et al., 2013a,; KAMADA et al., 2013b). Em um estudo que avaliou as alterações no sistema imune de camundongos colonizados apenas por uma espécie de bactéria, demonstrou-se que muitas bactérias possuem diversos efeitos na função imune. Algumas espécies possuem funções similares, sobrepostas ou até mesmo opostas. Algumas são potentes estimuladoras de resposta Th17, enquanto cerca de um quatro das bactérias estudadas estimulavam Treg e outras afetavam as células linfoides inatas e as células dendríticas (GEVA-ZATORSKY et al., 2017).

Em um estudo com sete cães da raça Beagle dentro do peso ideal e sete obesos, observaram que nos magros, a diversidade do microbioma foi maior e havia predomínio de Firmicutes nas amostras intestinais, enquanto nos obesos o filo predominante era Proteobacteria. Este gênero, é composto por bactérias Gram-negativas que possuem LPS em sua membrana, molécula capaz de induzir inflamação crônica (PARK et al., 2015). Em outro estudo, com objetivo de avaliar essa relação do LPS com a obesidade, pesquisadores observaram que camundongos alimentados com dieta rica em lipídios (72%) tiveram um aumento significativo na concentração de LPS no plasma, em menor grau do que ocorre em casos de sepse, sendo caracterizado o estado de endotoxemia metabólica. Posteriormente, os mesmos pesquisadores fizeram infusão contínua de LPS em animais alimentados com dieta balanceada, sem aumento do consumo de calorias. Assim, observaram que, após estas quatro semanas, os animais que receberam infusão de LPS obtiveram ganho de peso semelhante aos que receberam, por quatro semanas, dieta com 72% de lipídeos. Desta forma, sugere-se que o aumento do LPS, causando endotoxemia metabólica, seja relacionado com obesidade (CANI et al., 2007).

Estudos também têm demostrado que o microbioma do trato gastrointestinal controla uma proteína derivada do intestindo muito importante no metabolismo de lipídios do hospedeiro, que é a Angiopoietina-símile 4 (Angptl4). Esta proteína regula a oxidação de ácidos graxos no tecido muscular e adiposo. Camundongos *germ free*, quando colonizados com microbiota intestinal de roedores obesos, apresentaram supressão da produção de Angptl4 e mais triglicerídeos foram armazenados no tecido adiposo, acarretando aumento do peso. Além disto, tem sido feita associação entre o microbioma intestinal sofre mudanças devido ao consumo de dieta ocidental,

rica em carne vermelha, lipídeos e poucos vegetais, e é capaz de produzir substâncias carcinogênicas e metabolizar determinados compostos, que contribuem para o desenvolvimento de câncer (MUSZER et al., 2015).

O microbioma é essencial para a ativação do sistema imune do hospedeiro e várias doenças autoimunes são derivadas de desequilíbrio de imunidade adquirida. Os comensais que habitam todo o corpo de humanos e animais induzem a diferenciação de linfócitos T $CD4^+$ em quatro tipos principais: Th1, Th2, Th17 e Treg. Cada tipo possui uma função imune específica e secreta citocinas caraterísticas. Células Th1 são envolvidas na eliminação de patógenos intracelulares, Th2 controlam infecção por parasitos e Th17 possui uma função importante na proteção contra infecções. Já Treg realiza regulação da resposta imune. A microbiota residente modula um equilíbrio adequado entre esses quatro tipos de resposta imune (MUSZER et al., 2015). As células precursoras intestinais de T *helper* (Th) podem tanto diferenciar-se em Treg como em Th17 a partir de sinais recebidos da microbiota. Quando a microbiota intestinal apresenta-se estável, a diferenciação em Treg é favorecida enquanto Th17 é suprimida e mínima inflamação ocorre na parede intestinal. Na ausência de Treg, as células T efetoras descontroladas respondem aos antígenos e provocam inflamação (OHNMACHT et al., 2015; TIZARD e JONES, 2017).

Independente da localização das bactérias, seja na pele, trato gastrointestinal, respiratório ou gênito-urinário, elas se comunicam diretamente e eficientemente com o sistema imune do hospedeiro. Esta comunicação é essencial para o funcionamento adequado das funções de imunidade inata e adaptativa e o desequilíbrio da microbiota gera efeitos profundos na imunidade (TOMKOVICH & JOBIN, 2016). As fibras vegetais da dieta contêm carboidratos complexos que, quando digeridos por Clostridia no ceco e no cólon, geram metabólitos como o acetato e o butirato que suprimem os macrófagos e estimulam a produção de células Treg. Assim, o consumo de dieta rica em fibra possui exerce uma função crucial no controle da inflamação intestinal (TIZARD & JONES, 2017). Além disso, estas colônias de clostrídeos também aumenta o número de células Treg em órgãos distantes como o baço e os pulmões, e também atuam na inibição de respostas alérgicas. Estas células T estimuladas no intestino migram para tecidos remotos e determinam o equilíbrio de células T (GABORIAU-ROUTHIAU et al., 2009).

A pele e o trato gastrointestinal têm muito em comum e interagem extensivamente. Ambos os sistemas possuem densa vascularização, inervação massiva e são intensamente colonizados por comunidades microbianas distintas. A microbiota intestinal e seus variados metabólitos podem também induzir alterações cutâneas (O'NEILL et al., 2016; TIZARD e JONES, 2017).

5. Microbioma cutâneo bacteriano

A pele é o órgão mais exposto de todo o corpo de humanos e animais, responsável por proporcionar ao organismo uma barreira contra a entrada de possíveis agentes nocivos, tais como patógenos e substâncias irritantes, sendo capaz de agir como barreira física, química e imunológica, capaz de responder aos mais diversos desafios. Entretanto, mesmo com toda a sua eficiência em exercer essa barreira protetora, vivem na pele variadas comunidades microbianas, que são toleradas pelo sistema imune cutâneo (SANFORD e GALLO, 2013). Estas comunidades microbianas que habitam a pele como comensais, sem causar prejuízos à saúde do hospedeiro, em condições fisiológicas de equilíbrio, são chamadas de residentes. Já as que colonizam eventualmente e transitoriamente, são chamadas de transitórias, podendo ou não ser espécies potencialmente patogênicas. Em condições fisiológicas, existe um equilíbrio entre o sistema

imune do hospedeiro e a microbioma, o que faz com que haja um controle da proliferação destes microrganismos, entretanto, quando este equilíbrio é perturbado, pode ocorrer o supercrescimento de uma ou mais espécies, chamada disbiose, provocando doença. Assim sendo, mesmo a microbiota residente que, aparentemente, vive em comensalismo com o hospedeiro, pode se tornar patogênica se houver disbiose (HOFFMANN et al., 2014; SANFORD e GALLO, 2013; SCHOMMER e GALLO, 2013).

O ecossistema cutâneo é bastante variável, sendo composto por diversas estruturas que se diferem umas das outras em termos de pH, umidade, temperatura, lipídios, peptídeos antimicrobianos, dentre outros. Estas diversas regiões cutâneas com condições ambientais diferenciadas que levam a formação de nichos microbianos. Os folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas são regiões que possuem um microambiente único, conferindo-as um microbioma particular e diferenciado da camada córnea da epiderme, por exemplo, mesmo que a distancia entre os locais seja mínima (SCHOMMER e GALLO, 2013; WEESE, 2013).

Estudos em humanos mostram que quatro filos de bactérias são mais frequentes em amostras cutâneas, Actinobacteria, Firmicutes, Proteobacteria e Bacteroidetes. Os gêneros mais identificados são *Corynebacterium, Staphylococcus e Propionibacterium,* sendo que a abundancia de cada gênero é fortemente dependente do respectivo nicho. *Staphylococcus e Propionibacterium* predominam nas regiões com abundante secreção sebácea na face, enquanto *Corynebacterium* predomina nas na axila e outras regiões mais úmidas, mas *Staphylococcus* também podem estar presentes (GRICE et al., 2009). Em cães, o uso de sequenciamento massivamente paralelo para estudos de microbioma ainda não são amplamente utilizados, mas os resultados obtidos com cães saudáveis demonstraram dados semelhantes aos encontrados em humanos, sendo Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes e Cyanobacteria, os filos mais abundantes na pele de cães. Nestes animais, também pôde ser observada a variação topográfica da composição do microbioma (HOFFMANN et al., 2014).

O microbioma cutâneo pode ser alterado por diversos fatores, extrínsecos ou intrínsecos. Os extrínsecos, ou ambientais, incluem umidade, temperatura ambiental, tipo de vestuário, uso de antibióticos e cosméticos, frequência de higiene, entre outros. Os intrínsecos são os relacionados ao hospedeiro e alteram a composição do microbioma. Estes fatores são, principalmente, anatomia, genética, gênero, idade e imunidade (KONG, 2011; LYNDE et al., 2016). Na grande maioria das vezes, doenças cutâneas se resultam de desequilíbrios na microbiota, e então, os residentes que eram antes protetores, se transformam em patógenos, em determinadas condições. As dermatopatias podem ser decorrentes também de infecção por microrganismos naturalmente patogênicos, mas devido também ao desequilíbrio do microbioma e da sua inabilidade em manter a barreira epidérmica protetora que eles exercem em condições normais (KONG, 2011; SANMIGUEL e GRICE, 2014).

A dermatite atópica (DA) é uma doença cutânea, multifatorial, com patogênese não completamente compreendida, frequentemente associada a infecções bacterianas, principalmente do gênero *Staphylococcus,* tanto em humanos quanto em cães atópicos (KONG et al., 2012; HOFFMANN et al., 2014). O que faz com que estes pacientes sejam mais predispostos a estas infecções, provavelmente são as alterações cutâneas associadas à doença. Há alguns anos, acreditava-se que a DA era uma doença causada por alteração genética do sistema imune que gerava uma reação imunológica anormal, mediada por anticorpos do tipo IgE, específicos para determinados alérgenos considerados inócuos, esta era a teoria conhecida como “de fora para dentro” (*outside-inside theory)*. Atualmente, sabe-se que a disfunção da barreira epidérmica

facilita e permite a entrada dos alérgenos e substâncias irritativas, tais como microrganismos, pólen, ácaros, ácidos, entre outros, aumentando o contato e exposição dos mesmos às células imunes da epiderme. Esta última completa a teoria anterior, de fora para dentro, para formar a teoria "de fora, para dentro, para fora" (*outside-inside-outside theory).* Esta nova teoria propõe que o defeito primário da barreira epidérmica permite maior penetração de alérgenos, que causarão a sensibilização do sistema imune e posteriormente mais dano à barreira epidérmica. Desta forma, atualmente, acredita-se que altos níveis de IgE sejam consequências da DA e não a causa. Além disso, alérgenos alimentares aparentam exercer alguma função importante da patogenia da DA, diferentemente do que se pensava, que DA e a dermatite trofoalérgica eram doenças completamente e sempre distintas (LE ROY et al., 2015; SANTORO et al., 2015).

Em um estudo realizado com crianças atópicas, com o objetivo de avaliar a variação temporal do microbioma ao longo da evolução das crises da doença, os autores selecionaram 12 crianças atópicas de grau moderado a grave, e 11 controles saudáveis e realizaram coletas da região antecubital e poplítea, locais conhecidos como de predileção da doença, regiões adjacentes destas e as narinas. As coletas foram realizadas antes da crise, no momento da crise e entre 10 a 14 dias após este período. Ao associar a gravidade da doença com o índice de alfa-diversidade Shannon, observou-se que estas variáveis estão inversamente relacionadas, ou seja, quanto maior a gravidade, menos a diversidade. A redução da diversidade estava intimamente ligada aos locais de predileção da dermatite atópica. E nestes locais, houve predomínio do gênero *Staphylococcus.* Além disto, pacientes que não foram submetidos a tratamentos durante as crises, obtiveram diversidade Shannon menor do que os que foram tratados. A diversidade das regiões adjacentes e das narinas se manteve bastante estável, demonstrando que a alteração no microbioma é relacionada com os locais de predileção (KONG et al., 2012). Sempre se acreditou que *S. epidermidis* possuísse alguma função protetora contra as infecções por *S. aureus* devido à redução da sua abundância em fases de crise e aumento em fases estáveis (GALLO e NAKATSUJI, 2011; CHRISTENSEN e BRÜGGEMANN, 2014; NAKAMIZO et al., 2014), Kong e colaboradores (2012), observaram que a abundância de *S. epidermidis* aumentou junto com a de *S. aureus* durante a crise, com consecutiva redução após este período. Isto contraria o que se dizia até o momento, e estes autores sugerem que ao invés de inibir *S. aureus, S. epidermidis* tenha uma relação simbiótica.

O microbioma cutâneo de cães atópicos e hígidos a partir de métodos não dependentes de cultura foi pouco estudado até o momento (HOFFMANN et al., 2014; BRADLEY et al., 2016; PIEREZAN et al., 2016; TORRES et al., 2017). Hoffmann e colaboradores (2014), realizaram o primeiro estudo com estes métodos em cães. Estes pesquisadores avaliaram o microbioma de 12 cães saudáveis e seis alérgicos, a partir de coletas de amostras de diversas regiões cutâneas, sendo elas narinas, região interdigital, axilas, pavilhão auricular, conduto auditivo, conjuntiva, região lombar, perianal, inguinal e comissura labial. Todos os atópicos incluídos estavam em fase estável da doença, ou seja, fora da crise. Desta forma, os pesquisadores encontraram uma alpha-diversidade significativamente menor nas amostras dos cães alérgicos quando comparados com os hígidos, mesmo que estivessem fora do período de crise e com a pele alesional. Sabe-se que a pele alesional de cães atópicos apresenta maior grau de inflamação e os defeitos na barreira epidérmica que são característicos da doença, isto provavelmente acarreta a alteração da diversidade no microbioma cutâneo destes animais.

6. Referências

BRADLEY, C. W.; MORRIS, D. O.; RANKIN, S. C.; CAIN, C. L.; MISIC, A. M.; HOUSER, T.; MAUDLIN, E. A.; GRICE, E. A. Longitudinal evaluation of the skin microbiome and association with microenvironment and treatment in canine atopic dermatitis. **J Invest Dermatol**, v. 136, n. 6, p. 1182–1190, 2016.

BROWN, R. L.; CLARKE, T. B. The regulation of host defences to infection by the microbiota. **Immunology**, v. 150, n. 1, p. 1–6, 2017.

CANI, P. D.; AMAR, J.; IGLESIAS, M. A.; POGGI, M.; KNAUF, C.; BASTELICA, D.; NEYRINCK, A. M.; FAVA, F.; TUOHY, K. M.; CHABO, C.; FERRIE, J.; GIBSON, G. R.; CASTEILLA, L.; DELZENNE, N. M.; ALESSI, M. C. Original Article. **Diabetes**, v. 56, n. July, p. 1761–1772, 2007.

CHEN, Y. E.; TSAO, H. The skin microbiome: Current perspectives and future challenges. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 1, p. 143–155, 2013.

CHRISTENSEN, G. J. M.; BRÜGGEMANN, H. Bacterial skin commensals and their role as host guardians. **Beneficial Microbes**, v. 5, n. 2, p. 201–215, 2014.

COSTELLO, E. K.; LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; FIERER, N.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science (New York, N.Y.)**, v. 326, n. 5960, p. 1694–1697, 2009.

GABORIAU-ROUTHIAU, V.; RAKOTOBE, S.; LÉCUYER, E.; MULDER, I.; LAN, A.; BRIDONNEAU, C.; ROCHET, V.; PISI, A.; DE PAEPE, M.; BRANDI, G.; EBERL, G.; SNEL, J.; KELLY, D.; CERF-BENSUSSAN, N. The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. **Immunity**, v. 31, n. 4, p. 677–689, 2009.

GALLO, R. L.; NAKATSUJI, T. Microbial symbiosis with the innate immune defense system of the skin. **The Journal of investigative dermatology**, v. 131, n. 10, p. 1974–1980, 2011. Dis

GENSOLLEN, T.; IYER, S. S.; KASPER, D. L.; BLUMBERG, R. S. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. p. 539–545, 2016.

GEVA-ZATORSKY, N.; SEFIK, E.; KUA, L.; PASMAN, L.; TAN, T. G.; ORTIZ-LOPEZ, A.; YANORTSANG, T. B.; YANG, L.; JUPP, R.; MATHIS, D.; BENOIST, C.; KASPER, D. L. Mining the Human Gut Microbiota for Immunomodulatory Organisms. **Cell**, v. 168, n. 5, p. 928–943.e11, 2017.

GRICE, E. a.; KONG, H. H.; CONLAN, S.; DEMING, C. B.; DAVIS, J.; YOUNG, A. C.; PROGRAM, N. C. S.; BOUFFARD, G. G.; BLAKESLEY, R. W.; MURRAY, P. R.; GREEN, E. D.; TURNER, M. L.; SEGRE, J. a. Topographical and temporal diversity of the human skin. **Science**, v. 324, n. 5931, p. 1190–1192, 2009.

HOFFMANN, A. R.; PATTERSON, A. P.; DIESEL, A.; LAWHON, S. D.; LY, H. J.;

STEPHENSON, C. E.; MANSELL, J.; STEINER, J. M.; DOWD, S. E.; OLIVRY, T.; SUCHODOLSKI, J. S. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

HUTTENHOWER, C.; GEVERS, D.; KNIGHT, R., et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 207–214, 2012.

KAMADA, N.; CHEN, G. Y.; INOHARA, N.; NÚÑEZ, G. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. **Nature Immunology**, v. 14, n. 7, p. 685–690, 2013a.

KAMADA, N.; SEO, S. U.; CHEN, G. Y.; NÚÑEZ, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 5, p. 321–335, 2013b.

KIL, D. Y.; SWANSON, K. S. Companion animals symposium: Role of microbes in canine and feline health. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 5, p. 1498–1505, 2011.

KONG, H. H. Skin microbiome: Genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 6, p. 320–328, 2011.

KONG, H. H.; OH, J.; DEMING, C., et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. **Genome Research**, v. 22, n. 5, p. 850–859, 2012.

LE ROY, L.; LE PODER, S.; DESQUILBET, L.; PERROT, S.; CAVANA, P.; MARIGNAC, G. Canine Atopic Dermatitis Diagnostic Criteria: Evaluation of Four Sets of Published Criteria among Veterinary Students. **Journal of Veterinary Medical Education**, v. 42, n. 1, p. 79–84, 2015.

LEDERBERG, J. Infectious History. **Science**, v. 288, n. 5464, p. 287–293, 14 abr. 2000. D

LYNDE, C. W.; ANDRIESSEN, A.; BERTUCCI, V.; MCCUAIG, C.; SKOTNICKI, S.; WEINSTEIN, M.; WISEMAN, M.; ZIP, C. The skin microbiome in atopic dermatitis and its relationship to emollients. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 20, n. 1, p. 21–28, 2016.

MCDERMOTT, A. J.; HUFFNAGLE, G. B. The microbiome and regulation of mucosal immunity. **Immunology**, v. 142, n. 1, p. 24–31, 2014.

MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 12, 2012.

MUSZER, M.; NOSZCZYŃSKA, M.; KASPERKIEWICZ, K.; SKURNIK, M. Human Microbiome: When a Friend Becomes an Enemy. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, 2015.

NAKAMIZO, S.; EGAWA, G.; HONDA, T.; NAKAJIMA, S.; BELKAID, Y.; KABASHIMA, K. Commensal bacteria and cutaneous immunity. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 1, p. 73–80, 2014.

O'NEILL, C. A.; MONTELEONE, G.; MCLAUGHLIN, J. T.; PAUS, R. The gut-skin axis in health and disease: A paradigm with therapeutic implications. **BioEssays**, v. 38, n. 11, p. 1167–1176, 2016.

OHNMACHT, C.; PARK, J.-H.; CORDING, S.; WING, J. B., et al. The microbiota regulates type 2 immunity through ROR t+ T cells. **Science**, v. 349, n. 6251, p. 989–993, 2015.

PARK, H.-J.; LEE, S.-E.; KIM, H.-B.; ISAACSON, R. E.; SEO, K.-W.; SONG, K.-H. Association of Obesity with Serum Leptin, Adiponectin, and Serotonin and Gut Microflora in Beagle Dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 29, n. 1, p. 43–50, 2015.

PIEREZAN, F.; OLIVRY, T.; PAPS, J. S.; LAWHON, S. D.; WU, J.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S.; RODRIGUES HOFFMANN, A. The skin microbiome in allergen-induced canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, 2016.

SANFORD, J. a.; GALLO, R. L. Functions of the skin microbiota in health and disease. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 5, p. 370–377, 2013.

SANMIGUEL, A.; GRICE, E. a. Interactions between host factors and the skin microbiome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, p. 1499–1515, 2014.

SANTORO, D.; MARSELLA, R.; PUCHEU-HASTON, C. M.; EISENSCHENK, M. N. C.; NUTTALL, T.; BIZIKOVA, P. Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host-micro-organism interaction. **Veterinary Dermatology**, p. n/a-n/a, 13 fev. 2015.

SCHOMMER, N. N.; GALLO, R. L. Structure and function of the human skin microbiome. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 12, p. 660–668, 2013.

TIZARD, I. R.; JONES, S. W. The Microbiota Regulates Immunity and Immunologic Diseases in Dogs and Cats. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 2017.

TOMKOVICH, S.; JOBIN, C. Microbiota and host immune responses: A love-hate relationship. **Immunology**, v. 147, n. 1, p. 1–10, 2016.

TORRES, S.; CLAYTON, J. B.; DANZEISEN, J. L.; WARD, T.; HUANG, H.; KNIGHTS, D.; JOHNSON, T. J. Diverse bacterial communities exist on canine skin and are impacted by cohabitation and time. **PeerJ**, v. 5, p. e3075, 2017.

WEESE, J. S. The canine and feline skin microbiome in health and disease. **Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 137–146, 2013.

WIZEMANN, T.; OLSEN, L. a; CHOFFNES, E. R. **The Science and Applications of Microbial Genomics:: Workshop Summary**. 2013.

Z L SABREE, M R RONDON, and J. H. Metagenomics. **Cell**, p. 478–491, 2009.

ZAPATA, H. J.; QUAGLIARELLO, V. J. The Microbiota and Microbiome in Aging: Potential Implications in Health and Age-Related Diseases. **Journal of the American Geriatrics**

Society, 2015.

CAPÍTULO V

Microbioma cutâneo bacteriano de cães atópicos sazonais: antes, durante e depois da crise da doença

Resumo

As bactérias representam aproximadamente 90% das células presentes no corpo humano e de outros mamíferos e grande parte destas reside na pele, participando da barreira cutânea contra patógenos através de diversos mecanismos. Estudos sobre o microbioma cutâneo de cães e humanos baseados no sequenciamento do gene 16S rRNA, observaram que estas comunidades bacterianas são bastante diversas e influenciadas por vários fatores, dentre eles a integridade cutânea. O objetivo deste estudo foi avaliar as modificações no microbioma cutâneo de cães atópicos sazonais antes, durante e após a crise da doença para avaliar a influência da reação alérgica e do tratamento imunomodulador na comunidade bacteriana. Foram selecionados sete cães atópicos sazonais, Grupo Atópico (GA) e dez cães saudáveis, Grupo Controle (GC) e amostras foram coletadas da região interdigital, axilar, abdominal e lombar utilizando um suabe estéril. No GC, realizou-se seis coletas intervaladas de quatro semanas. No GA, as amostras foram coletadas quatro semanas antes do mês típico de crise (Pré-crise), na crise antes de iniciar o tratamento (Crise), durante a crise com tratamento (Tratamento) e após a estação de crise sem tratamento (Pós-crise). Após as coletas, as amostras foram armazenadas refrigeradas por no máximo sete dias até a extração do DNA e sequenciamento do gene 16S rRNA. Após o processamento, foi feita a análise bioinformática e estatística para avaliação taxonômica e cálculo de alpha e beta-diversidade. Os filos mais abundantes em todas as amostras foram Actinobacteria, Firmicutes, Fusobacteria e Proteobacteria. A alpha-diversidade das amostras do GC foi maior que de GA, mas não foi significativo. Em relação às áreas corpóreas, a região interdigital apresentou alpha-diversidade significativamente menor (p<0,05) que todas as outras. Pelas curvas de rarefação, a alpha-diversidade de Tratamento foi muito similar à do GC e maior que a de todos os tempos. A alpha-diversidade de Pré-crise e Crise foi significativamente menor que de Tratamento (p=0,000 e p=0,008, respectivamente). Entretanto, não houve diferença estatística significativa entre Tratamento e Pós-crise (p=0,072). Na análise de beta-diversidade por distância Unifrac em gráficos de coordenadas principais, não houve agrupamento significativo por grupo experimental, área corpórea ou tempos de coleta. Entretanto, pelas Análise Hierárquica de Agrupamento, observou-se que as amostras do GA e GC se agrupavam separadamente, assim como região interdigital agrupou-se separada de todas as outras áreas, que se mantiveram juntas. Além disso, Tratamento agrupou-se com GC e os demais tempos agruparam-se em conjunto. Observou-se também uma tendência de agrupamento das amostras menos diversas sempre com os controles negativos. Assim, conclui-se que a diversidade do microbioma cutâneo de cães atópicos sofre redução da diversidade já no período assintomático e o estabelecimento do tratamento imunomodulador é capaz de restabelecê-lo. Estes resultados são muito relevantes e promissores pois demonstram as alterações na diversidade do microbioma antes mesmo da resposta inflamatória da doença e o papel restaurador da terapia imunomoduladora, sem o uso de antimicrobianos.

Palavras-chave: microbioma cutâneo, metagenoma, dermatite atópica, dermatologia, cão.

Abstract

Bacteria represent approximately 90% of the cells present in the human body and other mammals and most of them reside in the skin, participating actively in the cutaneous barrier function against pathogens by various mechanisms. Recent studies on the cutaneous microbiome of dogs and humans based on the 16S rRNA gene sequencing, observed that these bacterial communities are quite diverse and influenced by several factors, among them the cutaneous integrity. The aim of this study was to evaluate the changes in the cutaneous microbiome of seasonal atopic dogs prior, during and after disease flare to evaluate the influence of allergic reaction and immunomodulatory therapy in the bacterial community. Seven seasonal atopic dogs, Atopic Group (AG) and ten healthy otherwise dogs, Control Group (CG) were selected and samples were collected from the interdigital spaces, axilla, abdominal and lumbar regions using a sterile cotton swab. In CG, six collection timepoints were performed in a four week interval basis. In AG, the samples were collected four weeks before the typical flare month (Pre-flare), at disease flare prior treatment (Flare), during the flare with treatment (Treatment) and after the seasonal flare without treatment (Post-flare). After collection, the samples were stored refrigerated for up to seven days prior DNA extraction and sequencing of the 16S rRNA gene. After the processing, bioinformatic and statistical analysis were performed for taxonomic evaluation and assessment of alpha and beta-diversity. The most abundant phyla in all samples were Actinobacteria, Firmicutes, Fusobacteria and Proteobacteria. The alpha-diversity of CG samples was higher than AG, but it was not significant. Regarding the body sites, the interdigital region presented a significantly lower alpha-diversity (p <0.05) than all the others. Through the rarefaction curves, the alpha-diversity of Treatment was very similar to that of CG and greater than all other timepoints. The alpha-diversity of Pre-flare and Flare was significantly lower than Treatment (p = 0.000 and p = 0.008, respectively). However, there was no significant statistical difference between Treatment and Post-flare (p = 0.072). In the analysis of beta-diversity by Unifrac distance in PCoA graphs, there was no significant clustering by experimental group, body site or collection timepoint. However, by the Aggregate Hierarchical Analysis, it was observed that the AG and CG samples clustered separately, as well as interdigital region that clustered separately from all other areas, which clustered together. In addition, Treatment was clustered with CG and other timepoints clustered together. There were also the less diverse samples had shown a trend to cluster with the negative controls. Thus, it is concluded that the diversity of skin microbiome of atopic dogs shows diversity reduction already in the asymptomatic period and the establishment of the immunomodulatory therapy is able to recover it. These results are very relevant and promising as they show changes in microbiome diversity even before the atopic dermatitis inflammatory response and the restorative role of immunomodulatory therapy without the use of antimicrobials.

Key-words: skin microbiome, metagenomics, atopic dermatitis, dermatology, dog.

INTRODUÇÃO

A pele é o maior e mais exposto órgão do corpo de humanos e animais, e uma de suas principais funções é a de formar uma barreira ao ambiente externo capaz de resistir a diversos tipos de ameaças. Para tal, a pele possui uma gama de funções de imunidade inata e adquirida. Entretanto, apesar deste potente sistema imune cutâneo, vários microrganismos vivem em sua superfície como comensais e é sabido que estes não apenas coexistem com o hospedeiro, como também possuem funções imunomoduladoras, influenciando diretamente a integridade cutânea e processos patológicos A falha no controle do equilíbrio desta microbiota residente gera infecções cutâneas (SANFORD e GALLO, 2013). As bactérias representam aproximadamente 90% das cerca de 10^{13} células que fazem parte do corpo humano e as estimativas são semelhantes para outras espécies de mamíferos (SAVAGE, 1977). Uma porção significativa desta população reside na pele, onde as bactérias participam da defesa contra patógenos (COGEN et al, 2008) através da produção de peptídeos antimicrobianos e ativação de receptores *Toll-like,* entre outros mecanismos (WANKE, 2011; CHRISTENSEN et al, 2014).

Tradicionalmente, a populações microbianas eram acessadas por métodos convencionais de cultivo. Apesar da sua notada relevância, este método tem suas limitações devido à dificuldade de cultivar determinados grupos taxonômicos, e às relações de dominância entre eles (WEESE, 2013). Estudos baseados em cultura microbiana tendem a subestimar a diversidade e abundância e superestimar determinados grupos de microrganismos (KONG e SEGRE, 2012). Atualmente, sabe-se que os microrganismos cultiváveis representam apenas uma pequena fração de todo o microbioma cutâneo. O reconhecimento destas limitações levou ao desenvolvimento de métodos metagenômicos, independentes de cultura, que são baseados no sequenciamento massivamente paralelo do material genético de um ecossistema (WEESE, 2013). Os estudos metagenômicos podem ser realizados de maneira específica ou pelo sequenciamento completo de todo o material genético da amostra (*shotgun sequencing*) (KONG, 2011). O método específico é baseado no sequenciamento de um gene, chamado marcador, capaz de identificar o genoma que o contém, sem a necessidade de sequenciá-lo completamente. Entretanto, um bom marcador deve diferir apenas entre indivíduos com genomas diferentes. O gene mais comumente utilizado como marcador para bactérias é o 16S rRNA (MORGAN e HUTTENHOWER, 2012).

Além do conhecimento taxonômico da microbiota, os estudos metagenômicos permitem a análise da diversidade, abundância e a comparação entre diferentes indivíduos ou ecossistemas. Em estudos que investigam apenas a classificação taxonômica, ou seja, que microrganismos estão presentes, o termo microbiota é o de eleição para se referir à comunidade. Se o material genético dos microrganismos, a interação entre eles e as condições microambientais de onde estão inseridos estiverem sendo pesquisados, o termo microbioma torna-se mais adequado (MARCHESI e RAVEL, 2015). Para a melhor compreensão dos estudos envolvendo microbioma, é necessário o conhecimento de alguns conceitos básicos. Primeiramente, deve-se entender o conceito de unidades taxonômicas operacionais ou *operacional taxonomic units* (OTUs). Na abordagem específica, o sequenciamento do 16S rRNA muitas vezes não possibilita a diferenciação de indivíduos até o nível de espécie com precisão, pois a variação do DNA nas regiões hipervariáveis não é suficiente para tal. Após o sequenciamento, na análise bioinformática, o programa agrupa as sequencias por similaridade usualmente de 97%. Sendo assim, o termo OTU refere-se a unidades taxonômicas, ou táxons, agrupadas com este grau de similaridade, que podem estar em variados níveis taxonômicos, dependendo da análise em questão. A diversidade consiste na mensuração da quantidade de OTUs presentes e a sua

proporção naquela comunidade. A alpha-diversidade descreve as características da diversidade dentro de uma amostra. Já a beta-diversidade compara e avalia a similaridade do microbioma entre amostras (MORGAN e HUTTENHOWER, 2012; MARCHESI e RAVEL, 2015).

A partir do sequenciamento do gene 16S rRNA em pele de humanos, percebeu-se que a maioria das bactérias cutâneas de indivíduos saudáveis eram pertencentes a quatro filos principais: Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes e Proteobacteria (GRICE e SEGRE, 2011). Existem poucos estudos realizados em dermatologia veterinária, mas os resultados mostram grandes semelhanças nos filos dominantes encontrados na pele de cães saudáveis, sendo os principais: Actinobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria e Fusobacteria (HOFFMANN et al., 2014; PIEREZAN et al., 2016; TORRES et al., 2017).

Estudos com humanos (GRICE et al., 2008, GRICE et al., 2009; COSTELLO et al., 2009) e cães (HOFFMANN et al., 2014) investigaram o microbioma bacteriano da pele íntegra e observaram que a comunidade é mais diversa que se pensava anteriormente em estudos baseados em cultura, e apresenta bastante variação individual e topográfica. Um desses estudos em humanos também demonstrou variação sazonal no microbioma cutâneo (COSTELO et al, 2009). Em humanos, a pele infantil possui menor diversidade na microbiota cutânea que a pele de adultos (CAPONE et al., 2011). Além disso, outro estudo (SONG et al., 2013) mostrou que o microbioma bacteriano de cães saudáveis se assemelha mais ao microbioma dos humanos coabitantes que de cães que vivem em outros domicílios. De maneira similar, Torres e colaboradores demonstraram que os cães têm maior probabilidade de compartilhar bactérias de pele com seus coabitantes da mesma espécie que com cães de outros domicílios (TORRES et al., 2017).

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica, recorrente e pruriginosa, que é, na grande maioria das vezes, associada a anticorpos IgE mais comumente voltados a alérgenos ambientais (HALLIWELL, 2006). Tanto em humanos quanto em cães, a DA está frequentemente associada a infecções bacterianas, principalmente por *Staphylococcus sp.* Acredita-se que durante a crise da doença, as mudanças sofridas pelo microbioma são responsáveis pelo agravamento da mesma (CHEN e TSAO, 2013). Isto posto, é crescente o interesse em pesquisas relacionadas ao microbioma bacteriano de pacientes com dermatite atópica. Um estudo que investigou a variação na comunidade bacteriana de crianças atópicas durante diferentes fases da doença, observou queda na diversidade do microbioma durante a crise, com predomínio de *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis,* sobretudo nas áreas mais frequentemente afetadas. Os pesquisadores também observaram que o tratamento da doença resultou em restauração da diversidade, semelhante àquela antes da crise (KONG et al, 2012).

De acordo com os conhecimentos dos autores, poucos estudos sobre o microbioma cutâneo de cães atópicos foram publicados e nenhum deles avaliou as suas alterações na fase assintomática, durante a crise, durante o tratamento imunomodulador e após a descontinuação do mesmo (HOFFMANN et al., 2014; BRADLEY et al., 2016; PIEREZAN et al., 2016). Sendo assim, os objetivos deste trabalho foram avaliar as alterações na diversidade do microbioma cutâneo bacteriano antes do surgimento dos sinais clínicos da crise atópica e os efeitos do tratamento imunomodulador sobre o mesmo. A análise completa das amostras deste estudo ainda está em andamento, mas serão apresentados a seguir os resultados preliminares já obtidos e analisados estatisticamente.

MATERIAL E MÉTODOS

Delineamento experimental

Este estudo foi delineado para identificar a influência das crises de dermatite atópica no microbioma cutâneo a partir de amostras de cães com dermatite atópica sazonal durante as crises da doença e em períodos assintomáticos.

Grupos experimentais

Grupo Atópico (GA)**:** foram selecionados sete cães atópicos sazonais diagnosticados por um dermatologista certificado pelo *American College of Veterinary Dermatology* (ACVD) do serviço de dermatologia veterinária do hospital veterinário universitário da University of Minnesota (UMN), em Saint Paul, Minnesota/EUA. O diagnóstico de dermatite atópica foi baseado em histórico e sinais clínicos característicos de acordo com os critérios de Favrot (2010) e adequada eliminação de outras doenças pruriginosas.

Grupo Controle (GC): foram selecionados 12 cães saudáveis, sem nenhum histórico e sem manifestações clínicas de dermatopatias ou outras doenças baseadas no histórico e exame físico realizado por um dermatologista do serviço, pertencentes à pessoas da comunidade acadêmica da Faculdade de Medicina Veterinária da UMN. Dois cães foram excluídos do estudo devido ao desenvolvimento de doenças de pele no decorrer do experimento, um com otite externa e o outro com piodermite superficial. Sendo assim, o grupo controle foi constituído por 10 cães saudáveis.

Critério de exclusão

- Utilização de antibióticos tópicos ou sistêmicos nos últimos três meses antes de cada coleta;
- Terem sido banhados durante a semana antes de cada coleta;
- Serem portadores ou manifestarem qualquer doença além da dermatite atópica sazonal.

Drogas imunomoduladoras como glicocorticoides, ciclosporina ou oclacitinib, juntamente com anti-histamínicos ou ácidos graxos essenciais, foram permitidos nos cães atópicos para aliviar seus sinais clínicos durante a crise, somente após a coleta de pelo menos uma amostra da pele. Entretanto, para padronizar os resultados, somente uma droga imunomoduladora foi permitida, sem associações e selecionada de acordo com a avaliação do veterinário dermatologista.

Coleta de amostras

As amostras foram coletadas de quatro áreas corpóreas, incluindo axila direita, abdômen direito, espaços interdigitais do membro torácico direito entre os dedos IV e V e região lombar. Foram selecionados três locais comumente afetados em cães com dermatite atópica e um local (região lombar), tipicamente não afetado.

Grupo Atópico: os cães foram recrutados quatro semanas antes do mês típico de crise identificado no seu histórico médico. As amostras foram coletas na admissão (pré-crise), dentro de sete dias após o começo dos sintomas (crise), após quatro semanas do início do tratamento (tratamento) e quatro semanas após a resolução clínica ou suspensão do tratamento (pós-crise).

Grupo Controle: para tentar uniformizar as coletas e o número de amostras dos grupos de atópicos e controle, as coletas foram realizadas a cada quatro semanas, por seis vezes, nos mesmos locais dos atópicos.

Técnica de coleta: para evitar traumatismos e contaminação na pele, as regiões selecionadas não foram tosadas antes da coleto. As coletas foram realizadas com luvas estéreis para evitar contaminação cruzada com DNA bacteriano de microbioma humano. Suabes bucais (Fig. 1) com duas faces planas sulcadas (Isohellix®, Cell Products Ltd, Kent, UK) umedecidos em água ultrapura (Invitrogen *Ultrapure DNase/RNase free destiled water*, Fisher Scientific, Pittsburgh, USA) foram friccionadas por 20 vezes em cada face, total de 40 vezes, em uma área de 8 cm^2 nos locais selecionados, para permitir que toda a superfície cutânea fosse abrangida (Fig.2). Foram coletados dois suabes por área corpórea. Posteriormente, os dois suabes de cada área de cada animal foram armazenadas nos tubos (Fig.3) *PowerBead Tubes*® (PowerSoil® DNA Isolation kit, QIAGEN, Germantown, USA) e refrigeradas a 2º a 4ºC até a extração do DNA, em no máximo sete dias após a coleta. Foram incluídos para cada animal, em cada ponto de coleta, controles negativos, que consistiram em *PowerBead Tubes*® estéreis como enviados pelo fabricante e *PowerBead Tubes*® com dois suabes umedecidos em água ultrapura.

Figura 1. Suabe bucal com faces sulcadas (Isohellix®,Cell Products Ltd, Kent, UK). Fonte: arquivo pessoal.

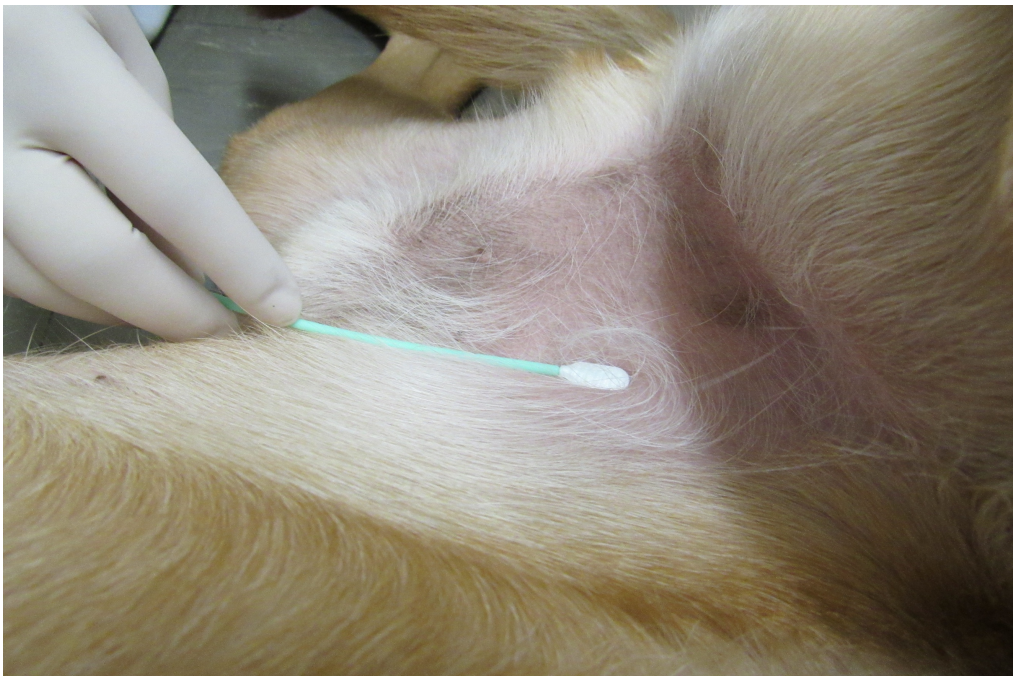

Figura 2. Coleta de amostra de pele do abdômen de um cão do Grupo Controle. Fonte: arquivo pessoal.

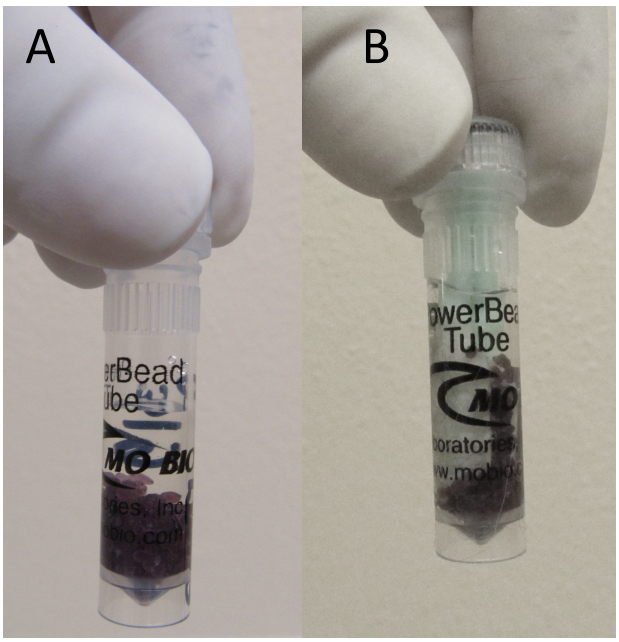

Figura 3. *PowerBead Tubes*® (PowerSoil® DNA Isolation kit, QIAGEN, Germantown, USA). A: tubo vazio como fornecido no kit pelo fabricante. B: dois suabes armazenados em um tubo.

Extração de DNA e sequenciamento genético

A extração do DNA das amostras dos cães saudáveis e atópicos foi realizada utilizando o kit comercial PowerSoil® DNA Isolation (QIAGEN, Germantown, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a extração de DNA, as amostras foram armazenadas a -20º C até o envio para o sequenciamento.

O gene marcador 16S rRNA foi amplificado usando um *primer* para região hipervariável V1-V3. As amplificações pela *polimerase chain reaction* (PCR) foram realizadas utilizando a enzima KAPA HiFidelity Hot Start Polymerase (Kapa Biosystems Inc., Wilmington, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante, em duas rodadas da PCR, no *Minnesota Genomics Center* (Minneapolis, MN, USA). A primeira rodada da PCR, utilizando os pares de primers Meta_V1_27F(5'TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGAGAGTTTGATCM TGGCTCAG3'), Meta_V3_534R(5'GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGATTACCGCGGC TGCTGG3'), consistiu em: desnaturação inicial a 95°C por cinco min (25 ciclos a 98°C por 20 s, 55°C por 15 s, 72°C por 60 s) e uma extensão final a 72°C por cinco min. E para amplificar a região hipervariável V1-V3 foram utilizados os primers Nextera (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) . Os produtos dessa primeira etapa foram então diluídos 1:100 e 5ul foram utilizados na segunda rodada de PCR utilizando os primers indexadores (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA) *forward* (5′-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT[i5]GTCTCGTGGGCTCGG-3′) e reverso (5′-AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC[i7]TCGTCGGCAGCGTC-3′). Os parâmetros da segunda rodada de PCR foram os seguintes: 95°C por cinco min (10 ciclos a 98°C por 20 s, 55°C por 15 s, 72°C por 60 s) e uma extensão final a 72°C por cinco min, aguardar até 4º C. Posteriormente, as amostras foram desnaturadas com NaOH diluído em 8pM em buffer HT1 do Ilumina, cravadas com PhiX a 15%, e desnaturadas no calor a 96º C por dois min. O sequenciamento das amostras foi feito pelo Ilumina MiSeq 600 (2 x 300 bp), kit cycle v3 (Ilumina®, San Diego, CA, USA).

Análise de dados

Após o sequenciamento, a classificação por códigos de barra foi realizada para gerar arquivos fastq para cada amostra. Os primers distais e proximais foram removidos das sequencias. O software *Quantitatitive Insights Into Microbial Ecology* (QIIME, v1.8) foi utilizado para caracterizar as amostras, como previamente descrito na literatura (CAPORASO et al., 2010). A seleção de unidades taxonômicas operacionais ou *operational taxonomic unit* (OTU) foi feita no QIIME utilizando o Uclust (EDGAR, 2010). Possíveis quimeras foram removidas através do ChimeraSlayer (HAAS et al., 2011). Após filtragem devido à baixa concentração de material em algumas amostras, das 407 amostras submetidas, 401 foram mantidas para as análises posteriores, filtragem de qualidade, agrupamento de OTUs por similaridade de 97% nas sequencias. As amostras foram rarefeitas para 1000 leituras de boa qualidade por amostra. O QIIME foi utilizado para avaliações de alphadiversidade, betadiversidade utilizando Unifrac (LOZUPONE; KNIGHT, 2005) e classificações filogenéticas utilizando a base de dados Greengenes (COLE et al., 2009). Avaliou-se a análise filogenética separada por grupos GA e GC, alphadiversidade e betadiversidade por grupos GA e GC, por ponto de coleta e por região corpórea.

Para avaliar a diversidade, a métrica selecionada foi o número de OTUs observadas por amostra (*observed OTUs*). Para verificar se havia diferença na alpha-diversidade entre os grupos, áreas

corpóreas e pontos de coletas, foram utilizadas curvas de rarefação e um Modelo Marginal Linear para 1000 sequencias aleatórias por amostra.

Para a avaliação da beta-diversidade, ou seja, similaridade entre as amostras, selecionou-se o método de *unweighted Unifrac distance* e realizou-se uma Análise de Similaridade (ANOSIM) entre os grupos, áreas corpóreas e pontos de coletas. A ANOSIM é um teste não-paramétrico similar à Análise de Variância (ANOVA), em que ao invés de utilizar os dados de rarefação puros, utiliza-se uma matriz de dissimilaridade. Posteriormente, realizou-se uma Análise de Coordenadas Principais ou *Principal Component Analyis* (PCoA), que avalia o agrupamento das amostras por similaridade, quanto mais similares, mais próximas elas estarão no espaço.

Ainda para verificar a similaridade entre amostras, decidiu-se também empregar a Análise Hierárquica de Agrupamento, via o Método de Ward e para avaliar se a significância dos achados, utilizou-se o Teste Exato de Fisher. Nesta análise, as amostras foram divididas em três grupos (1, 2 e 3), de acordo com a similaridade e quanto maior a distância entre os pontos no gráfico, mais distintas são as amostras em questão. Nos casos em que o teste acusou diferença significativa, utilizou-se a Análise de Correspondência para construção dos mapas perceptuais.
A análise estatística foi realizada utilizando o *software* R versão 3.2.4 (R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. <http://www.R-project.org/> R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014). Os resultados foram considerados significativos quando o valor de $P \geq 0.05$.

Este trabalho foi aprovado pelo *Institutional Animal Care and Use Committee* (IACUC) da UMN, comitê de ética na experimentação animal, sob o número de protocolo 1504-32497A

RESULTADOS

Após filtragem por concentração, 401 amostras foram mantidas. A quantidade total de sequencias obtidas foi de 982.134, média de 2.449,212 por amostra ([0.0 - 8.835]; D.P. = 1.810,745). Sendo assim, foi feita a rarefação para 1.000 leituras por amostra e foram mantidas 301 amostras para a análise filogenética e de diversidade. No GA, os cães tinham entre cinco e 10 anos de idade, quatro machos e três fêmeas, das raças poodle, bichon frisè, labrador retriever, pastor alemão, sem raça definida (SRD) e Scottish terrier. No GC, os cães tinham entre cinco e 10 anos de idade, quatro machos e seis fêmeas, das raças labrador retriever, golden retriever, buldogue francês, Springer spaniel, maltês, Scottish terrier e Boxer. Os tratamentos utilizados nos animais do GA foram: oclacitinib, metilprednisolona, prednisona e hidroxizine. Os dados epidemiológicos dos pacientes do GA estão sintetizados no Quadro 1 e GC no Quadro 2.

Animal	Sexo	Raça	Idade (anos)	Estação de crise	Tratamento
1	M	Poodle	5	Verão/outono	Apoquel SID
2	F	Bichon frisè	8	Verão/outono	Apoquel SID
3	M	Labrador retriever	10	Primavera/verão/outono	Metilprednisolona a cada 72 horas
4	M	Scottish terrier	4	Primavera/verão/outono	Hidroxizine BID

5	M	Pastor alemão	7	Primavera/verão/outono	Prednisona 0,25mg/kg a cada 48 horas
6	F	Labrador retriever	3	Primavera/verão/outono	Prednisona
7	F	SRD	6	Primavera/verão/outono	Prednisona

Quadro 1. Dados epidemiológicos dos cães incluídos no Grupo Atópico (GA). F: fêmea, M: macho, SID: a cada 24 horas, BID: a cada 12 horas, SRD: sem raça definida.

Animal	Sexo	Raça	Idade (anos)
C1	M	Labrador retriever	5
C2	F	Australian cattle dog	1,5
C3	M	Scottish terrier	3,5
C4	M	Golden retriever	2,5
C5	F	Boxer	10
C6	F	Labrador retriever	2,5
C7	F	Buldogue francês	5
C8	M	Maltese	7
C9	F	Golden retriever	7
C10	F	Goldendoodle	4

Quadro 2. Dados epidemiológicos dos cães incluídos no Grupo Controle (GC). F: fêmea, M: macho, SRD: sem raça definida.

Análise filogenética dos grupos Allergic e Control

A análise filogenética de todas das amostras foi feita por grupo Atópico (GA) e Grupo Controle (GC), não foram separadas por tempos experimentais ou áreas corpóreas. Os filos (Fig. 1) mais frequentemente encontrados foram: Firmicutes, Actinobacteria, Fusobacteria e Proteobacteria. As classes (Fig. 2) mais frequentemente encontradas foram: Actinobacteria, Clostridia, Fusobacteria e Alphaproteobacteria. As Ordens (Fig. 3) mais frequentes foram: Fusobacteriales, Rhodobacterales, Rhodospirillales, Sphingomonadales e Rhizobiales. Finalmente, os principais gêneros (Fig. 4) identificados foram: *Bradyrhizobium, Rubellimicrobium*, *Fusobacterium* e *Sphingomonas*.

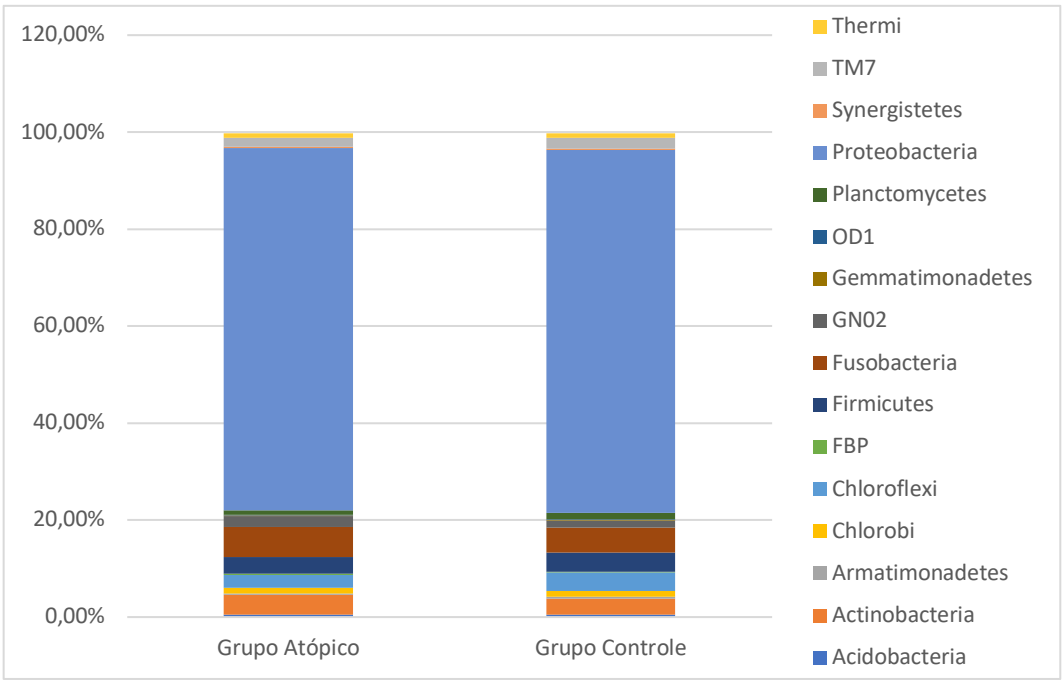

Figura 1. Análise filogenética em nível de Filo de todas as amostras separadas por Grupo Atópico e Grupo Controle.

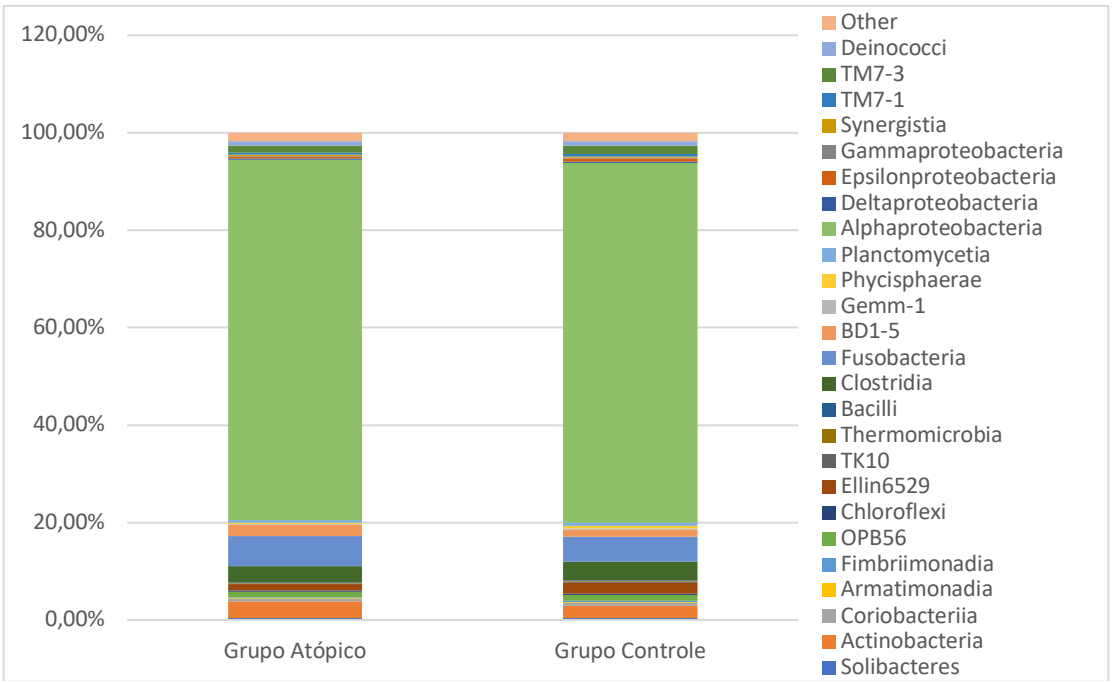

Figura 2. Análise filogenética em nível de Classe de todas as amostras separadas por Grupo Atópico e Grupo Controle.

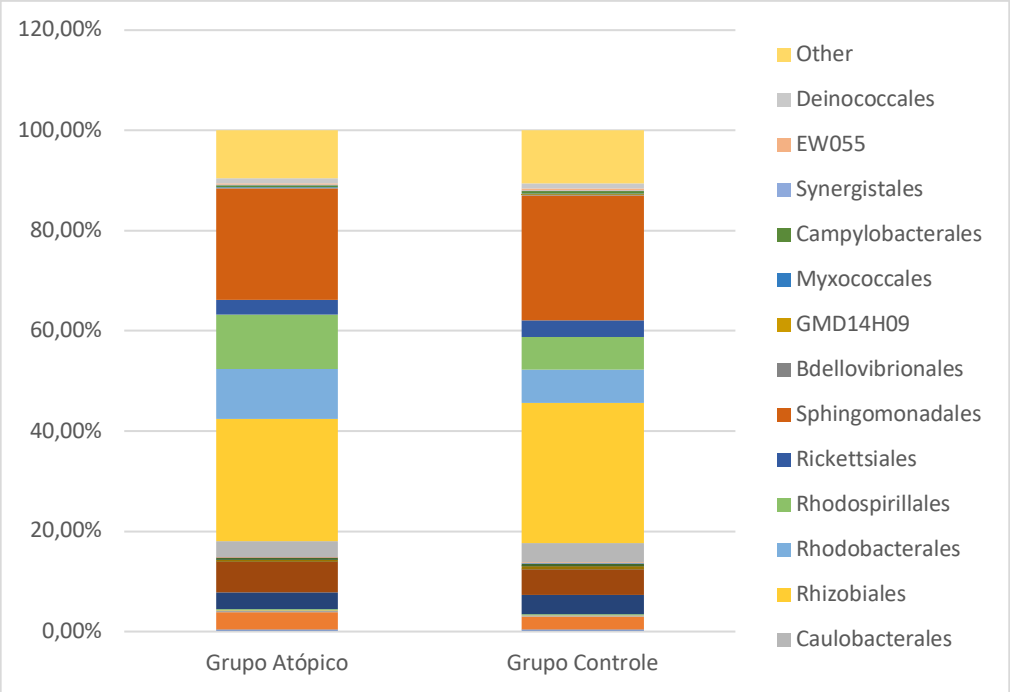

Figura 3. Análise filogenética em nível de Ordem de todas as amostras separadas por Grupo Atópico e Grupo Controle.

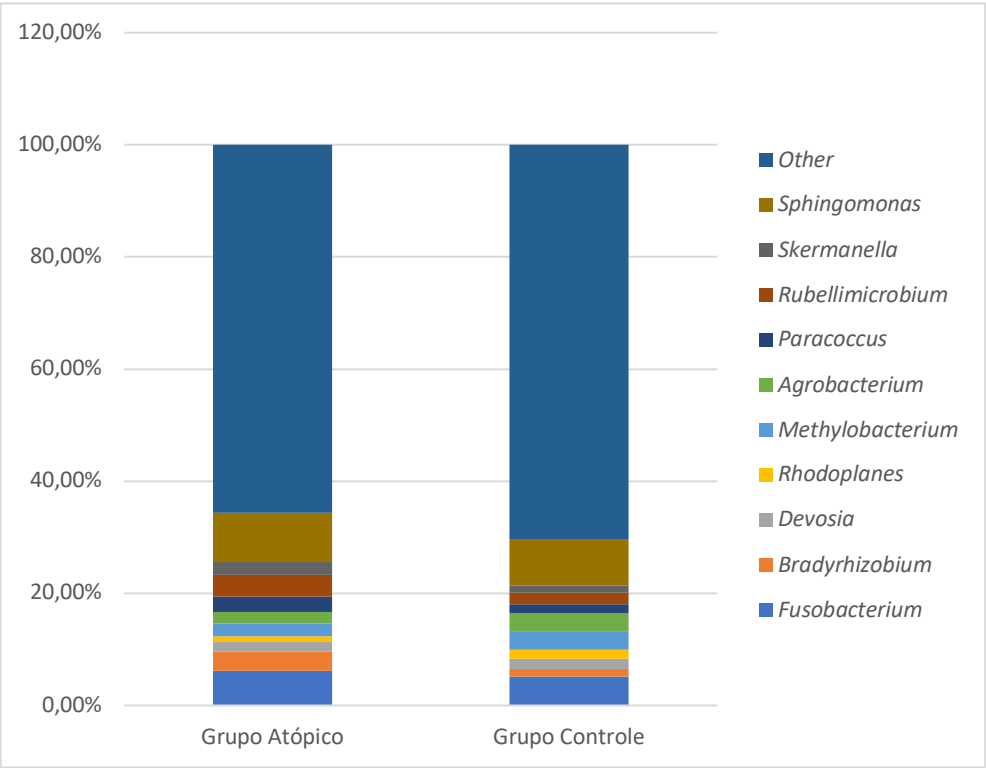

Figura 4. Análise filogenética em nível de Gênero de todas as amostras separadas por Grupo Atópico e Grupo Controle.

Análise de alpha-diversidade por grupo experimental

A análise de alpha-diversidade leva em consideração a abundância e a distribuição das OTUs dentro de uma mesma amostra. Visualmente, as amostras do GC obtiveram maior diversidade que as amostras do GA (Fig. 5). Os controles negativos apresentaram diversidade próxima de zero, o que indica que não houve grande impacto na diversidade por contaminação durante o processo. Para comparar se as diferenças visuais de diversidade entre GC e GA foram significativas, utilizou-se um Modelo Marginal Linear Univariado. Nessa análise, a medida de diversidade utilizada foi quantidade de OTUs observadas por amostra em uma rarefação de 1000 sequências por amostra, que foi onde as curvas de rarefação alcançaram o platô. Não houve diferença significativa na diversidade entre GC e GA (p = 0,220), apesar da diferença visual. A comparação da diversidade média entre os grupos GC e GA na rarefação de 1000 sequências está representada na Figura 6.

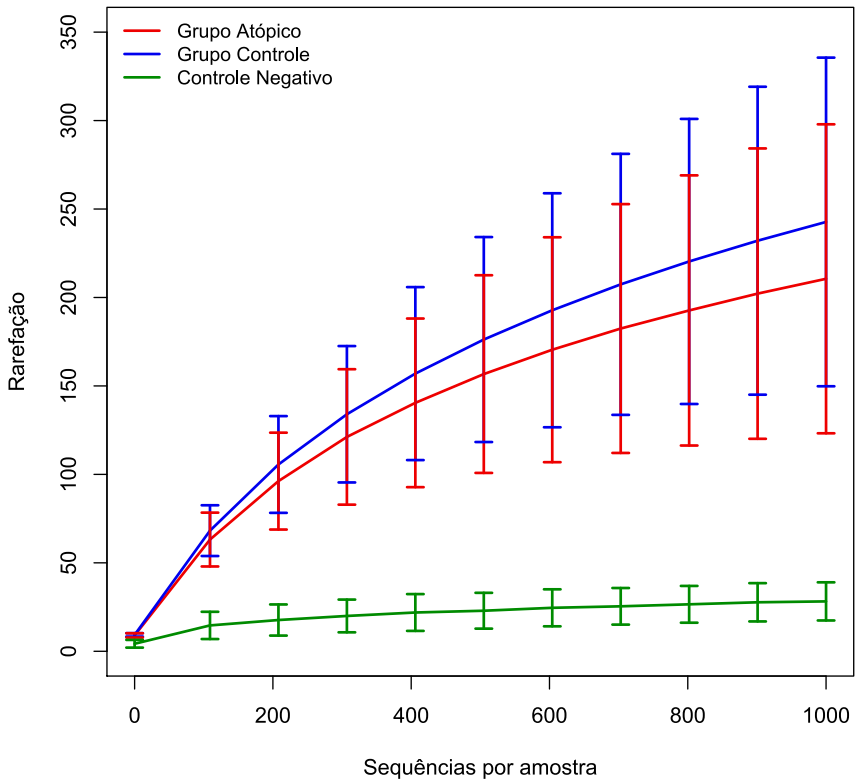

Figura 5. Análise de alphadiversidade por curvas de rarefação de todas as amostras por Grupo Atópico e Grupo Controle e controles negativos. As linhas representaram a média de cada grupo e as barras representam o desvio-padrão.

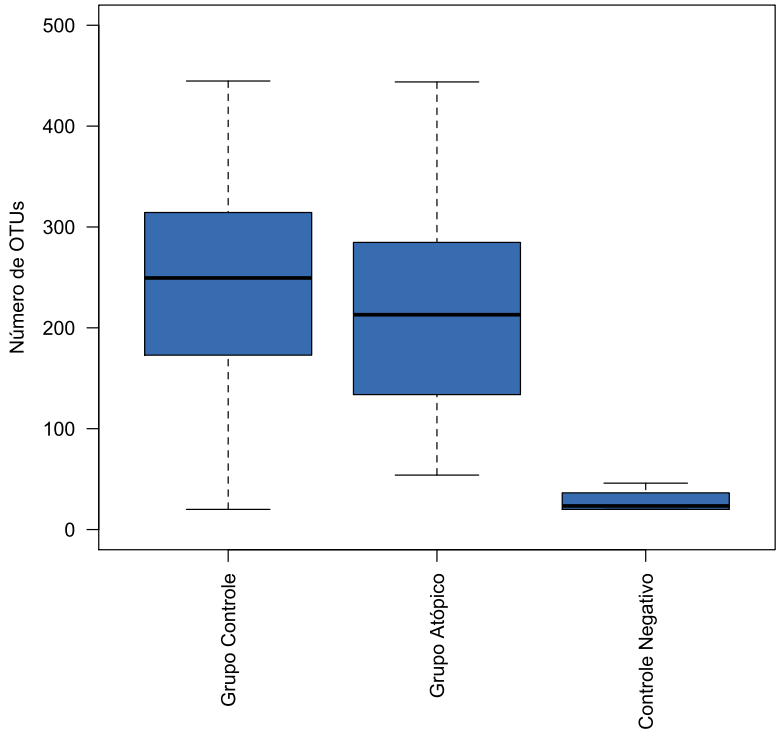

Figura 6. Boxplot representando a diversidade média das amostras dos grupos Controle e Atópico e das amostras dos controles negativos na rarefação de 1000 sequências por amostra. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers*.

Análise da alpha-diversidade por área corpórea

Para esta etapa da análise, as amostras foram divididas por regiões corpóreas. Visualmente, as amostras da região lombar e axila apresentaram maior diversidade, seguidas respectivamente pelas áreas do abdômen e região interdigital (Figura 7). Essa última região foi a que demonstrou menor diversidade. As amostras de controle negativo apresentaram novamente diversidade próxima de zero. Quando a diversidade das áreas corpóreas foi comparada pelo Modelo Marginal Univariado na rarefação de 1000 sequências por amostra (Fig. 8), não houve diferença significativa entre a diversidade das regiões lombar, axila e abdômen (p >0,05). A região interdigital apresentou a menor diversidade entre todas as áreas corpóreas analisadas (p<0,05).

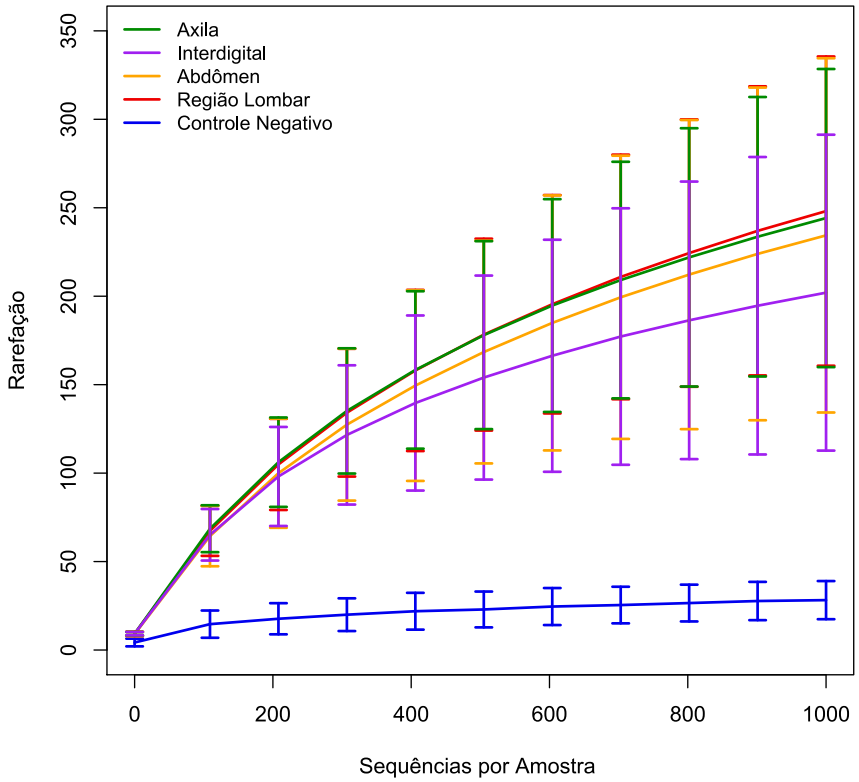

Figura 7. Análise da alpha-diversidade das amostras das áreas corpóreas estudadas de todos os grupos. As linhas representaram a média de cada grupo e as barras representam o desvio-padrão.

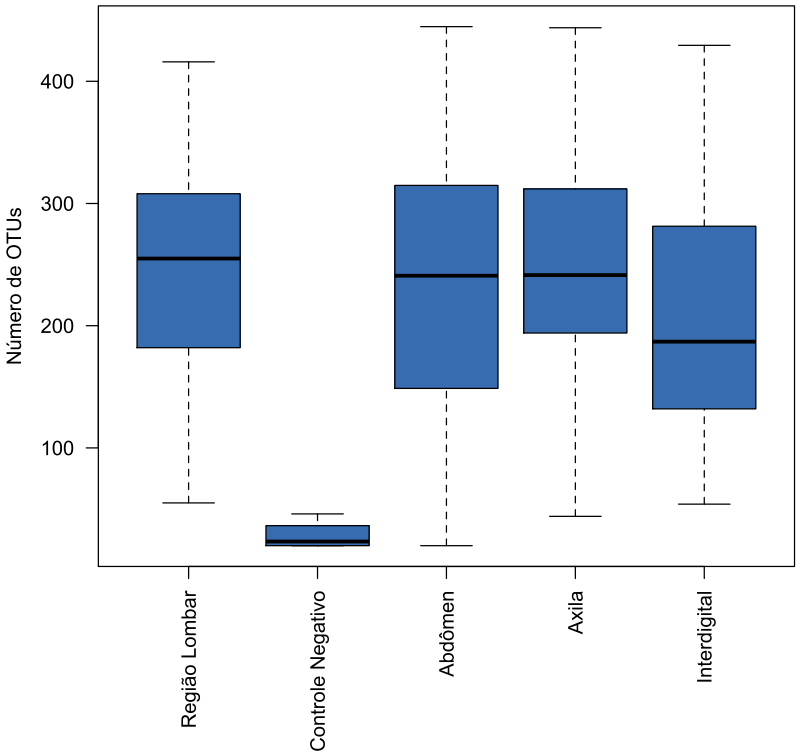

Figura 8. Boxplot representando a diversidade média das amostras das regiões corpóreas e das amostras dos controles negativos, na rarefação de 1000 sequências por amostra. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers*.

Análise da alpha-diversidade por tempo de coleta no Grupo Atópico

Visualmente, as amostras de Tratamento e do GC apresentaram a maior diversidade que todas as outras, seguidas de Pré-crise, Crise e Pós-crise (Fig. 9). As amostras dos controles negativos apresentaram diversidade próxima de zero. As amostras de Tratamento apresentaram curva de rarefação de diversidade idêntica praticamente às amostras do GC. Quando a diversidade dos tempos de coleta foi comparada pelo Modelo Marginal Univariado na rarefação de 1000 sequências por amostra (Fig. 10), observou-se que a diversidade das amostras do Tratamento foi maior que Pré-crise (p=0,000) e Crise (p=0,008), mas não houve diferença significativa entre Tratamento e Pós-crise (p=0,072). A diversidade de Tratamento (média=243,08, DP=80,14) e GC (média=242,70, DP=93,11) foi praticamente idêntica.

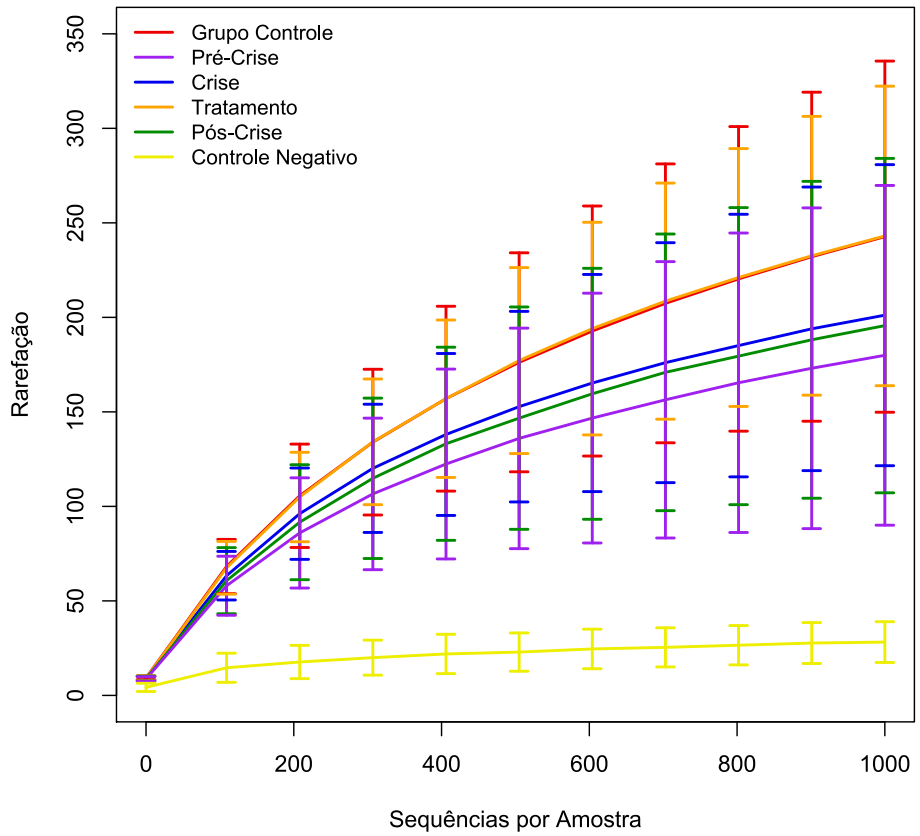

Figura 9. Análise da alpha-diversidade das amostras do Grupo Atópico em cada ponto de coleta e de todas as amostras do GC agrupadas. As linhas representaram a média de cada grupo e as barras representam o desvio-padrão.

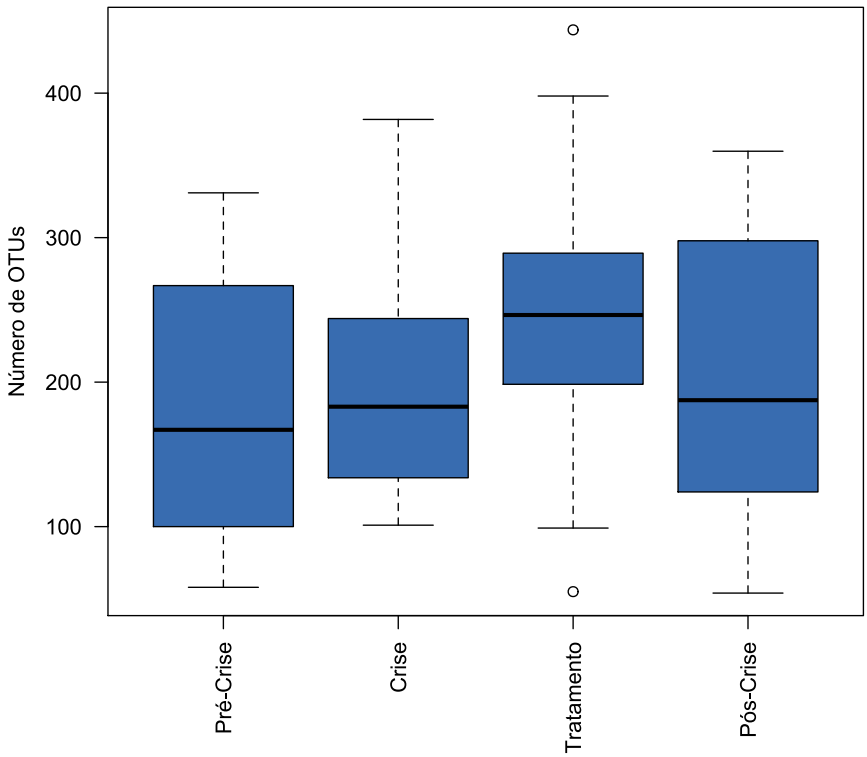

Figura 10. Boxplot representando a diversidade média das amostras do Grupo Atópico em cada ponto de coleta e de todas as amostras do Grupo Controle agrupadas. A caixa representa o intervalo interquartis, a linha em negrito representa a mediana, as barras superiores e inferiores representam os limites superior e inferior da amostra e os círculos representam os *outliers*.

Análise da beta-diversidade por grupo experimental

Na análise da beta-diversidade, foram analisadas as similaridades na composição do microbioma entre as amostras avaliadas, que estão representadas na Figura 11, em um gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA). A análise estatística utilizada nesta parte foi o ANOSIM, que é um teste não paramétrico semelhante à Análise de Variância (ANOVA), que utiliza matriz de dissimilaridade ao invés de dados de rarefação puros. Para realização do ANOSIM, utilizou-se as distâncias UNIFRAC *unweighted*, que varia de 0 a 1, quanto mais próximo de 1, mais semelhante é o microbioma das amostras. Na análise das componentes principais (PCoA), as amostras semelhantes tendem a agrupar-se e quanto maior a distância entre os pontos, maior a dissimilaridade. Não houve agrupamento significativo entre as amostras de GA e GC (ANOSIM, p=0,251), sugerindo uma grande variabilidade entre as amostras dos dois grupos. Entretanto, observou-se que os controles negativos agruparam-se separadamente, sugerindo mais uma vez que não houve grande impacto na diversidade por contaminação durante o processo.

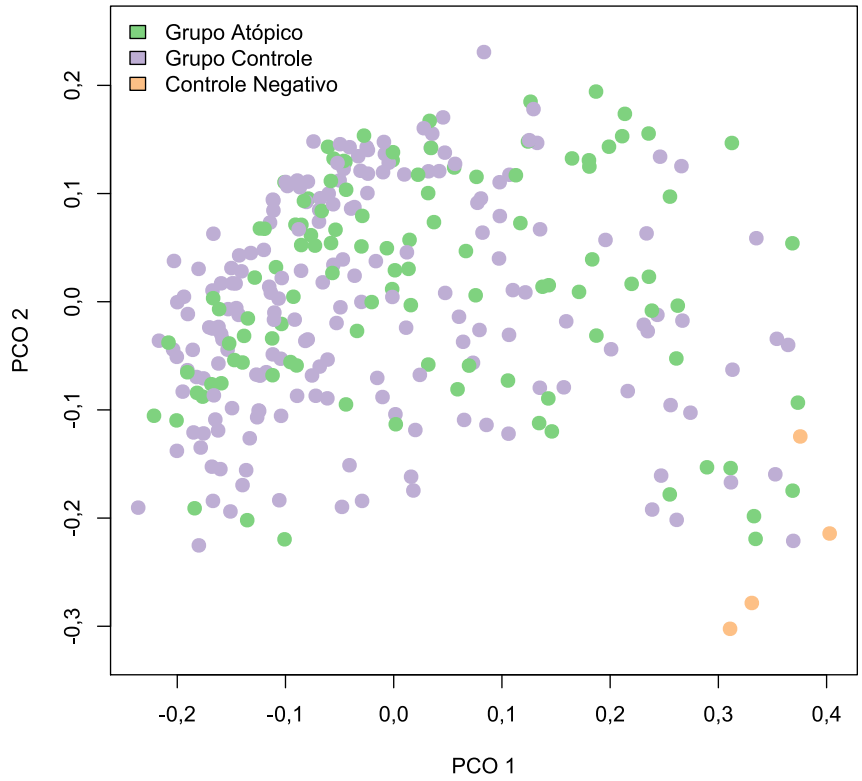

Figura 11. ***Principle coordinate analysis*** **(PCoA) de unweighted UNIFRAC analysis das amostras do Grupo Controle, Grupo Atópico e dos controles negativos.**

Quando a betadiversidade foi analisada pela Análise Hierárquica de Agrupamento (Fig.12), também a partir da distância Unifrac *unweighted*, houve diferença significativa entre os grupos GA e GC (p=0,000). As amostras de GC e GA agruparam-se separadamente. Os controles negativos agruparam-se juntamente com o GA, no grupo 3, mas houve uma grande distância entre eles, sugerindo uma grande dissimilaridade.

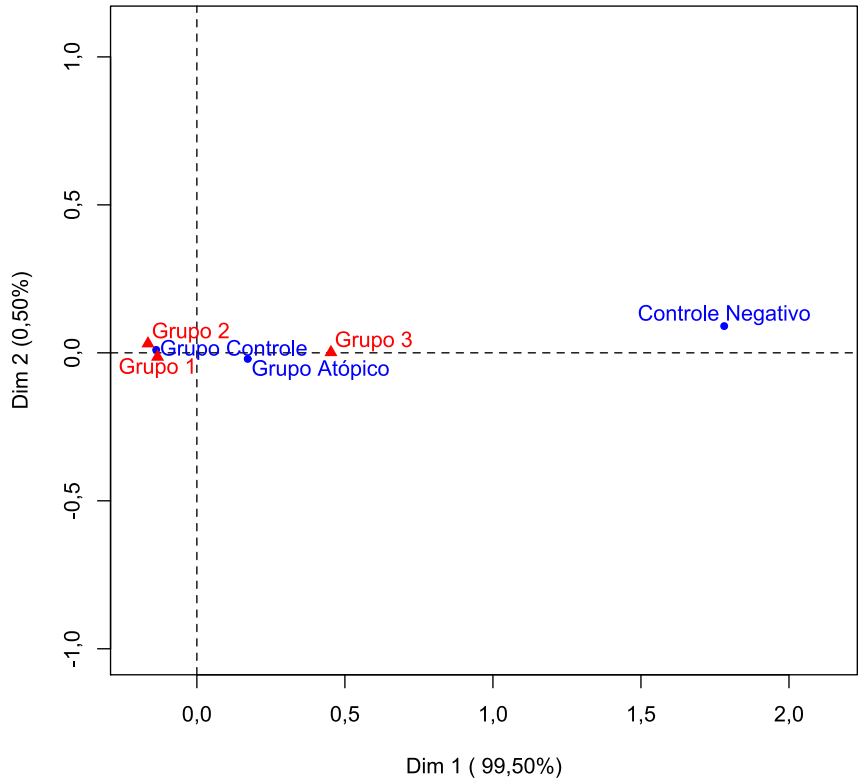

Figura 12. Mapa perceptual da Análise Hierárquica de Agrupamento dos grupos Atópico e Controle e das amostras de controle negativo.

Análise da beta-diversidade por área corpórea

Quando as amostras dos dois grupos foram reunidas e divididas por áreas corpóreas, também não foi observado agrupamento visual das amostras por local, mas os controles negativos se agruparam separadamente das amostras dos cães, reiterando o que já foi sugerido anteriormente a respeito de contaminação no processamento das amostras. Estes dados estão representados na Figura 13. Não foram observadas diferenças significativas entre as áreas corpóreas (ANOSIM, p=0,468).

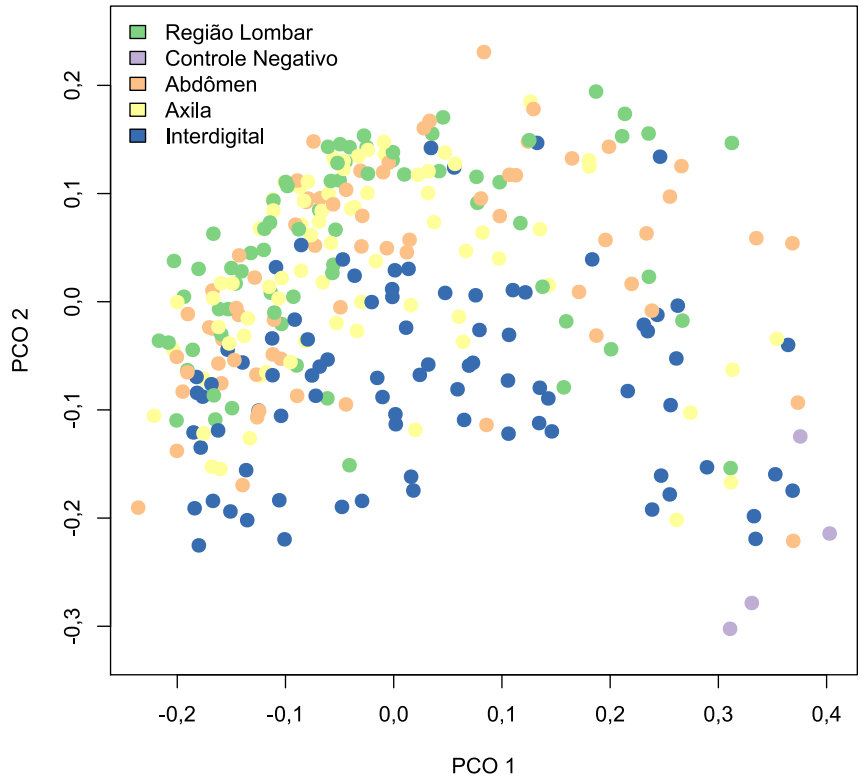

Figura 13. ***Principle coordinate analysis*** **(PCoA) de unweighted UNIFRAC analysis das amostras dos grupos Alérgico e Controle separadas por áreas corpóreas e amostras de controles negativos.**

Quando a beta-diversidade foi analisada pela Análise Hierárquica de Agrupamento (Fig.14), também feita à partir da distância Unifrac *unweighted*, houve diferença significativa entre as áreas corpóreas (p=0,000). As amostras de região lombar, axila e abdômen agruparam-se em conjunto, nos grupos 1 e 2 e as amostras da região interdigital se agruparam isoladamente das demais. Interdigital agrupou-se juntamente com o controle negativo, no grupo 3, entretanto houve uma grande distância entre elas, sugerindo uma grande dissimilaridade.

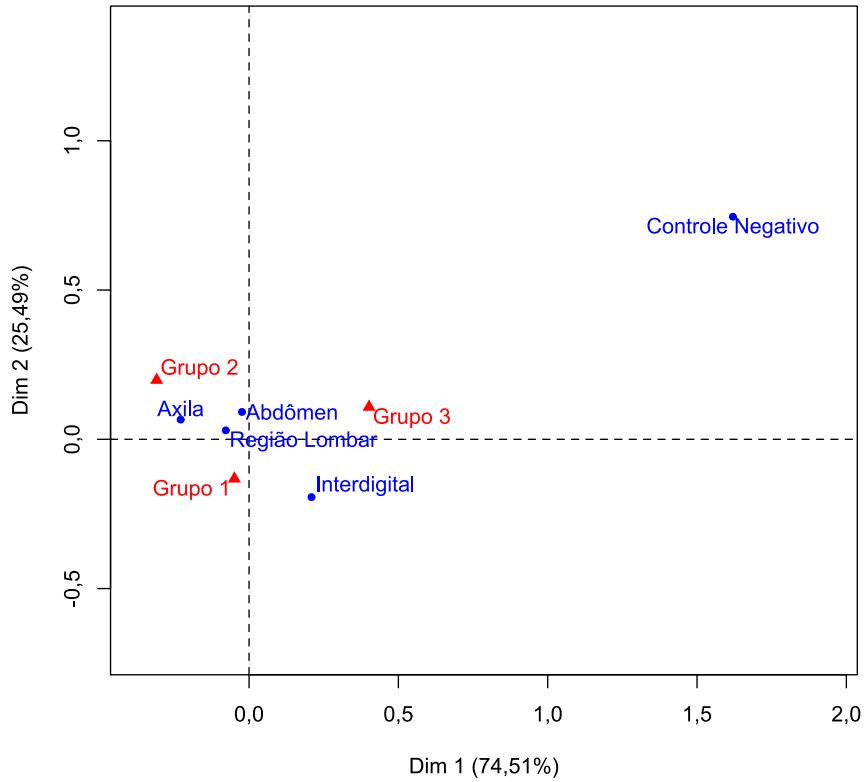

Figura 14. Mapa perceptual da Análise Hierárquica de Agrupamento das áreas corpóreas dos grupos experimentais e das amostras de controle negativo.

Análise da beta-diversidade em cada ponto de coleta do Grupo Atópico

Quando a análise da beta-diversidade de cada ponto de coleta do GA e todas as amostras do GC foi realizada, não foi observado agrupamento visual das amostras, mas novamente os controles negativos se agruparam separadamente das amostras dos cães. Estes dados estão representados na Figura 15. Não foram observadas diferenças significativas entre os pontos de coleta de coleta do GA e todas as amostras do GC (ANOSIM, p=0,997).

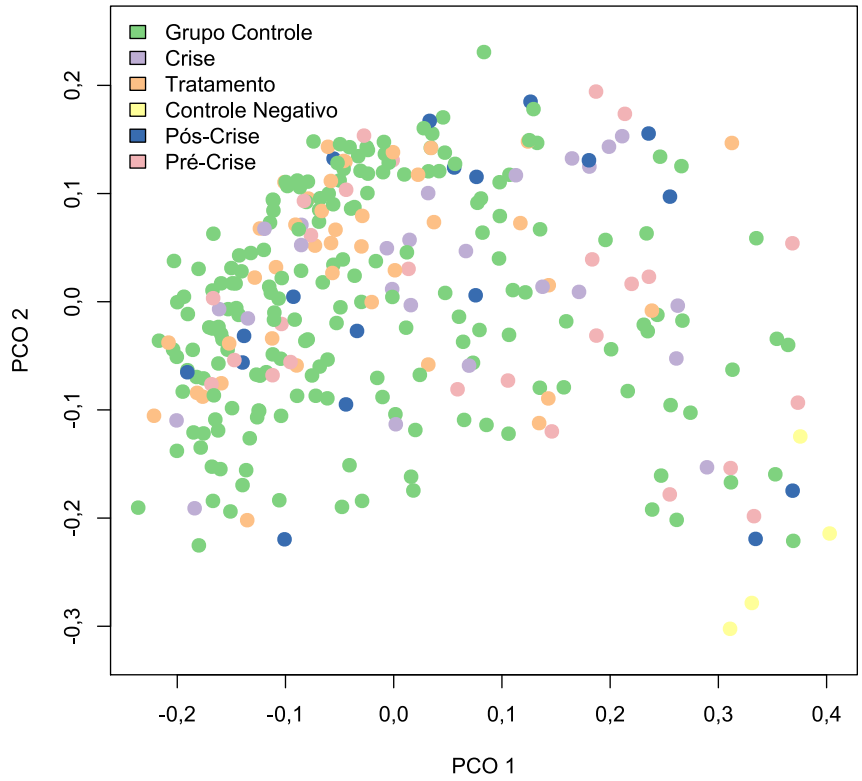

Figura 15. ***Principle coordinate analysis*** **(PCoA) de unweighted UNIFRAC analysis das amostras de cada ponto de coleta do GA, todas as amostras do GC e dos controles negativos (NegControl: suabes estéreis umedecidos com água ultrapura).**

Quando a beta-diversidade foi analisada pela Análise Hierárquica de Agrupamento (Fig.16), também feita a partir da distância Unifrac *unweighted*, houve diferença significativa entre os tempos de coleta de GA (p=0,000). As amostras do GC e do Tratamento do GA se agruparam nos grupos 1 e 2. Já as amostras de Pré-crise, Crise e Pós-Crise se agruparam no grupo 3, junto com os controles negativos. Entretanto houve uma grande distância entre elas, sugerindo uma grande dissimilaridade.

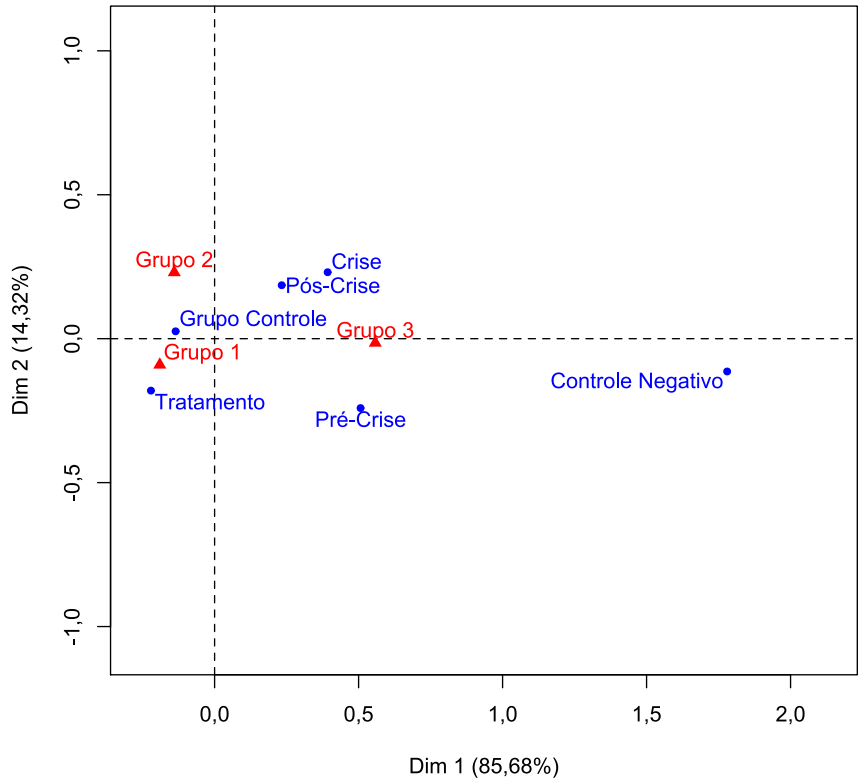

Figura 16. Mapa perceptual da Análise Hierárquica de Agrupamento do Grupo Atópico por tempos de coleta e do Grupo Controle e dos controles negativos.

DISCUSSÃO

Considerando a análise filogenética das amostras, os filos e classes mais abundantes estão de acordo com outros estudos de microbioma cutâneo bacteriano de cães (HOFFMANN et al., 2014; PIEREZAN et al., 2016; CUSCÓ et al., 2017; TORRES et al., 2017) e humanos (GRICE et al., 2009a, 2011; COSSEAU et al., 2016). Entretanto, todos estes estudos relataram frequência maior do filo Firmicutes e da classe Bacilli. A predominância de Proteobacterias também já foi documentada em alguns destes estudos (HOFFMANN et al., 2014; COSSEAU et al., 2016; CUSCÓ et al., 2017). Quando a análise taxonômica foi levada ao nível de ordem e gênero, uma grande quantidade de OTUs não pôde ser sequenciada até Gênero, indo no máximo até Ordem ou Família. Já é esperado em estudos de microbioma por abordagem específica de metagenômica que o a classificação filogenética não seja completa, sendo necessário o uso de outras técnicas de biologia molecular para sequenciar e identificar aquele microrganismo até espécie (MORGAN; HUTTENHOWER, 2012). A Classe Bacilli, a qual pertece os *Staphylococcus sp,* foi identificada somente até o nível de Ordem (Bacillales e Clostridiales). Sendo assim, não foi possível avaliar a frequência de *Staphylococcus sp*, gênero encontrado com comumente em todos os outros estudos de microbioma cutâneo consultados (GRICE et al., 2009a, 2011; HOFFMANN et al., 2014; COSSEAU et al., 2016; PIEREZAN et al., 2016; CUSCÓ et al., 2017; TORRES et al., 2017).

Este resultado foi surpreendente para os autores, já que a região V1-V3 do 16S rRNA é considerada a mais eficiente e de escolha para a especiação de *Staphylococcus sp* (MEISEL et al., 2016).

A alpha-diversidade das amostras de cães atópicos foi visualmente menor que a dos cães normais, assim como observado por Hoffmann e colaboradores (HOFFMANN et al., 2014) em cães e Kong e Segre (KONG e SEGRE, 2012) em humanos. Quando comparou-se a diversidade nos diferentes pontos de coleta, observou-se que a diversidade do microbioma dos cães do GA no Pré-crise e na crise da dermatite atópica foi menor durante no Tratamento e que as amostras do GC. Após a crise, no Pós-crise, houve queda da diversidade, mas não foi significativamente diferente daquela observada durante o Tratamento. Desta forma, pode-se dizer que a diversidade do microbioma cutâneo de cães atópicos começa a sofrer redução antes da crise. Após o estabelecimento do tratamento imunomodulador, ocorre aumento e restauração da diversidade, tornando-se muito semelhante aos animais saudáveis (GC). Ainda que a terapia imunomoduladora não tenha ação antimicrobiana direta, ela foi capaz de restabelecer o equilíbrio do microbioma. Após a crise (Pós-crise), houve queda visual na diversidade, mas não estatisticamente diferente do Tratamento. Estes resultados corroboram com outros trabalhos que demonstraram em cães e humanos que a diversidade do microbioma cutâneo é reduzida durante a crise da dermatite atópica, com supercrescimento de *Staphylococcus* sp e posteriormente, com a introdução da terapia, a tendência é a normalização da diversidade e resolução da disbiose estafilocócica (KONG et al., 2012; BRADLEY et al., 2016). Pierezan e colaboradores não observaram alteração na diversidade do microbioma cutâneo de cães atópicos após desafio experimental com alérgenos (PIEREZAN et al., 2016). Apesar de não ter sido possível avaliar a alteração filogenética do microbioma nos pontos de coleta, a queda na diversidade pode ter ocorrido por supercrescimento de *Staphylococcus pseudintermedius.* Bradley e colaboradores (2016), demonstraram que o tratamento antimicrobiano foi capaz de restaurar a diversidade e resolver a disbiose estafilocócica, mas não avaliaram antes da crise. Além disso, o uso de antimicrobianos possui ação direta nas bactérias presentes na pele do hospedeiro. O presente estudo foi o primeiro a demonstrar em cães atópicos a ação restauradora do tratamento imunomodulador na diversidade do microbioma bacteriano, sem o uso de antimicrobianos oral ou tópicos associados. Este resultado é de grande relevância da dermatologia veterinária, já que demonstra a possibilidade de restauração do equilíbrio do microbioma sem a necessidade do uso de antimicrobianos, somente com o controle da inflamação causada pela dermatite atópica, causa de base.

A alpha-diversidade da região interdigital foi menor que a de todas as outras áreas corpóreas estudadas (p<0,05). Esse resultado foi diferente do encontrado por (HOFFMANN et al., 2014). Neste estudo, as regiões corpóreas menos diversas foram as mucosas e a axila foi a região mais diversa dentre as que foram estudadas no presente estudo. A região interdigital é uma das mais frequentemente afetadas em cães com dermatite atópica (FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011). A baixa diversidade da região pode ser um fator predisponente para a intensificação dos sinais clínicos de dermatite atópica no local. Kong e colaboradores observaram que a diversidade era significativamente menor nas regiões corpóreas tipicamente lesionadas nos pacientes humanos atópicos e concluíram que estas alterações nas comunidades bacterianas locais não só favorecem o crescimento de algumas espécies como são importantes na indução e perpetuação de doenças dermatológicas (KONG et al., 2012). No presente estudo, as análises de áreas corpóreas foram realizadas sem a separação dos grupos experimentais e pontos de coleta. Assim, não é possível concluir se essa redução na diversidade da região interdigital está relacionada à dermatite atópica, se é uma característica encontrada nos cães de forma geral, ou se estaria relacionada a alguma fase específica da doença.

Quando a similaridade do microbioma cutâneo de todos os animais nas diferentes áreas corpóreas foi analisado (betadiversidade) nos gráficos PCoA e por ANOSIM, não observou-se visualmente nem estatísticamente um agrupamento das amostras de acordo com a topografia, grupo experimental ou tempos de coleta, Torres e colaboradores (TORRES et al., 2017) também não observaram agrupamento significativo entre as áreas corpóreas. Pierezan e colaboradores (PIEREZAN et al., 2016) não observaram diferenças significativas na betadiversidade de amostras em área lesional e alesional contralateral nos animais atópicos inclusos no trabalho. Hoffmann e colaboradores (HOFFMANN et al., 2014) não observaram diferenças de betadiversidade entre cães alérgicos e normais, mas observaram agrupamento distinto entre regiões corpóreas pilosas e mucosas. Diferentemente do que foi observado em animais, estudos em humanos demonstraram agrupamento significativo, ou seja, similaridade, entre diferentes nichos cutâneos (GRICE et al., 2008; GRICE et al., 2009; COSTELLO et al., 2009; SCHOMMER e GALLO, 2013).

Através da Análise Hierárquica de Agrupamento, houve diferença significativa tanto por grupo experimental quanto por área corpórea e pontos de coleta. Interessante observar que nesta análise, as amostras que apresentaram menor alpha-diversidade apresentaram similaridade entre si e com os controles negativos. Na análise por grupos experimentais, GA e GC agruparam-se separadamente. Na análise por áreas corpóreas, a região interdigital apresentou maior similaridade aos controles negativos que às outras regiões. Na análise por pontos de coleta, as amostras de Tratamento agruparam-se às do GC, demonstrando similaridade, assim como Pré-crise, Crise e Pós-crise apresentaram maior similaridade entre si e com os controles. Estes achados reforçam o que foi observado na análise de alpha-diversidade, reiterando principalmente as alterações no microbioma cutâneo bacteriano nas fases assintomáticas e sintomáticas da dermatite atópica, com recuperação do equilíbrio tornando-se similares aos animais saudáveis após o estabelecimento do tratamento. O estudo de microbioma por Análise Hierárquica de Agrupamento não é usual, já que a avaliação da beta-diversidade é feita principalmente por PCoA e ANOSIM. Entretanto, a boa correspondência dos resultados desta com a análise de alpha-diversidade sugere que pode ser um método promissor nestes estudos.

CONCLUSÕES

Os dados do presente estudo demonstram, pela primeira vez em cães atópicos, a redução da diversidade do microbioma cutâneo antes mesmo do início dos sinais clínicos da crise aguda da doença e o seu restabelecimento após a instituição da terapia imunomoduladora, sem uso de antimicrobianos. Estes resultados poderão fornecer importantes dados na patogenia da dermatite atópica e quiçá na tentativa de modulação da diversidade do microbioma no intuito de se prevenir ou atenuar os sintomas dessa doença que tanto afeta a qualidade de vida dos pacientes e de seus tutores. Além disto, a possibilidade da modulação da disbiose que ocorre na dermatite atópica a partir do controle dos mecanismos inflamatórios da doença contribui com a tendência mundial da redução do uso de antimicrobianos a fim de se reduzir a crescente prevalência de cepas bacterianas multirresistentes. Os dados apresentados e discutidos neste trabalho são preliminares de um estudo ainda em andamento e, como perspectivas futuras, os autores pretendem aprofundar a classificação filogenética, avaliar a composição do microbioma também por área corpórea e ponto de coleta, além de prolongar a identificação dos microrganismos a nível de espécie para melhor avaliar a disbiose ocorrida nos animais atópicos. Entretanto, conclui-se que os dados já obtidos de maneira preliminar apontam para resultados promissores que serão de grande contribuição no estudo da dermatite atópica canina.

REFERÊNCIAS

BRADLEY, C. W.; MORRIS, D. O.; RANKIN, S. C.; CAIN, C. L.; MISIC, A. M.; HOUSER, T.; MAUDLIN, E. A.; GRICE, E. A. Longitudinal evaluation of the skin microbiome and association with microenvironment and treatment in canine atopic dermatitis. **J Invest Dermatol**, v. 136, n. 6, p. 1182–1190, 2016.

CAPONE, K. a; DOWD, S. E.; STAMATAS, G. N.; NIKOLOVSKI, J. Diversity of the human skin microbiome early in life. **The Journal of investigative dermatology**, v. 131, n. 10, p. 2026–2032, 2011.

CAPORASO, J. G.; KUCZYNSKI, J.; STOMBAUGH, J., et al. correspondence QIIME allows analysis of high- throughput community sequencing data Intensity normalization improves color calling in SOLiD sequencing. **Nature Publishing Group**, v. 7, n. 5, p. 335–336, 2010.

CHEN, Y. E.; TSAO, H. The skin microbiome: Current perspectives and future challenges. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 69, n. 1, p. 143–155, 2013.

COLE, J. R.; WANG, Q.; CARDENAS, E.; FISH, J.; CHAI, B.; FARRIS, R. J.; KULAM-SYED-MOHIDEEN, A. S.; MCGARRELL, D. M.; MARSH, T.; GARRITY, G. M.; TIEDJE, J. M. The Ribosomal Database Project: Improved alignments and new tools for rRNA analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 1, p. 141–145, 2009.

COSSEAU, C.; ROMANO-BERTRAND, S.; DUPLAN, H.; LUCAS, O.; INGRASSIA, I.; PIGASSE, C.; ROQUES, C.; JUMAS-BILAK, E. Proteobacteria from the human skin microbiota: Species-level diversity and hypotheses. **One Health**, v. 2, p. 33–41, 2016.

COSTELLO, E. K.; LAUBER, C. L.; HAMADY, M.; FIERER, N.; GORDON, J. I.; KNIGHT, R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. **Science (New York, N.Y.)**, v. 326, n. 5960, p. 1694–1697, 2009.

CUSCÓ, A.; BELANGER, J. M.; GERSHONY, L.; ISLAS-TREJO, A.; LEVY, K.; MEDRANO, J. F.; SÁNCHEZ, A.; OBERBAUER, A. M.; FRANCINO, O. Individual signatures and environmental factors shape skin microbiota in healthy dogs. **Microbiome**, v. 5, n. 1, p. 139, 2017.

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.

FAVROT, C.; STEFFAN, J.; SEEWALD, W.; PICCO, F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 1, p. 23–31, 2010.

GRICE, E. a.; KONG, H. H.; CONLAN, S.; DEMING, C. B.; DAVIS, J.; YOUNG, A. C.; PROGRAM, N. C. S.; BOUFFARD, G. G.; BLAKESLEY, R. W.; MURRAY, P. R.; GREEN, E. D.; TURNER, M. L.; SEGRE, J. a. Topographical and temporal diversity of the human skin. **Science**, v. 324, n. 5931, p. 1190–1192, 2009a.

GRICE, E. a.; KONG, H. H.; RENAUD, G.; YOUNG, A. C.; BOUFFARD, G. G.;

BLAKESLEY, R. W.; WOLFSBERG, T. G.; TURNER, M. L.; SEGRE, J. a. A diversity profile of the human skin microbiota. **Genome Research**, v. 18, n. 7, p. 1043–1050, 2008.

GRICE, E. A.; SEGRE, J. A.; MANUSCRIPT, A.; GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. The skin microbiome. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 244–253, 2011.

GRICE, E. a; KONG, H. H.; CONLAN, S.; DEMING, C. B.; DAVIS, J.; YOUNG, A. C.; BOUFFARD, G. G.; BLAKESLEY, R. W.; MURRAY, P. R.; GREEN, E. D.; TURNER, M. L.; SEGRE, J. a. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. **Science**, v. 324, n. 5931, p. 1190–1192, 2009b.

HAAS, B. J.; GEVERS, D.; EARL, A. M.; FELDGARDEN, M.; WARD, D. V; GIANNOUKOS, G.; CIULLA, D.; TABBAA, D.; HIGHLANDER, S. K.; SODERGREN, E.; METHÉ, B.; DESANTIS, T. Z.; THE HUMAN MICROBIOME CONSORTIUM; PETROSINO, J. F.; KNIGHT, R.; BIRREN, B. W. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-Pyrosequenced PCR amplicons. **Genome Research**, v. 21, p. 494–504, 2011.

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

HOFFMANN, A. R.; PATTERSON, A. P.; DIESEL, A.; LAWHON, S. D.; LY, H. J.; STEPHENSON, C. E.; MANSELL, J.; STEINER, J. M.; DOWD, S. E.; OLIVRY, T.; SUCHODOLSKI, J. S. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

KONG, H. H. Skin microbiome: Genomics-based insights into the diversity and role of skin microbes. **Trends in Molecular Medicine**, v. 17, n. 6, p. 320–328, 2011.

KONG, H. H.; OH, J.; DEMING, C.; CONLAN, S. et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. **Genome Research**, v. 22, n. 5, p. 850–859, 2012.

KONG, H. H.; SEGRE, J. a. Skin Microbiome: Looking Back to Move Forward. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 933–939, 2012.

LOZUPONE, C.; KNIGHT, R. UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities UniFrac : a New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 12, p. 8228–8235, 2005.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 31, 2015.

MEISEL, J. S.; HANNIGAN, G. D.; TYLDSLEY, A. S.; SANMIGUEL, A. J.; HODKINSON, B. P.; ZHENG, Q.; GRICE, E. A. Skin Microbiome Surveys Are Strongly Influenced by Experimental Design. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 136, n. 5, p. 947–956, 2016.
MORGAN, X. C.; HUTTENHOWER, C. Chapter 12: Human Microbiome Analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 8, n. 12, 2012.

PIEREZAN, F.; OLIVRY, T.; PAPS, J. S.; LAWHON, S. D.; WU, J.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S.; RODRIGUES HOFFMANN, A. The skin microbiome in allergen-induced canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, 2016.

SANFORD, J. a.; GALLO, R. L. Functions of the skin microbiota in health and disease. **Seminars in Immunology**, v. 25, n. 5, p. 370–377, 2013.

SCHOMMER, N. N.; GALLO, R. L. Structure and function of the human skin microbiome. **Trends in Microbiology**, v. 21, n. 12, p. 660–668, 2013.

SONG, S. J.; LAUBER, C.; COSTELLO, E. K.; LOZUPONE, C. a.; HUMPHREY, G.; BERG-LYONS, D.; GREGORY CAPORASO, J.; KNIGHTS, D.; CLEMENTE, J. C.; NAKIELNY, S.; GORDON, J. I.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Cohabiting family members share microbiota with one another and with their dogs. **eLife**, v. 2013, n. 2, p. 1–22, 2013.

TORRES, S.; CLAYTON, J. B.; DANZEISEN, J. L.; WARD, T.; HUANG, H.; KNIGHTS, D.; JOHNSON, T. J. Diverse bacterial communities exist on canine skin and are impacted by cohabitation and time. **PeerJ**, v. 5, p. e3075, 2017.

WEESE, J. S. The canine and feline skin microbiome in health and disease. **Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 137–146, 2013.

WILHEM, S.; KOVALIK, M.; FAVROT, C. Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 22, n. 2, p. 143–149, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados, pode-se concluir que as características epidemiológicas da dermatite atópica no grupo de cães deste estudo estão de acordo com o já descrito na literatura, exceto pela maior frequência de rinite alérgica e pela predisposição racial, que sabidamente sofre variações regionais. Além disso, observou-se maior índice de gravidade (CADSI) nos pacientes com dermatite atópica induzida por alimentos. Não foram encontradas diferenças significativas estatisticamente entre ALD e AD quando os dados epidemiológicos e clínicos foram comparados. Entretanto, observamos diferenças clínicas no escore de prurido na primeira visita e ao longo das visitas. Em relação à predisposição racial, o Bichon Frisé apresentou maior risco de desenvolver ALD que outras raças. O grupo ALD incluiu uma frequência maior de pacientes com prurido grave na primeira visita, prurido moderado médio ao longo das visitas e frequência menor de pacientes com prurido leve ao longo das visitas. Apesar de não terem sido diferenças estatísticas significativas, é possível que este dado tenha alguma importância clínica, pois esses achados podem sugerir maior intensidade de prurido primariamente e resposta mais pobre ao tratamento nos cães com ALD. Quando comparamos o indicador CADSI entre os grupos e correlacionamos às variáveis epidemiológicas, não encontramos diferenças entre ALD e AD e não identificamos fatores correlacionados à maior ou menor severidade, exceto a resposta positiva à dieta de eliminação, que foi correlacionada a maior gravidade da doença. Em relação ao microbioma cutâneo bacteriano, os dados preliminares do presente estudo demonstram pela primeira vez a redução da sua diversidade antes mesmo do surgimento dos sinais clínicos da crise aguda da doença e o seu reestabelecimento após a instituição da terapia imunomoduladora, sem a necessidade do uso de antimicrobianos. Estes resultados são bastante relevantes e promissores na dermatologia veterinária, pois demonstram a possibilidade da restauração do equilíbrio do microbioma sem a necessidade do uso de antimicrobianos, mas sim com o controle da doença de base, contribuindo com a tendência mundial de redução do uso destas drogas.