

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE VETERINÁRIA
COLEGIADO DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**ANÁLISE DE BIOMARCADORES NA DERMATITE ATÓPICA EM CÃES
ANTES E DURANTE O TRATAMENTO COM MALEATO DE OCLACITINIB**

GUILHERME DE CARO MARTINS

Belo Horizonte-MG

2018

GUILHERME DE CARO MARTINS

**Análise de biomarcadores na dermatite atópica em cães antes e durante o
tratamento com maleato de oclacitinib**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da
Universidade Federal de Minas Gerais, como
parte dos requisitos para obtenção do título de
Doutor em Ciência Animal

Área: Medicina e Cirurgia Veterinárias

Orientador: Profa. Marília Martins Melo

Belo Horizonte- MG

2018

M386a Martins, Guilherme de Caro, 1985-
Análise de biomarcadores na dermatite atópica em cães antes e durante o
tratamento com maleato de oclacitinib / Guilherme de Caro Martins. – 2018.
116 p. : il.

Orientador: Marília Martins Melo
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária
Inclui bibliografia

1. Cão – Doenças – Tratamento – Teses. 2. Pele – Doenças – Tratamento – Teses.
3. Medicamentos – Administração – Teses. 4. Dermatologia veterinária – Teses.
5. Biomarcadores – Teses. I. Melo, Marília Martins. II. Universidade Federal de
Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.708 965

Recebi da Biblioteca da Escola de Veterinária / UFMG, o modelo da ficha catalográfica de minha Tese.

FOLHA DE APROVAÇÃO

GUILHERME DE CARO MARTINS

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 Veterinária.

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



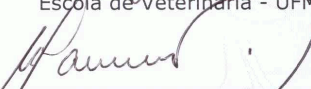
Profª. Marília Martins Melo
Presidente – Orientador



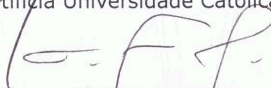
Prof. Rodolfo Cordeiro Giunchetti
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG



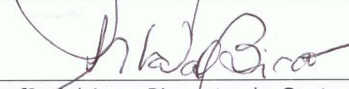
Prof. Felipe Pierezan
Escola de Veterinária - UFMG



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



Prof. Vitor Márcio Ribeiro
Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMINAS



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

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rogério e Carmen, por todo apoio e incentivo nas minhas buscas diárias pelo aprendizado, e aos ensinamentos de jamais desistir e sim, superar as barreiras inerentes à formação científica.

Aos meus irmãos, Bernardo, Carolina e Clarisse por estarem sempre juntos e assim me proporcionarem um alicerce na vida pessoal e profissional. Ao meu sobrinho, Bernardo, por trazer alegria em todos os momentos. À família de São Paulo (Vó Lita, Tia Kika, Tia Rosana, Tia Sônia, Tio Luiz e primos Mariana, Júlia, Rodrigo e Juliana), de Belo Horizonte [Vó Maria (*in memoriam*), Tia Magui e Renato] e a de Brasília (Tio Roberto, Maguida, Juliana e Rodrigo) por sempre proporcionarem momentos de alegria quando nos encontramos.

À professora Marília, pelo carinho, pela oportunidade de realizar essa tese, por ter me acolhido pela segunda vez como seu orientado, e também ter me propiciado todas as condições possíveis e necessárias para desenvolver o nosso trabalho.

À professora Adriane por todo o apoio em todas as etapas da minha vida acadêmica, fundamental para as minhas escolhas e decisões, e que se tornou realmente uma “tia” carinhosa em minha vida. Aos professores Rodolfo e Denise por terem me recebido tão bem e terem aberto as portas do seu laboratório para que pudessemos realizar etapas importantíssimas do nosso experimento, assim como pelas grandes idéias e ajuda no decorrer no projeto.

Aos colegas do Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LBIC-UFMG), em especial ao Otoni e Marina pelo grande auxílio durante o experimento.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia, especialmente à Ana Flávia, Gabriela, Marina, Beatriz, Stephanie por terem me ajudado muito durante todo o período. Um agradecimento especial também à Larissa, que além de ser uma grande amiga é uma colega dermatóloga que me ajudou durante todo o período experimental.

Aos professores coorientadores, Adriane Costa Val, Benito Blanco e Maira Souza, que contribuíram imensamente durante as etapas de desenvolvimento do projeto, qualificação e pré-defesa, com sugestões valiosas.

Aos professores componentes da banca, Profa. Adriane Costa Val, Prof. Felipe Pierezan, Prof. Marconi Farias, Prof. Rodolfo Giunchetti, Prof. Vitor Ribeiro, e novamente à professora Marília Melo pela disponibilidade e grande contribuição à tese.

Aos professores que me deram suporte no experimento, permitindo com bastante coleguismo a utilização de estruturas físicas e materiais para o experimento: Prof. Alan (diretor do hospital veterinário), Prof. Paulo Ricardo, Profa. Fabíola Paes, Prof. Rodolfo Giunchetti.

Aos meus amigos da graduação André, Pedro Balbino, Bruno (kuririm), Carlinha, Thiago Facury, Gustavo Caetano (homer), Luiz Paulo, Mônica, Naiara, Rafael (Quick) e Stephanie Branco

Aos meus amigos da veterinária em especial a um grupo que compartilhou todos os momentos de distração e amizade (Bernardo Martins, Bruno Torres, Caian Stolf, Flávio Alonso, Sebastian Gutierrez, Rodrigo Valadares, Leandro Caxito, Adônis Baldasso, Bruno Girimum, Matheus Loés, Felipe e Adriano).

Ao Hospital Veterinário por proporcionar momentos de muito aprendizado e crescimento profissional. A Dra. Gleidice, Prof. Rubens, Prof. Fernando Bretas, Dr. Artur Vasconcelos, Prof. Júlio Cambraia, que além de excelentes profissionais, considero-os como amigos.

Ao apoio da CNPQ, pela bolsa e apoio financeiro que possibilitou a realização desse projeto E a todos que de alguma forma me ajudaram e acompanharam durante todo esse período.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE QUADROS	13
LISTA DE GRÁFICOS	14
LISTA DE ANEXOS	15
LISTA DE ABREVIACÕES	16
RESUMO	18
<i>ABSTRACT</i>	19
INTRODUÇÃO	20
CAPÍTULO 1. REVISÃO DE LITERATURA	23
1. CONCEITO DA DERMATITE ATÓPICA CANINA	23
2. PATOGÊNESE	23
2.1 Alterações na barreira cutânea	25
2.2 Imunopatogenia	26
2.2.1 Papel da imunidade inata	26
2.2.2 Alterações na imunidade humoral	27
2.2.3 Alterações de linfócitos, citocinas e quimiocinas	28
2.2.4 Papel da infecção bacteriana	30
2.2.5 Hipótese da imunopatogenia na dermatite atópica canina	31
3. SINAIS CLÍNICOS	31
4. DIAGNÓSTICO	35
5. TRATAMENTO	37
5.1 Antihistamínicos	38
5.2 Cicloporina	38
5.3 Imunoterapia alérgeno específica (ITAE)	39

5.4 Glicocorticóides	39
5.5 Lokivetmab	39
5.6 Enzimas Janus quinase	40
5.6.1- Estrutura das JAKs	40
5.6.2- Mecanismos regulatórios das JAKs	41
5.6.3- JAKs e a sinalização de citocinas	42
5.6.4- Maleato de oclacitinib	45
6. AVALIAÇÃO DA IMUNOTOXICIDADE	45
6.1- Etapa 1	46
6.1.1- Imunopatologia	47
6.1.2- Imunidade humoral	47
6.1.3- Imunidade celular	49
6.2- Etapa 2	50
6.3- Modelos animais em imunotoxicologia	51
6.4- Citometria de fluxo	52
CAPÍTULO 2. CARACTERIZAÇÃO <i>EX VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> DA	55
IMUNOFENOTIPAGEM EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA	
RESUMO	55
1- INTRODUÇÃO	56
2- MATERIAL E MÉTODOS	56
2.1- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO AVALIADA	57
2.2- IMUNOFENOTIPAGEM	57
2.2.1- Avaliação <i>ex vivo</i>	57
2.2.2- Avaliação <i>in vitro</i>	59
2.3- MENSURAÇÃO SÉRICA DE IgE TOTAL	64
2.4- ANÁLISE ESTATÍSTICA	64
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
3.1- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO AVALIADA	64
3.2- IMUNOFENOTIPAGEM DOS LEUCÓCITOS	64
3.2.1- Avaliação <i>ex vivo</i>	64

3.2.2- <i>Avaliação in vitro</i>	67
3.3- MENSURAÇÃO DE IgE TOTAL	68
4- CONCLUSÕES	69
CAPÍTULO 3. AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA E DOS EFEITOS	67
TÓXICOS DO MALEATO DE OCLACITINIB NO CONTROLE DA	
DERMATITE ATÓPICA CANINA	
RESUMO	70
1- INTRODUÇÃO	71
2- MATERIAL E MÉTODOS	71
2.1- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO AVALIADA	72
2.2- TRATAMENTO	72
2.3- MONITORIZAÇÃO DOS PACIENTES	72
2.3.1- Avaliação da eficácia do fármaco	72
2.3.2- Avaliação da segurança do fármaco	73
2.3.2.1- Exame físico	73
2.3.2.2- Avaliação hematológica	73
2.3.2.2.1- Hemograma	73
2.3.2.2.2- Bioquímica sérica	74
2.3.2.3- Citometria de fluxo	74
2.3.2.3.1- Avaliação <i>ex vivo</i> de leucócitos	74
2.3.2.3.2- Avaliação <i>in vitro</i>	75
2.4- ANÁLISE ESTATÍSTICA	75
3- RESULTADOS E DISCUSSÃO	76
3.1- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO AVALIADA	76
3.2- MONITORIZAÇÃO DOS PACIENTES	77
3.2.1- Avaliação da eficácia do fármaco	77
3.2.2- Avaliação da segurança do fármaco	80
3.2.2.1- Ocorrências anormais isoladas	80
3.2.2.2- Hemograma	81
3.2.2.3- Bioquímica sérica	84

3.2.2.4- Imunofenotipagem <i>ex vivo</i>	87
3.2.2.5- Imunofenotipagem <i>in vitro</i>	90
4- CONCLUSÕES	93
CONSIDERAÇÕES FINAIS	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1	Fatores patogênicos responsáveis pela inflamação cutânea e prurido em cães com dermatite atópica e suas interrelações	24
Figura 2	Resumo do envolvimento dos linfócitos T na dermatite atópica	29
Figura 3	Áreas corporais acometidas e sinais clínicos observados em animais com dermatite atópica canina	32
Figura 4	Distribuição lesional e de prurido na dermatite atópica canina de acordo com raça acometida. Cada cor representa a frequência de animais afetados na área correspondente. Dados obtidos de Wilhem et al. (2011)	34
Figura 5	Abordagem multifacetada para o tratamento de dermatite atópica canina.	37
Figura 6	Esquema estrutural do grupo Janus quinase (JAKs)	41
Figura 7	Atuação das enzimas Janus quinase (JAK), na ativação do receptor de citocinas	42
Figura 8	Grupos de receptores de citocinas que utilizam as enzimas Janus quinase (JAK) para sinalização	44
Figura 9	Diagrama esquemático do teste ELISA (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)	49

CAPÍTULO 2

Figura 1	Representação sequencial para determinação de subpopulações linfocitárias e de monócitos em cães com dermatite atópica canina	59
Figura 2	Representação sequencial para determinação de produção de IL-4 por células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ em cães com dermatite atópica canina	61
Figura 3	Representação sequencial para determinação de produção de Interferon gama (IFN- γ) por células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ em cães com dermatite atópica canina	63
Figura 4	Representação comparativa dos valores médios da imunofenotipagem <i>ex vivo</i> de leucócitos entre cães com dermatite atópica canina (grupo experimental) e cães saudáveis (grupo controle)	66

CAPITULO 3

Figura 1	Monitorização fotográfica de um cão, da raça poodle, com dez anos de idade, diagnosticado com dermatite atópica canina e tratado com maleato de oclacitinib por 12 meses	79
-----------------	--	-----------

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1	Comparação dos valores médios da imunofenotipagem <i>ex vivo</i> em sete cães saudáveis (controle) e treze cães com dermatite atópica canina.	65
Tabela 2	Comparação dos valores médios da imunofenotipagem <i>in vitro</i> de sete cães saudáveis (controle) e 13 cães com dermatite atópica canina (atópicos).	67

CAPÍTULO 3

Tabela 1	Efeito do tempo sobre as variáveis de hemograma em cães tratados com maleato de oclacitinib por 12 meses através dos ajustes dos Modelos Marginais Log-Lineares	83
Tabela 2	Efeito do tempo nas variáveis da bioquímica sérica em cães tratados com maleato de oclacitinib por 12 meses através dos ajustes dos Modelos Marginais Log-Lineares	86
Tabela 3	Efeito do tempo sobre as variáveis de imunofenotipagem <i>ex vivo</i> em cães com dermatite atópica tratados com maleato de oclacitinib por um ano	89
Tabela 4	Efeito do tempo sobre os valores médios de imunofenotipagem <i>in vitro</i> , em culturas sem estímulo e estimuladas com ácaro <i>Dermatophagoides farinae</i> .	91

LISTA DE QUADROS

CAPITULO 1

Quadro 1	Principais citocinas e quimiocinas que participam da patogênese da dermatite atópica canina (DAC), tanto na fase aguda como na fase crônica da doença	30
Quadro 2	Exemplos de lesões específicas encontradas em algumas raças caninas com dermatite atópica	33
Quadro 3	Diagnósticos diferenciais do prurido em cães	35
Quadro 4	Critérios estabelecidos por Favrot et al. (2010), para auxiliar no diagnóstico de dermatite atópica canina	36
Quadro 5	Primeira etapa de diagnósticos de imunotoxicidade em ratos	47
Quadro 6	Segunda etapa de diagnósticos de imunotoxicidade em ratos	50
Quadro 7	Compilação de valores médios percentuais de CD4+, CD8+, razão CD4+/CD8+, CD14, CD21 obtidos após citometria de fluxo em cães saudáveis	52
Quadro 8	Compilação de valores médios percentuais de CD4+, CD8+, razão CD4+/CD8+, CD21 obtidos após citometria de fluxo em cães com dermatite atópica canina	54

CAPITULO 3

Quadro 1	Categorização da intensidade da dermatite atópica, baseada nas escalas lesionais CADESI-IV, CADLI e de prurido VAS10	73
Quadro 2	Perfil dos animais selecionados para o experimento: raça, idade, sexo, peso e categorização da intensidade da dermatite atópica.	76
Quadro 3	Monitorização da eficácia do maleato de oclacitinib em cães com dermatite atópica canina por 12 meses	78
Quadro 4	Ocorrências anormais isoladas durante o experimento	80

LISTA DE GRÁFICOS

CAPITULO 3

Gráfico 1	Avaliação da eficácia do maleato de oclacitinib na dermatite atópica canina durante 12 meses de tratamento	78
Gráfico 2	Valores do leucograma de cães com dermatite atópica, após tratamento com maleato de oclacitinib por 12 meses	82
Gráfico 3	Valores médios de plaquetas de cães com dermatite atópica, após tratamento com maleato de oclacitinib por 12 meses	83
Gráfico 4	Valores médios de parâmetros da bioquímica sérica de cães com dermatite atópica, após tratamento com maleato de oclacitinib por 12 meses	85
Gráfico 5	Monitorização da fosfatase alcalina (FA) em dois cães com dermatite atópica em tratamento com maleato de oclacitinib por 360 dias	86
Gráfico 6	Representação gráfica da imunofenotipagem <i>ex vivo</i> de cães com dermatite atópica canina, tratados durante 12 meses com maleato de oclacitinib	88
Gráfico 7	Valores de séricos de CD14 em cães com dermatite atópica, após tratamento com maleato de oclacitinib por 12 meses.	89
Gráfico 8	Valores médios, com respectivos desvios padrão, da mensuração de produção de IL-4 e IFN- γ por linfócitos CD4+ e CD8+ em cultura sem estímulo antigênico, por citometria de fluxo, em cães com dermatite atópica canina, e tratados com maleato de oclacitinib por 12 meses	92
Gráfico 9	Valores médios, com respectivos desvios padrão, da mensuração de produção de IL-4 e IFN- γ por linfócitos CD4+ e CD8+ em cultura com estímulo antigênico com o ácaro <i>Dermatophagoides farinae</i> , por citometria de fluxo, em cães com dermatite atópica canina, e tratados com maleato de oclacitinib por 12 meses.	92

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1** Escala Visual Análoga (VAS)
- Anexo 2** Certificado da comissão de ética no uso de animais (CEUA/UFMG)
- Anexo 3** Termo de consentimento livre e esclarecido utilizado no hospital veterinário da universidade federal de minas gerais
- Anexo 4** Tabela CADESI-IV
- Anexo 5** *Check List* Ficha Individual

LISTA DE ABREVIACOES

1°Q= 1° quartil

2°Q= 2° quartil

3°Q= 3° quartil

β - Coeficiente de regressão

Exp(β)- Exponencial do coeficiente

ALT- alanina aminotrasferase

AST- aspartato aminotransferase

CADESI-IV- *Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index, version 4*

CTL- Cytotoxic T Lymphocyte

ConA- *concavalin A*

DAC- dermatite atópica canina

DNA- *deoxyribonucleic acid*

DTH- *delay-type hipersensitivity*

EDTA- ethylene diamine tetra acetic acid

ELISA- *Enzyme Linked Immune Sorbent Assay*

E.P- erro padrão

EPO- *erythropoietin*

FA- fosfatase alcalina

G-CSF- *granulocyte colony-stimulating fator*

GH- *growth hormone*

GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating fator*

GGT- gama glutamil transpeptidase

NK- *Natural Killer*

MCP-4- *monocyte chemoattractant protein-4*

MDC- *macrophage-derived chemokine*

MHC- Mleculas do complexo de histocompatibilidade

MLR- *mixed lymphocyte reaction*

LB- Linfócitos B

I.C- Intervalo de confiança

IgE- Imunoglobulina E
IFN- γ - Interferon gama
IL-1- Interleucina 1
IL-4- Interleucina 4
IL-5- Interleucina 5
IL-6- Interleucina 6
IL-8- Interleucina 8
IL-12- Interleucina 12
IL-13- Interleucina 13
IL-25- Interleucina 25
IL-31- Interleucina 31
ITAE- Immunoterapia alérgeno específica
JAK- Janus quinase
PFC- *Plaque Forming Cell*
PHA- *phyto-hemagglutinin*
RANTES- *regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*
STAT-*Signal transducers and activators of transcription*
TARC- *Thymus and activation-regulated chemokine*
TEWL- *Transepidermal water loss*
TGF- β - *Transforming growth factor beta*
TYK2-Tirosina kinase
Th1- *T-helper 1*
Th2- *T-helper 2*
Th17- *T-helper 17*
TNF α - *tumor necrosis factor*
Treg- *linfócitos t reguladores*
 γ c- *γ chain*
VAS- "*visual analog scale*"

RESUMO

A dermatite atópica canina é uma doença inflamatória crônica, pruriginosa, genética e incurável. Existem diversas terapias disponíveis para reduzir a inflamação e conseqüentemente fornecer qualidade de vida aos cães. Porém estas devem ser administradas, na maioria das vezes, de forma contínua. Para tanto, a busca por terapias eficazes e com efeitos colaterais reduzidos a longo prazo se tornam fundamentais. Esse trabalho consistiu de duas etapas utilizando-se 13 cães com dermatite atópica. Na primeira, objetivou-se ampliar os estudos relacionados a imunopatogênese da dermatite atópica canina por meio da imunofenotipagem de leucócitos. Observou-se que cães atópicos apresentam valores significativamente maiores de linfócitos T (LT) CD4+ ($p=0.002$) e menores de LT CD8+ ($p=0.002$) e monócitos CD14 ($p=0.009$), resultando em valores significativamente superiores da razão CD4+/CD8+ ($p=0.000$). Além disso, após a dosagem de citocinas intracitoplasmáticas em cultura (IL-4 e IFN- γ) nos LT CD4+ e CD8+, foi observado aumento significativo nos cães com dermatite atópica. Após adição de *Dermatophagoides farinae* em cultura, observou-se aumento dos valores de IFN- γ produzidos pelos CD4+. Esses dados indicam que a imunopatogênese da dermatite atópica envolve resposta linfocitária do tipo 1 e tipo 2. No segundo experimento objetivou-se avaliar a eficácia e efeitos tóxicos da utilização prolongada do maleato de oclacitinib no controle da dermatite atópica canina. O maleato de oclacitinib foi capaz de reduzir significativamente o prurido ($p=0.05$), logo nos primeiros 14 dias de utilização (61% de redução), bem com as lesões de pele ($p=0.000$), indicando eficácia rápida e prolongada do fármaco. Os valores médios de hemograma e do perfil bioquímico sérico apresentaram-se dentro dos padrões de referência para o cão. A análise celular sérica por citometria de fluxo indicou um aumento significativo de LT CD4+ ($p=0.002$) e CD14 ($p=0.001$) e um comportamento razoavelmente constante da relação CD4+/CD8+ durante o curso de tratamento. Esses resultados indicam que o maleato de oclacitinib, na dose recomendada de bula, não ocasiona imunossupressão a longo prazo. Não foi observado efeito significativo do maleato de oclacitinib nos valores de citocinas IL-4 e IFN- γ produzidas pelos LT CD4+ e LT CD8+, dosadas após cultura celular. Esse estudo corrobora que a principal ação do fármaco é na inibição da sinalização das citocinas e não em sua produção.

Palavras-Chave: tratamento farmacológico, dermatologia, doenças do cão, toxicidade crônica, Janus quinases

ABSTRACT

Canine atopic dermatitis is a chronic, pruritic, genetic and inflammatory disease. There are several therapies used to reduce inflammation and provide quality of life for dogs. However, these are life-long therapies. Therefore is essential to looking for effective effective therapies with reduced long-term side effects. This study consisted of two experiments using 13 dogs with atopic dermatitis. In the first, the objective was to characterize the ex vivo and in vitro immunophenotyping of these dogs by flow cytometry, comparing them with seven healthy dogs. It was observed that atopic dogs had significantly higher values of CD4 + ($p = 0.002$) and lower values of CD8 + ($p = 0.002$) and CD14 ($p = 0.009$), resulting in significantly higher values of CD4+ / CD8+ ratio ($p = 0.000$). In addition, after dosing intracytoplasmic cytokines (IL-4 and IFN- γ) on CD4 + and CD8 + lymphocytes in a four-hour culture, significantly higher values were observed in dogs with canine atopic dermatitis. The influence of the antigen *Dermatophagoides farinae* added to culture was observed only on the increase of the IFN- γ produced by CD4+. These data indicate that the immunopathogenesis of atopic dermatitis involves a Th1/Th2 response. In the second experiment, we aim to evaluate the efficacy and toxic effects of prolonged use of oclacitinib maleate in the control of canine atopic dermatitis. Oclacitinib maleate was able to significantly reduce pruritus ($p = 0.05$), as early as the first 14 days (61% reduction and skin lesions ($p = 0.000$), indicating rapid and prolonged efficacy. The mean values of blood profile remained within the reference standards to dog. Flow cytometric cell analysis indicated a significant increase of CD4 + ($p = 0.002$) and CD14 ($p = 0.001$) and a reasonably constant behavior of the CD4+ / CD8+ ratio during the course of treatment. These unpublished results are an indication that oclacitinib maleate at recommended dose does not cause long-term immunosuppression and therefore can be used safely in the long-term control of canine atopic dermatitis. There was no significant effect of oclacitinib maleate on the cytokines IL-4 and IFN- γ produced by CD4 + and CD8 +, measured after cell culture. This unpublished study corroborates that the main action of the drug is in inhibition of cytokine signaling and not in its production.

Key-words: drug therapy, dermatology, dogs disease, chronic toxicity, Janus quinases

INTRODUÇÃO

A dermatite atópica canina (DAC) é uma dermatopatia crônica e frequente nos cães. É definida como uma doença cutânea inflamatória e pruriginosa com predisposição genética cujas características clínicas estão geralmente associadas à produção de imunoglobulina E (IgE), principalmente contra alérgenos ambientais (HALLIWELL, 2006; OLIVRY et al., 2010a). O principal sinal clínico observado é o prurido, muitas vezes intenso e que geralmente tem efeito significativo na qualidade de vida dos animais e de seus tutores. No entanto, a patofisiologia do prurido em cães com dermatite atópica (DA) é complexa e não está completamente elucidada. Por muito tempo, os sinais clínicos da DA foram associados à resposta imune direcionada para perfil linfocitário T-*helper* 2 (Th2), ou do tipo 2, com produção de interleucinas 4, 5 e 13 (IL-4, IL-5 e IL-13) e ativação de linfócitos B. Atualmente tem-se verificado, especialmente na medicina um perfil de resposta mista, onde além da resposta Th2, bem descrita nas alergopatias, há também uma resposta T-*helper* 1 (Th1) ou do tipo 1, com produção expressiva de interferon gama (IFN- γ), principalmente após estímulo inflamatório crônico causando dano na pele devido à indução de apoptose de queratinócitos (THEPEN et al., 1996; PUCHEU-HASTON et al., 2015a; MAJEWSKA et al., 2016). As lesões crônicas, clinicamente associadas à liquenificação e hiperpigmentação tegumentar, são resultados da ativação mista entre os fenótipos Th1 e Th2 (JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014; PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

Os linfócitos regulam e estimulam o sistema imune e estão ativamente envolvidos na fase efetora da resposta imune. Dados recentes consideram que os subtipos de linfócitos T (LT) CD4+ e LT CD8+ contribuem para a imunopatogênese da DA, com produção de interleucinas e quimiocinas produzidas nesse ambiente inflamatório, como IFN- γ e IL-4 (SCHLOTTER et al., 2011; JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014; MCCANDLESS et al., 2014). Estudos recentes demonstraram que citocinas pruritogênicas, como interleucina 31 (IL-31), são um dos principais fatores desencadeadores do prurido em cães (GONZALES et al., 2013; GONZALES et al., 2016). Entretanto, ainda não há estudos que demonstraram a expressão de citocinas IL-4 e IFN- γ pelas células CD4+ e CD8+ no sangue de animais atópicos.

O diagnóstico da DA é clínico e baseado na observação de um conjunto de elementos, que incluem uma história típica e sinais clínicos característicos, associado ao diferencial com outras dermatopatias pruriginosas que a poderiam mimetizar. Um conjunto de critérios estabelecidos por Favrot et al. (2010) auxilia na identificação da doença, mas deve ser utilizado com cautela, já que aplicação rigorosa desses parâmetros, sem a exclusão apropriada de outras dermatopatias pruriginosas, poderia resultar em uma falha diagnóstica de aproximadamente 20% dos casos.

Atualmente recomenda-se uma abordagem multifacetada para o controle da DAC, já que é uma doença multifatorial que envolve interações complexas de respostas imunológicas, disfunção da barreira cutânea e interações neuroimunes que, associados, produzem um estímulo inflamatório e pruritogênico contínuo e uma tendência ao desenvolvimento de hipersensibilidade a alérgenos ambientais, alimentares e antígenos microbianos (SINKE, et al., 2002; OLIVRY et al., 2010a; GONZALES et al., 2013).

A gravidade do prurido e das lesões cutâneas pode ser reduzida por meio da utilização de fármacos sistêmicos antiinflamatórios e imunomoduladores, como corticoesteroides e os inibidores de calcineurina, bem como da utilização de imunoterapia alérgeno específica (ITAE) (OLIVRY et al., 2010a; SHAW, 2013; SARIDOMICHELAKIS; OLIVRY, 2016a). Apesar de serem

extremamente efetivos, a utilização regular de glicocorticoides está associada a efeitos colaterais que podem interferir com a qualidade de vida do paciente. O uso crônico dos glicocorticoides pode levar à pancreatite, à ulceração gastrointestinal, ao diabetes mellitus e ao hiperadrenocorticismio iatrogênico. O uso sistêmico de ciclosporina e tópico de tacrolimus, fármacos que inibem a calcineurina, têm boa eficácia no controle da dermatite atópica, porém demoram a controlar o prurido e, portanto, não são indicados para o controle das crises agudas. A ITAE é o único tratamento específico da dermatite atópica canina e que pode alterar o curso natural da doença, no entanto, sua eficácia está em torno de 64%, e mormente é observada após um ano de uso contínuo (SCHNABL et al., 2006; SHAW, 2013).

Alternativas terapêuticas têm sido estudadas e aplicadas a fim de reduzir o prurido e a inflamação de forma eficiente com mínimos efeitos colaterais. Um dos focos dos estudos atuais são os inibidores seletivos de *Janus quinase* (JAK), utilizados atualmente para o tratamento de variedade de doenças inflamatórias, autoimunes e morbidades hematológicas em humanos. Essas enzimas têm papel fundamental na atividade de diversas citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e IL-6), pró-alérgicas (IL-4, IL-13) e pruritogênicas (IL-31), bem como na hematopoiese (eritropoietina) e na resposta imune inata (IL-12 e IL-23) (YAMAOKA et al., 2004; GONZALES et al., 2014). Foi observado em estudos *in vitro* que o maleato de oclacitinib em doses terapêuticas inibe preferencialmente JAK-1, implicado na ativação de citocinas pró-inflamatórias, pró-alérgicas e pruritogênicas e atividade reduzida em relação a citocinas envolvidas na hematopoiese (GONZALES et al., 2014).

Nos cães, o maleato de oclacitinib já foi aprovado para uso terapêutico em diversos países da Europa, Estados Unidos, Canadá e no Brasil para o controle da dermatite atópica em cães acima de 12 meses de idade. A sua eficácia em reduzir o prurido de forma rápida já foi demonstrada por estudos (COSGROVE et al., 2013b, GADEYNE et al., 2014; COSGROVE et al., 2015). Porém há muito que se elucidar sobre os efeitos da inibição à longo prazo dessas vias de sinalização, já que os estudos atuais nos fornecem somente dados de perfil hematológico e bioquímico sérico (COSGROVE et al., 2015). Os inibidores de JAK alteram a resposta imune e conseqüentemente podem aumentar o risco de infecções e de neoplasias (KUBLER, 2014). Estudos demonstram a importância da avaliação de subpopulações linfocitárias em cães submetidos ao uso de imunomoduladores ou imunossupressores de forma regular (TARRANT, 2005; ODA et al., 2016). Nenhum estudo investigou alterações de subpopulação linfocitária durante o uso de maleato de oclacitinib e nem o comportamento dessas células em relação à produção de IL-4 e IFN- γ .

Diante deste contexto, é imperativa a caracterização imunofenotípica *ex vivo* e *in vitro* de leucócitos de cães com dermatite atópica e avaliação da eficácia e efeitos tóxicos da utilização prolongada do maleato de oclacitinib no seu controle.

OBJETIVOS GERAIS

1. Avaliar a eficácia e possíveis efeitos colaterais e imunomoduladores do maleato de oclacitinib durante 12 meses em animais com DAC. Analisar comparativamente a imunofenotipagem leucocitária *ex vivo* e *in vitro* de animais saudáveis com cães com DA.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2. Analisar comparativamente a imunofenotipagem leucocitária *ex vivo* e *in vitro* de animais saudáveis com animais com DAC.
3. Avaliar a eficácia do maleato de oclacitinib no controle sintomato-lesional e do prurido durante um ano em cães com DAC
4. Investigar os efeitos tóxicos do maleato de oclacitinib em uso contínuo durante 12 meses, por meio de exame físico e perfil sanguíneo.
5. Estudar a influência e imunomodulação do maleato de oclacitinib sobre as subpopulações de linfócitos
6. Determinar a influência do maleato de oclacitinib na produção intracelular de IL-4 e IFN- γ em leucócitos, estimulados ou não, *in vitro*, com antígeno de *Dermatophagoides farinae*, durante um ano de terapia.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1. CONCEITO DA DERMATITE ATÓPICA CANINA (DAC)

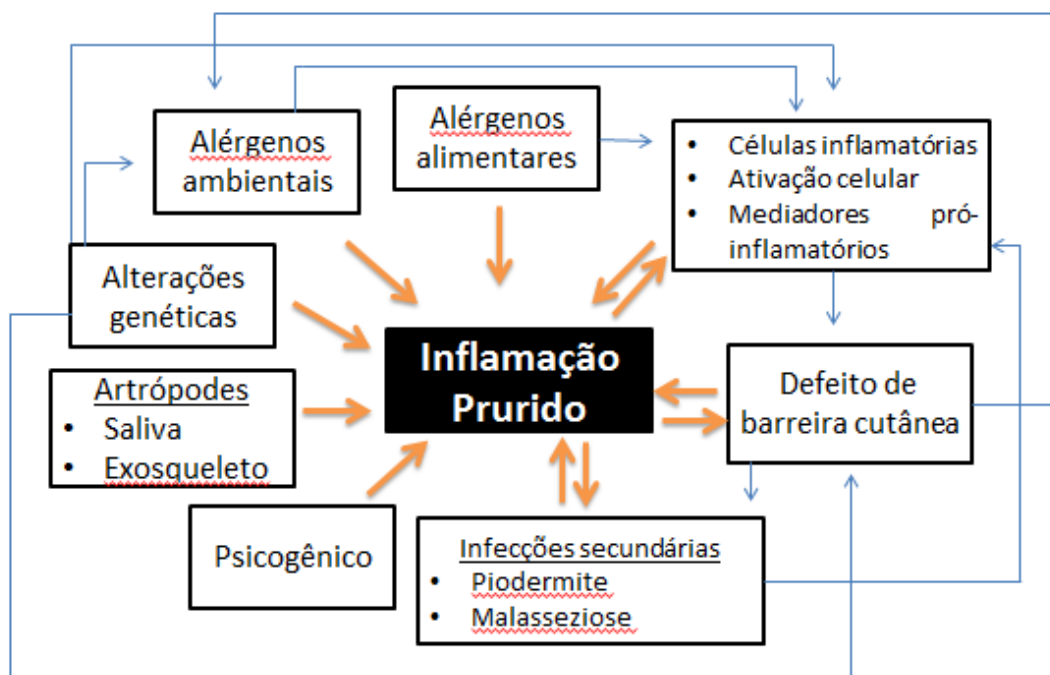
A dermatite atópica canina (DAC) é uma doença crônica e frequente, que atinge cerca de 10% da população mundial de cães (HILLIER; GRIFFIN, 2001; MILLER et al., 2013). É uma dermatopatia inflamatória e pruriginosa com predisposição genética cujo os sinais clínicos estão geralmente associadas à produção de anticorpos IgE, principalmente contra alérgenos ambientais (HALLIWELL, 2006). Apesar da definição de Halliwell ser ainda a mais aceita, entende-se que a produção de IgE não é pré-requisito para o desenvolvimento de sinais clínicos em todos os casos, que são assim definidos, como dermatite atopia *similar* (*atopic like dermatitis*) (OLIVRY et al., 2010a).

2- PATOGÊNESE

A DAC é uma doença multifatorial complexa, que envolve disfunções do sistema imune, principalmente hiper-reatividade imunológica, sensibilização alérgica, defeitos da barreira cutânea, colonização microbiana e influência de fatores ambientais (Figura 1) (NUTTALL et al., 2013).

Acredita-se que 50% do risco de desenvolvimento da DAC é determinado pelo genótipo do animal, no qual diversos genes aparentam estar envolvidos. Associado a isso, a exposição a determinados fatores ambientais influenciam na prevalência e curso da doença (BIZIKOVA et al., 2015a).

Figura 1- Fatores patogênicos responsáveis pela inflamação cutânea e prurido em cães com dermatite atópica e suas interrelações



Fonte: adaptado de Saridomichelakis e Olivry (2016)

Algumas raças caninas são acometidas com mais frequência, corroborando a característica de envolvimento genético. Em um estudo americano de Wilhem et al., (2011) verificou-se que as raças mais predispostas à doença são: West Highland White Terrier, Labrador, Pastor alemão, Golden retriever, Boxer, Dálmata, Buldogue Francês e Shar pei Chinês. Acredita-se que a prevalência em outras regiões mundiais seja similar, apesar de ocorrer variações regionais de acordo com a exposição alérgica e raças mais comuns (BIZIKOVA et al., 2015a).

Assim como na dermatite atópica em humanos, múltiplos genes e complexas interações com fatores ambientais afetam a resposta imunológica bem como a função da barreira cutânea (WOOD et al., 2009; MARSELLA et al., 2012). As principais células que participam da patogênese da DAC e afetam a resposta imunológica são: a) células de Langerhans, responsáveis pelo processamento e apresentação antigênica; b) linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos que reagem com os antígenos invasores; c) linfócitos T-helper, responsáveis pela produção de citocinas, que levam a ativação de linfócitos B e outras células inflamatórias e d) mastócitos, que produzem mediadores inflamatórios e exacerbam a inflamação (MARSELLA et al., 2012).

2.1 Alterações na barreira cutânea

A barreira cutânea representa uma barreira física e uma interface entre a pele e o meio ambiente com o intuito de evitar o seu ressecamento, bem como a penetração excessiva de substâncias exógenas como alérgenos e irritantes primários. A função dessa barreira é mantida pelo estrato córneo, composto principalmente por corneócitos e lipídeos intercelulares (ceramidas, ácidos graxos e colesterol) (OLIVRY, 2011). A sua integridade pode ser aferida de forma objetiva e não invasiva pela mensuração de perda transepitelial de água (TEWL, *Transepidermal water loss*). Cães com DAC apresentam TEWL duas vezes maior na pele não lesionada e oito vezes maior em regiões de pele lesionadas quando comparados a animais saudáveis (SHIMADA et al., 2009). Em um estudo conduzido por Hightower et al. (2010), em uma colônia de Beagles com DA, observou-se que a TEWL foi significativamente maior nos cães com DA quando comparados a cães saudáveis, principalmente nas regiões corporais comumente afetadas durante o curso da doença.

Estudos preliminares para a avaliação ultraestrutural da barreira cutânea por microscopia eletrônica evidenciaram diferenças entre a camada córnea de cães com DA e saudáveis. Inman et al. (2001) relataram distribuição heterogênea das lamelas de lipídeos entre os corneócitos e uma estrutura morfológica anormal e incompleta. Alterações similares foram observadas por Piekutowska et al. (2008) e Marsella (2011) em pele não lesionada de animais com DA, na qual discreta quantidade de lipídeos intercelulares estavam presentes de maneira desorganizada. As alterações ultraestruturais observadas refletem as alterações na composição do estrato córneo em relação aos lipídeos e proteínas que o compõem (OLIVRY, 2011). Foram identificados decréscimo de ceramidas 1 e 9, principal grupo de lipídeos do estrato córneo, em pele não lesionada de cães com DA comparados a cães saudáveis associado ao aumento de colesterol, possivelmente devido ao aumento da esteroidogênese a fim de restaurar a barreira cutânea deficitária (REITER et al., 2009). Shimada et al. (2009) observaram que os cães atópicos com menor quantidade de ceramidas, apresentavam maior TEWL, indicando a possível contribuição desses lipídeos em evitar a perda de água transepidermica.

Em relação à composição protéica da barreira cutânea, molécula mais estudada na medicina, e que vem ganhando importância na medicina veterinária é a filagrina. Essa é uma importante proteína epidermal e tem a função de reunir os filamentos de queratina, proporcionando a compactação dos queratinócitos e formação dos corneócitos. Além disso, seus monômeros têm efeito coloidosmótico na pele e ajudam a manter a hidratação do estrato córneo. Sendo assim, uma deficiência de filagrina resulta em um queratinócito anormal e favorece a perda de água transepidermica e xerose tegumentar (PALMER et al., 2006). Alterações nos genes que codificam a filagrina estão fortemente associadas com a dermatite atópica em humanos, principalmente no que concerne a integridade da barreira cutânea e aumentam o risco de sensibilização alérgica (PALMER et al., 2006).

Nos cães essa afirmação ainda carece de estudos. Expressão anormal da filagrina em cães com DA foi observada pela técnica de imunohistoquímica utilizando anticorpo contra filagrina humana. Verificou-se menor imunorreatividade e poucos grânulos finos nos Beagles com DA comparado aos animais normais (MARSELLA et al., 2009). Outro estudo conduzido em uma colônia de Beagles com DA, verificou expressão anormal de RNAm de filagrina na pele, associadas à distribuição heterogênea dessa proteína pela técnica de imunofluorescência (SANTORO et al., 2013). No entanto, não verificou-se mutações no gene da filagrina na raça West Highland White Terrier (BARROS ROQUE et al., 2009), o que leva a questionamentos

sobre a origem genética dessa alteração nos cães. Os estudos sobre barreira cutânea em cães são recentes e ainda não se sabe qual a real consequência dos defeitos dessa barreira cutânea nos sinais clínicos apresentados, ou ainda se o defeito dessa barreira é secundário ao processo inflamatório crônico (MARSELLA et al., 2011)

2.2- Imunopatogenia

Diversas alterações imunológicas já foram descritas em cães com DAC, porém ainda discute-se qual dessas alterações são primárias, e qual dessas estão associadas à outras alterações comuns da DAC como a inflamação por si (MILLER et al., 2013). Evidências recentes sugerem a participação de antígenos alergênicos e outras moléculas não alergênicas na inflamação, desenvolvimento e perpetuação da DAC (PUCHEU-HASTON et al., 2015b). O desenvolvimento de hipersensibilidade aos alérgenos ambientais incluem fase de sensibilização antigênica, estimulação neuronal e inflamação, que se estabelece em um ciclo à medida que a doença se perpetua. Em cada uma dessas fases há atuação de diferentes células e citocinas, responsáveis pelos sinais clínicos observados e pela perpetuação da doença.

2.2.1- Papel da imunidade inata

A imunidade inata é uma resposta imune não específica que o animal tem desde o seu nascimento. É composta por diversos elementos que tem em comum reconhecimento restrito de antígenos e ausência de memória (KENNEDY, 2010). Os elementos da imunidade inata, incluindo células dendríticas, células de Langerhans, mastócitos e os próprios queratinócitos, interagem entre si e com antígenos ambientais, durante o desenvolvimento da DAC. A atuação dessas células, associado a fatores do sistema complemento e receptores de proteases ativados frente à estímulos ambientais influenciam todo o curso da resposta imune (PUCHEU-HASTON et al., 2015b). O contexto em que a apresentação antigênica acontece influencia na resposta futura dos linfócitos, e define se eles se tornarão anérgicos ou ativados.

A resposta das células dendríticas durante a fase de sensibilização é influenciada por diversos fatores, incluindo a presença de antígenos microbianos e citocinas inflamatórias produzidas por queratinócitos e outras células imunes. Isso influencia a natureza subsequente da resposta linfocitária durante a fase efetora alérgeno-específica (PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

As células de Langerhans são consideradas as principais células apresentadoras de antígeno da epiderme, e sua presença nas doenças de pele sugerem que elas são expostas aos alérgenos que penetraram a barreira cutânea (MARSELLA et al., 2012). Observou-se que as células de Langerhans estão significativamente em maior número nos animais com DA e expressam moléculas de histocompatibilidade de classe II (MHC II), participando, portanto, da apresentação e processamento dos antígenos para os linfócitos T. Além disso, essas células apresentam IgE de superfície, sugerindo um mecanismo de captura e ativação celular antígeno específico (OLIVRY et al., 1996).

Já o número de mastócitos varia consideravelmente, sendo mais numerosos nas regiões corpóreas clinicamente afetadas durante o curso da DA em cães (AUXILIA; HILL, 2000). Os mastócitos produzem variedades de mediadores pró-inflamatórios pré formados como histamina, heparina,

serotonina, e neoformados como as prostaglandinas, leucotrienos, fator de necrose tumoral e proteases (WELLE et al., 1999). A liberação desses produtos por degranulação ocorre por via de ligação IgE nos receptores mastocitários, mas podem ocorrer também independentemente de via IgE, como por exemplo por agentes proteolíticos. A relação da liberação desses fatores com a perpetuação e exacerbação da inflamação em cães com DA já está bem estabelecido. Verificou-se ainda que a degranulação mastocitária aumenta os níveis de P-selectina, uma molécula protéica importante para adesão leucocitária no endotélio. Níveis elevados dessa proteína foram demonstrados na pele lesionada e íntegra de cães com DAC, principalmente nas células endoteliais (DE MORA et al., 2007). Esses eventos sugerem que os eventos inflamatórios comuns na DAC, aumentam o recrutamento de células inflamatórias via P-selectina (PUCHEU-HASTON et al., 2015b). Porém algumas controvérsias permanecem sobre a exata função dos mastócitos no desenvolvimento DAC, já que o papel da histamina como principal mediador inflamatório na DAC é ainda discutido, e acredita-se que esta tem pouca importância na persistência das lesões cutâneas crônicas e do prurido (OLIVRY et al., 2010a; PUCHEU-HASTON et al., 2015b). Sua principal função é de causar vasodilatação e estimular a resposta inflamatória, na presença de alérgenos ambientais (MARSELLA et al., 2012). Níveis séricos semelhantes de histamina foram encontrados em animais saudáveis e com DAC, apesar dos níveis cutâneos estarem elevados nestes (WILKIE et al., 1990).

Os queratinócitos compõem a barreira cutânea e tem papel fundamental na proteção mecânica contra a penetração excessiva de alérgenos exógenos, toxinas e enzimas microbianas e moléculas irritantes primárias. Essas células são metabolicamente e imunologicamente ativas e responsáveis pela produção de inúmeros mediadores pro-inflamatórios, que auxiliam na perpetuação da DAC, como uma quimiocina que recruta linfócitos a TARC (*Thymus and activation-regulated chemokine*) (MAEDA et al., 2005).

2.2.2- Alterações na imunidade humoral

A imunidade humoral é mediada por anticorpos, produzidos por plasmócitos originados da diferenciação de linfócitos B. A IgE é o principal anticorpo produzido durante as respostas alérgicas e parasitárias. Descrito na década de 1970, observou-se que este anticorpo possui propriedades semelhantes à dos humanos (HALLIWELL., et al 1972). Foi demonstrado que essa imunoglobulina fica localizada na superfície de mastócitos na pele de cães sugerindo o seu envolvimento na patogenia da DAC não somente na fase efetora, mas também na captura antigênica. Esse anticorpo tem a capacidade de ampliar a resposta imune por meio da captura de antígenos e posterior ligação às células de Langerhans, bem como iniciar a inflamação pela interação com o alérgeno na superfície mastocitária e dos basófilos (HALLIWELL e DEBOER, 2001).

O papel da IgE na patogenia da DAC já é bem documentado, no entanto, IgE alérgeno-específicas podem ser encontradas mesmo em animais saudáveis. Além disso, animais com DA podem não ter IgE alérgeno-específicas circulantes ou na pele, portanto a sua mensuração não auxilia na discriminação entre cães com DA e cães saudáveis (HILL et al. 1995; HILL e DEBOER, 2001; MILLER et al., 2013). Apesar de o envolvimento de IgE na patogênese da maior parte dos casos de dermatite atópica ele não explica por si só o desenvolvimento da doença, já que ela é dependente de uma variedade de outros fatores que incluem polarização de populações de linfócitos T, função mastocitária e defeito de barreira cutânea (MARSELLA et al., 2012). Geralmente níveis de IgG acompanham uma resposta de IgE em cães com dermatite atópica,

porém há pouca evidência de sua participação na patogênese da DAC (HALLIWELL; DEBOER, 2001).

2.2.3- Alterações de linfócitos, citocinas e quimiocinas

Os linfócitos reconhecem epítopos, em associação com moléculas de histocompatibilidade do tipo II (MHCII) associadas às células apresentadoras de antígenos. Para que ocorra a resposta imunológica, esses linfócitos são ativados, principalmente em dois subtipos com funções distintas. Os linfócitos T citotóxicos, que possuem marcador CD8+ em sua membrana respondem à antígenos intracelulares. Os linfócitos T *helper* expressam a molécula CD4+ em sua membrana e atuam por produção de citocinas quimiotáticas e pró-inflamatórias que modulam a resposta imune. O padrão de citocinas produzidas determina o mecanismo efetor da resposta imune. Citocinas produzidas pelo fenótipo Th1 estimula a imunidade celular, as produzidas pelo Th2 estimula imunidade humoral e as produzidas pelo Th17, produz IL-17, capaz de intensificar a resposta imune à bactérias extracelulares e a resposta celular mediada (KAROL, 1998; KENNEDY, 2010).

As reações de hipersensibilidades, como as que ocorrem na DAC, são resultados da interferência em um delicado equilíbrio entre essas variedades de tipos de resposta de linfócitos T, e mediadores inflamatórios, incluindo citocinas e quimiocinas produzidas durante a resposta linfocitária Th-2 (habitualmente descrito), mas também Th-1 e Th-17 (DI CESARE; DI MEGLIO; NESTLE, 2008; PUCHEU-HASTON et al., 2015a) (Figura 2). As lesões agudas, caracterizadas por pápulas, escoriação e prurido intenso, são resultados da ativação linfocitária Th-2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) e ocasionam, sobretudo na produção de imunoglobulinas IgE, além de favorecer a produção, recrutamento e sobrevivência de células inflamatórias tipicamente associadas às hipersensibilidades, como os eosinófilos (OLIVRY et al., 2010b; MILLER et al., 2013). Sabe-se que a IL-4 é a principal citocina reguladora da produção de IgE, já que na presença desta, um linfócito B pode produzir até 10.000 anticorpos IgE por segundo (MARSELLA et al., 2012). Uma importante citocina Th2 recentemente identificada nos cães, é interleucina 31 (IL-31), encontrada na maioria dos cães com dermatite atópica, o que demonstra a sua importância na imunopatogenia da doença (GONZALES et al., 2013).

Verificou-se ainda indução do prurido 20-40 minutos após sua inoculação endovenosa em animais atópicos (GONZALES et al., 2013; GONZALES et al., 2016). IL-31 participa tanto da fase aguda como da fase crônica se ligando diretamente a receptores de nervos sensoriais ocasionando na ativação, sensibilização e estimulação de células nervosas. O seu envolvimento na progressão da DAC ocorre pela coordenação da interação entre o sistema imune cutâneo e o sistema nervoso (MCCANDLESS et al., 2014). Observou-se correlação positiva entre intensidade dos sinais clínicos da dermatite atópica com dosagem sérica de IL-31 em colônia de Beagles atópicos, previamente sensibilizados com *Dermatophagoides farinae*, após indução de crise aguda com exposição epicutânea com esse alérgeno (MARSELLA et al., 2017).

As lesões crônicas, clinicamente definidas por liquenificação e hiperpigmentação, são resultados da ativação do fenótipo Th-1 (IL-2, IL-12, Interferon- γ) e caracterizadas por uma predominância de macrófagos intradérmicos (HAMID et al., 1994; THEPEN et al., 1996). O fenótipo linfocitário Th-17 é caracterizado pela produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-17, IL-22 e IL-26. Essa resposta linfocitária ocorre em uma série de doenças autoimunes em humanos, como

esclerose múltipla e artrite reumatoide, e acredita-se atualmente que tenha papel na patogênese da dermatite atópica em humanos (DI CESARE et al., 2008). Níveis aumentados de IL-17 foram reportados em lesões cutâneas de pacientes atópicos, principalmente durante a fase aguda da doença (TODA et al., 2003).

Fonte: adaptado de Di Cesare et al. (2008)

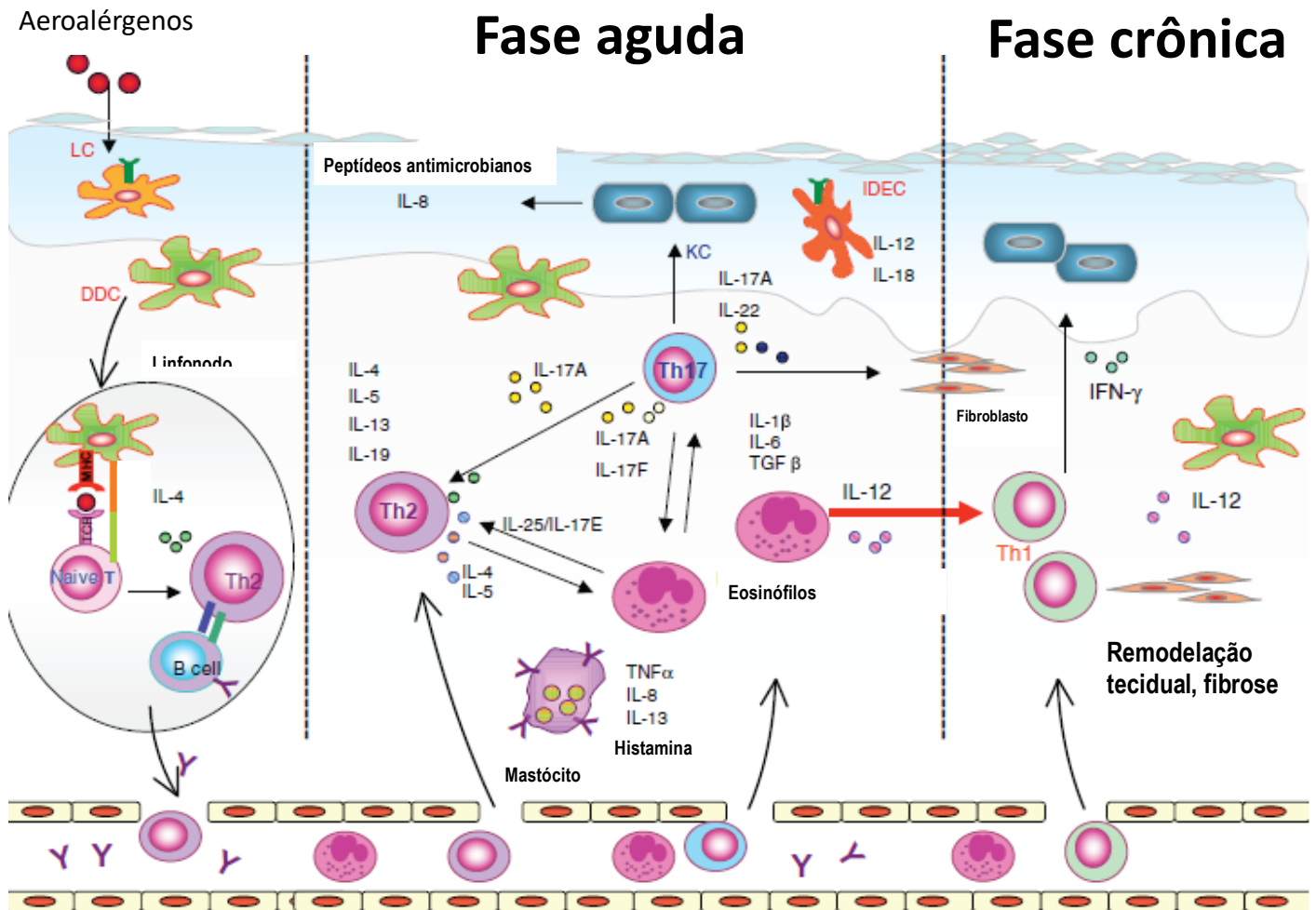


Figura 2- Resumo do envolvimento dos linfócitos T na dermatite atópica. Após o primeiro contato com o antígeno (aeroalérgeno) durante a fase de sensibilização, as células apresentadoras de antígeno migram para o linfonodo regional, onde apresentam antígenos para células T imaturas. Na presença de IL-4, os linfócitos se diferenciam para o perfil fenotípico Th2 e induzem ativação de linfócitos B em plasmócitos para a produção de IgE. Anticorpos IgE circulantes se ligam à receptores altamente específicos na superfície mastocitária. A reexposição ao antígeno, ocasiona em reativação celular, degranulação mastocitária e liberação de moléculas inflamatórias como histamina, IL-8 e IL-13. Esse ambiente favorece a migração de linfócitos Th2 e eosinófilos para a pele, resultando na produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-4, IL-5 e IL-13) e estimula a produção da citocina IL-25 pelos eosinófilos, exacerbando a resposta. Durante a fase aguda, os eosinófilos que produzem IL-6, IL-1 e TGF-β estimulam a diferenciação fenotípica Th17.

Linfócitos Th17 são recrutados para a pele, onde interagem com linfócitos Th2, queratinócitos e fibroblastos. As citocinas IL-12, secretadas pelos eosinófilos, e as células dendríticas impulsionam a mudança para a fase crônica da dermatite atópica, em que se predomina o perfil fenotípico Th1.

As quimiocinas são citocinas importantes para regular a migração seletiva de leucócitos e participam ativamente da patogenia da atopia. Aumentos da expressão de RANTES (*regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted*), da proteína quimioatrativa para monócito-4 (MCP-4, *monocyte chemoattractant protein-4*), da quimiocina derivada de macrófagos (MDC, *macrophage-derived chemokine*) e TARC foram detectados em lesões cutâneas e em soro de pacientes humanos com DAC (KABURAGI et al., 2001) (Quadro 1).

Quadro 1- Principais citocinas e quimiocinas que participam da patogênese da dermatite atópica canina (DAC), tanto na fase aguda como na fase crônica da doença.

<u>Citocinas e quimiocinas associadas à lesões agudas</u>	<u>Citocinas e quimiocinas associadas à lesões crônicas</u>
IL-4	IL-1
IL-5	IL-2
IL-13	IL-12
IL-31	IL-31
MCP-1	IFN- γ
RANTES	TNF α
TARC	CCL28

Fonte: adaptado de Nuttal et al., 2013

2.2.4- Papel da infecção bacteriana

A pele dos animais atópicos é mais propensa à colonização por *Staphylococcus* spp, principalmente *Staphylococcus pseudointermedius* (DEVRIESE et al., 2005). Isso ocorre devido a diversos fatores, incluindo o decréscimo de peptídeos antimicrobianos e o aumento da aderência desses microorganismos devido à expressão exarcebada de citocinas da fase aguda da doença (MILLER et al., 2013). A colonização microbiana pode resultar em aumento da produção de IL-4 e IL-13 pelos linfócitos cutâneos e danificar a pele dos animais atópicos pela produção de ceramidases e proteases. O aumento de IL-4 induz a produção de fibronectina, que contribui para a aderência dos *Staphylococcus* spp aos queratinócitos (SIMOU et al., 2005).

2.2.5- Hipótese e sequência da imunopatogenia na dermatite atópica canina

O processo de sensibilização alérgica e ativação desordenada do sistema imune na DAC inicia-se com a exposição percutânea e absorção dos alérgenos pela epiderme (MARSELLA et al., 2012). As células de Langerhans capturam e internalizam os alérgenos que são processados e apresentados para os linfócitos T-*helper* imaturos nos linfonodos. Inicia-se uma ativação e polarização para o fenótipo Th2 e subsequente produção principalmente de IL-4 e IL-13. As interleucinas produzidas estimulam linfócitos B a produzir imunoglobulinas IgE alérgenos específicas que caem na circulação sanguínea e se ligam às células que expressam na sua superfície receptores de alta e baixa afinidade. Após uma reexposição alérgica, a polarização do fenótipo Th2 continua e outras citocinas como IL-31 são produzidas e ativam diretamente nervos sensoriais, com consequente prurido. Além disso, os alérgenos se ligam aos receptores previamente ligados à IgE em diversas células como os mastócitos, estimulando a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórias como histamina, serotonina, e substância P com consequente quimiotaxia para leucócitos. A lesão cutânea induzida pelo prurido, assim como os próprios alérgenos externos, estimulam os queratinócitos e outras células da imunidade inata a produzir citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-12 que polarizam a resposta linfocitária para o fenótipo Th1. Como consequência, outras citocinas são produzidas como o IFN- γ e TNF- α com subsequente recrutamento adicional de leucócitos e infiltração dérmica de células inflamatórias (MARSELLA et al., 2012). Esse ciclo se perpetua a partir do momento que o prurido intensifica o processo inflamatório que, por sua vez, intensifica o prurido.

3. SINAIS CLÍNICOS

A DAC é uma doença multifacetada em que o seu fenótipo é influenciado por diversos fatores como raça, modo de vida, ambiente em que o animal vive (área geográfica, condições de umidade, exposição à luz solar), natureza do alérgeno causador da doença e fatores desencadeantes de crises, como infecções bacteriana e fúngicas (WILHEM et al., 2011). Os primeiros sinais clínicos da DAC geralmente aparecem entre seis meses e três anos de idade, e incluem prurido, geralmente intenso, principalmente nas regiões perilabial, periocular, parte interna do pavilhão auricular, flexura do cotovelo, carpo, tarso, interdigital, abdômen ventral, períneo e porção ventral da cauda (Figura 3) (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016). Entretanto as manifestações clínicas específicas de determinadas raças de cães, como a dermatite úmida aguda traumática, observada em Goldens e Labradores devem ser investigadas (BIZIKOVA et al., 2015b) (Quadro 2). Observam-se também distribuição de áreas acometidas variando de acordo com a raça afetada (WILHEM et al., 2011) (Figura 4). No início da doença, o prurido é *sine materia*, ou alesional, fato marcante da DAC, ou ainda associado a lesões primárias discretas como eritema e pápulas. Com a cronicidade do quadro, observam-se lesões secundárias como alopecia autoinduzida, hiperpigmentação, hiperqueratose e eritema pronunciados (Figura 3). Tais sinais clínicos são intensificados na presença de infecções secundárias por bactérias ou por *Malassezia ssp.*



Figura 3- Áreas corporais acometidas e sinais clínicos observados em animais com dermatite atópica canina. A e B) Moderado eritema e discreta hiperqueratose em pavilhão auricular e espaço interdigital de um Maltês com sete anos de idade; C) Moderada hiperqueratose e hiperpigmentação em virilha de um Poodle com 10 anos de idade; D) Moderado eritema e discreta hiperqueratose perilabial em um SRD com 4 anos de idade; E) Intensa hipotricose em axila de um SRD com dois anos de idade.

A presença de prurido e lesões em regiões corporais específicas permitiu o desenvolvimento de escalas para avaliação da intensidade dos sinais clínicos como o CADESI IV (*canine atopic dermatitis extent and severity index*), facilitando a categorização da intensidade do quadro atópico, bem como a monitorização dos pacientes após o tratamento (OLIVRY et al., 2014).

Há ainda a possibilidade de apresentação de sinais extra cutâneos, como conjuntivite (reportada em 20-30% dos casos) e rinite com uma incidência de 7% (FAVROT et al., 2010; WILHEM et al., 2011)

Quadro 2- Exemplos de lesões específicas encontradas em algumas raças caninas com dermatite atópica

Raça	Lesões clínicas específicas
Boxer	Maior probabilidade de reações urticariantes e otite
Pastor alemão, Golden, Labrador	Incidência maior de dermatite úmida aguda traumática
Sharpey	Maior probabilidade de otite e diminuição importante do prurido sem lesão
West Highland White terrier	Incidência maior de seborreia e de dermatite por <i>Malassezia</i>

Fonte: adaptado de Bizikova et al. (2015)

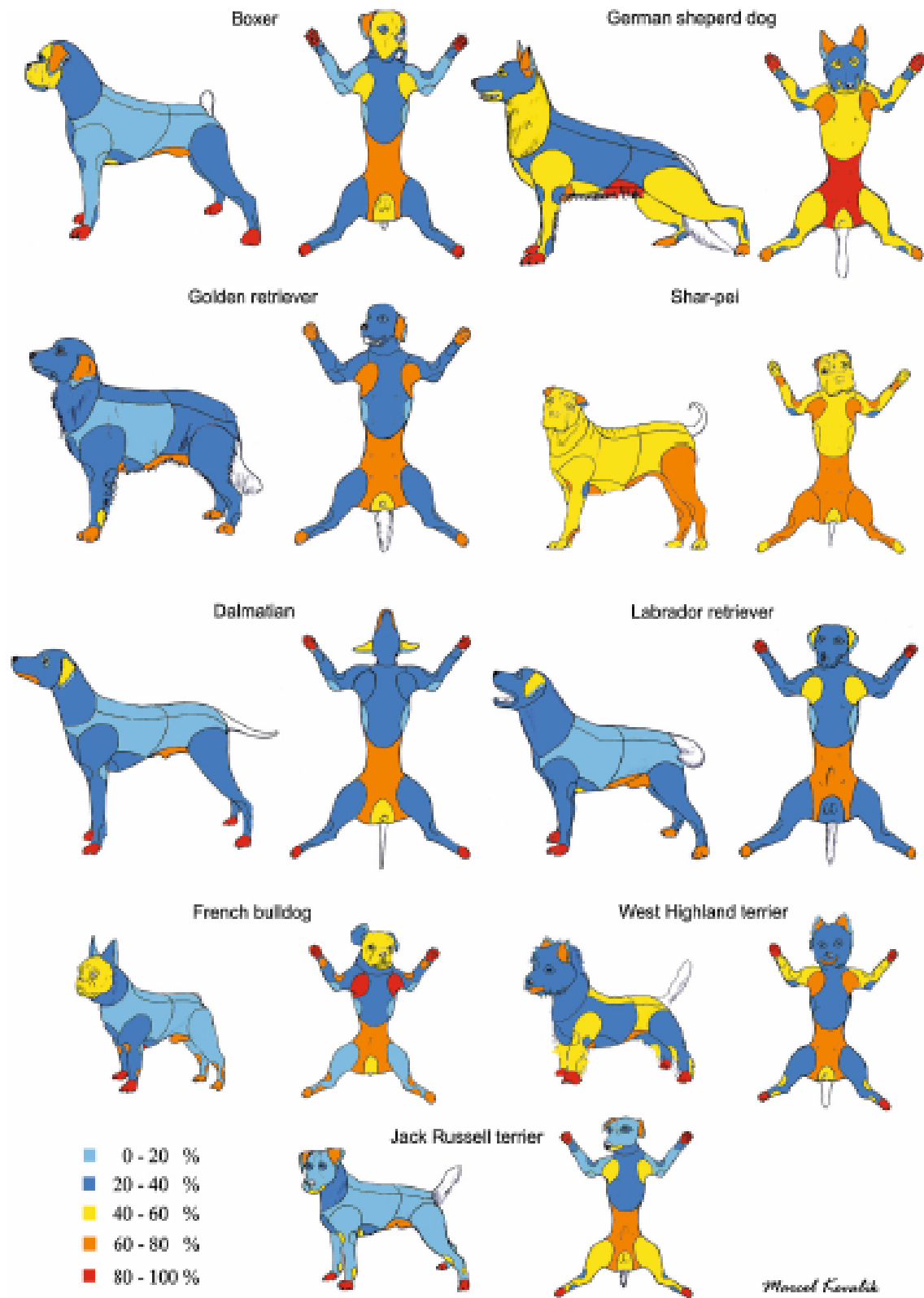


Figura 4 – Distribuição lesional e de prurido na dermatite atópica canina de acordo com raça acometida. Cada cor representa a frequência de animais afetados na área correspondente. Dados obtidos de WILHEM et al. (2011)

4. DIAGNÓSTICO

A abordagem do prurido em cão requer uma avaliação metódica de exclusão de afecções que contribuem para o prurido, a fim de se identificar a causa primária (Quadro 3). Portanto, antes de se concluir o diagnóstico de DAC, torna-se essencial a exclusão de infecções secundárias, como piodermite e malasseziose, bem como identificação de ectoparasitas, como pulgas, carrapatos, ácaros e também a utilização de uma dieta hipoalergênica, por um período de dois meses para excluir a possibilidade de hipersensibilidade alimentar (HENSEL et al., 2015).

Quadro 3- Diagnósticos diferenciais do prurido em cães

Ectoparasitas	Puliciose Escabiose Demodicidose Queiletielose Pediculose Otoacariase
Infecções microbianas	Piodermite Malasseziose
Doenças alérgicas	Dermatite alérgica à picada de pulga Dermatite atópica Hipersensibilidade alimentar Dermatite de contato
Neoplásica	Linfoma cutâneo

Fonte: Hensel et al. 2015

Sendo assim, o diagnóstico definitivo da DAC é clínico e baseado na observação do conjunto de elementos, que inclui uma história típica e sinais clínicos característicos, associado à exclusão de outras dermatopatias pruriginosas que a poderiam mimetizar (HENSEL et al., 2015). Um conjunto de critérios estabelecidos por Favrot et al., (2010) auxilia na identificação da doença, mas deve ser utilizado com cautela, já que aplicação rigorosa desses parâmetros, sem a exclusão apropriada de outras dermatopatias pruriginosas, poderia resultar em uma falha diagnóstica de aproximadamente 20% dos casos. Os critérios 1 são mais adequados para uso em estudos clínicos, em que o preenchimento de 5 critérios possui uma sensibilidade de 85,4% e especificidade de 79,1%. Já os critérios 2 devem ser utilizados para avaliar a probabilidade de diagnóstico de DAC

na rotina, porém não devem ser utilizados como ferramenta isolada. Neste, o preenchimento de cinco critérios tem uma sensibilidade de 77,2% e especificidade de 83% (Quadro 4)

Quadro 4- Critérios estabelecidos por Favrot et al. (2010), para auxiliar no diagnóstico de dermatite atópica canina. Os critérios 1, devem ser utilizados em estudos clínicos. Os critérios 2 devem ser utilizados para avaliar a probabilidade de diagnóstico da DAC na rotina

Critérios 1	Critérios 2
1- Surgimento dos sinais clínicos até os três anos de idade	1- Idade de aparecimento dos sinais clínicos < 3 anos
2- Vida intradomiciliar	2- Vida intradomiciliar
3- Prurido responsivo a corticosteroide	3- Prurido <i>sine materia</i> no início do quadro clínico
4- Infecções crônicas ou recorrentes por <i>Malassezia spp</i>	4- Podopatia de membros torácicos
5- Podopatia de membros torácicos	5- Acometimento do pavilhão auricular
6- Acometimento do pavilhão auricular	6- Sem acometimento da borda do pavilhão auricular
7- Sem acometimento da borda do pavilhão auricular	7- Não há acometimento da região lombo sacral
8- Não há acometimento da região lombo sacral	

Adaptado de Favrot et al. (2010)

Devido à importância do prurido na DAC, este deve ser avaliado de forma mais minuciosa e objetiva. A sua quantificação torna-se importante, já que é um parâmetro subjetivo e às vezes difícil de ser esclarecido pelo proprietário (OLIVRY et al., 2010a). Para tanto, foi proposta uma escala visual modificada em que são mensuradas a intensidade e frequência assim como descrição de alterações comportamentais que podem ser exibidas pelos cães (RYBNÍČEK et al., 2009) (Anexo 1).

5. TRATAMENTO

A escolha racional da melhor terapia busca o equilíbrio entre qualidade de vida e efeitos colaterais das medicações utilizadas, já que a DAC é uma doença crônica, incurável e requer tratamento a longo prazo (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016). Não há um protocolo universal para o tratamento, cada animal deve ser abordado de forma individual (LITTLE et al., 2015). Atualmente

recomenda-se uma abordagem multifacetada para o tratamento da DAC, considerando-se que é uma doença multifatorial que envolve interações complexas entre alterações imunológicas, disfunção da barreira cutânea e interações neuroimunes que, associados, produzem um ambiente de hipersensibilidade aos alérgenos ambientais (Figura 5) (SINKE et al., 2002; OLIVRY et al., 2010a; GONZALES et al., 2013). A gravidade do prurido e das lesões cutâneas pode ser reduzida por meio da utilização de fármacos sistêmicos antiinflamatórios e imunomoduladores, como corticosteroides, inibidores de calcineurina, anticorpo monoclonal anti IL-31 (LOKIVETMAB) e maleato de oclacitinib, bem como da utilização de imunoterapia alérgeno específica (ITAE) (OLIVRY et al., 2010a, 2015; SHAW, 2013; SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016)

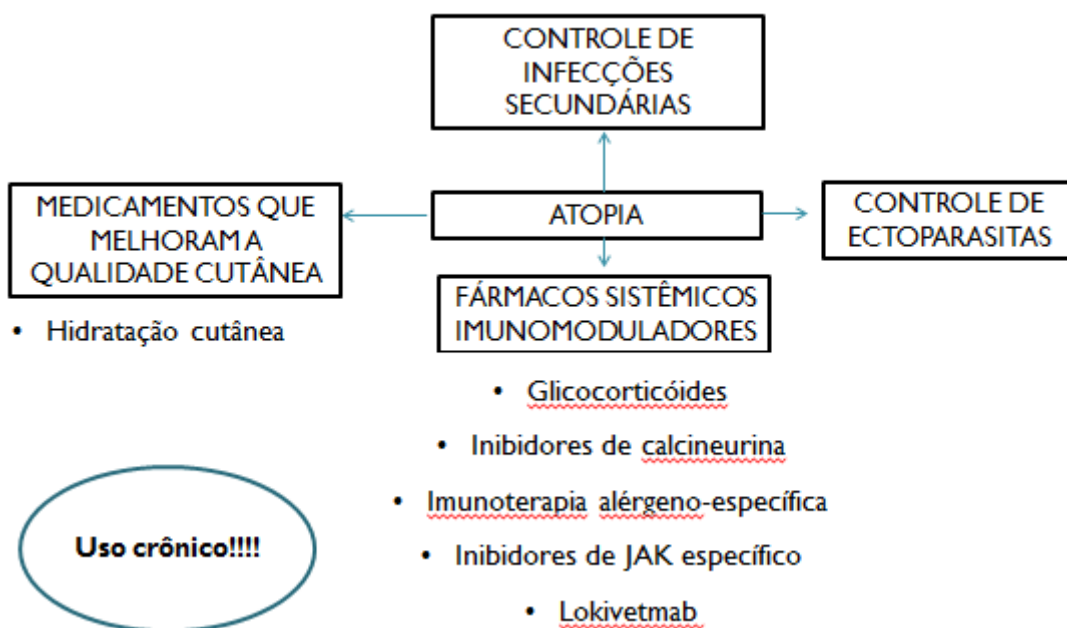


Figura 5 - Abordagem multifacetada para o tratamento de dermatite atópica canina.

5.1- Antihistamínicos

Há diversos antihistamínicos passíveis de ser utilizados nos cães, porém os seus efeitos são na maioria das vezes imprevisíveis. Se for opção de uso, o clínico deve estar preparado para a utilização de diversos antihistamínicos até que se chegue à conclusão de qual é o mais efetivo para determinado paciente (SCOTT e MILLER, 1999). Os anti-histamínicos considerados mais eficazes são hidroxizine 2mg/kg a cada 12 horas, e o seu metabólito ativo, cetirizina 1mg/kg uma vez ao dia (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016). Não foi observado efeito algum de cetirizine no prurido de animais com DAC, não havendo evidências para a sua recomendação no controle do prurido em animais com dermatite atópica (HSIAO et al., 2016). Atuam por bloqueio da liberação de histamina ou mais comumente por inibição competitiva dos receptores H1 nas

células inflamatórias. É considerado atualmente pouco útil no tratamento de dermatite atópica, principalmente como agente único, já que a histamina não é o principal mediador inflamatório e pruridogênico (OLIVRY et al., 2010b). Sendo assim, os antihistamínicos não são recomendados para o tratamento de crises aguda e nem como monoterapia na dermatite atópica canina, porém podem auxiliar na redução de dosagem de corticosteroide em animais com DAC em que a opção de tratamento tenha sido esse fármaco (SCOTT; MILLER, 1999; SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016). Devem ser fornecidos essencialmente como ação preventiva do prurido, mantendo os receptores H1 em um estado inativo antes da liberação da histamina durante as reações inflamatórias imediatas (OLIVRY et al., 2010b).

5.2- Ciclosporina

A ciclosporina é um fármaco isolado do fungo *Tolypocladium inflatum* e apresenta propriedades imunomodulatórias e imunossupressoras. Na medicina veterinária é amplamente utilizada para tratar diversas condições inflamatórias e imunomediadas, como fistulas perianais, adenite sebácea e DAC (STEFFAN et al., 2006; FORSYTHE; PATERSON, 2014). Diferentemente de outros imunossupressores, como a azatioprina e ciclofosfamida que não tem efeito antipruriginoso algum, a ciclosporina possui tal efeito na dose de 5 mg/kg a cada 24 horas no tratamento do prurido em pacientes com dermatite atópica (STEFFAN et al., 2005; OLIVRY et al., 2010a). Porém, observa-se que esse efeito ocorre, na maioria dos casos, após 30 dias do início da droga.

É um fármaco considerado seguro para utilização a longo prazo e atua pelo bloqueio da atividade da calcineurina, um enzima essencial para ativação de linfócitos T, reduzindo a expressão de citocinas pró inflamatórias (STEFFAN; PARKS; SEEWALD, 2005; NUTTALL; REECE; ROBERTS, 2014; OLIVRY et al., 2014). Além disso, inibe as células de Langerhans, responsáveis pelo início da resposta imune por meio de captura antigênica, e de células efetoras da reação alérgica, como os mastócitos e eosinófilos (OLIVRY et al., 2002). Os principais efeitos colaterais estão relacionados a distúrbios do trato gastrointestinal. Vômitos e diarreia são observados em cerca de 20-46% dos cães, que na maioria das vezes são autolimitantes e ocorrem somente nas duas primeiras semanas (STEFFAN et al., 2005). Outras alterações menos comuns como hiperplasia gengival, hirsutismo, ataxia e tremores já foram relatados (OLIVRY et al., 2002; MARTINS et al., 2014).

5.3- Imunoterapia alérgeno específica (ITAE)

A ITAE é uma terapia baseada nos resultados dos testes intradérmicos e/ou sorológicos que apresenta-se em forma de vacina ou spray oral (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016b). Esses testes não devem ser realizados como triagem para identificação de animais com dermatite atópica. Devem ser feitos somente após o diagnóstico definitivo de DAC, com o intuito de identificar os alérgenos causadores de reações de hipersensibilidade, para evitá-los ou incluí-los na vacina formulada (HENSEL et al., 2015).

A ITAE é o único tratamento específico da dermatite atópica canina que pode alterar o curso da doença. No entanto sua eficácia está em torno de 64%, que pode ser observado após um ano de uso contínuo (SCHNABL et al., 2006; SHAW, 2013). Sendo assim, não é um tratamento adequado para todos os animais diagnosticados com DAC. A sua escolha pode ser embasada em

alguns fatores como: resposta terapêutica insuficiente com fármacos, efeitos colaterais intoleráveis advindos do uso de imunomoduladores e sinais clínicos que perduram mais do que três meses por ano (HENSEL et al., 2015).

5.4- Glicocorticoides

Os glicocorticoides são fármacos amplamente utilizados na Medicina Veterinária para uma série de afecções inflamatórias, imunomediadas, bem como para o rápido controle do prurido em animais alergopatas. A eficácia observada em animais com DAC está relacionada à redução de células inflamatórias e, conseqüentemente, à diminuição da produção de mediadores pró-inflamatórios (OLIVRY e SOUSA, 2001)

São drogas bastante efetivas, porém efeitos colaterais são observados mesmo após curto período de utilização. Problemas agudos como poliúria, polidipsia, polifagia podem interferir com a qualidade de vida do animal e diminuir a colaboração dos tutores. Administrações à longo prazo podem ocasionar em pancreatite, úlceras gastrointestinais, dislipidemia, *diabetes mellitus* e hiperadrenocorticismismo iatrogênico (MILLER et al., 2013). Sendo assim, é um fármaco que deve ser utilizado somente para o tratamento de crises agudas; como parte do protocolo inicial na implementação de outros fármacos com início de ação mais longo, ou ainda devido às falhas em outras terapias (SARIDOMICHELAKIS; OLIVRY, 2016). Caso a utilização prolongada seja necessária, a melhor opção é prednisona ou prednisolona 0,5-1mg/kg a cada 24 horas por via oral, seguidos pela redução da dosagem e frequência, até se estabelecer a menor dose e frequência efetivas para o controle dos sinais clínicos. Há ainda a possibilidade de terapia com corticosteroides tópicos, principalmente em crises agudas e lesões localizadas. Tal terapia costuma ser bem tolerada pelos animais, porém atenção deve ser dada a atrofia cutânea que pode se desenvolver a longo prazo. Um estudo clínico comprovou que a aplicação em spray, uma a duas vezes por dia, de aceponato de hidrocortisona foi suficiente para melhorar de forma significativa as lesões e o prurido dos animais atópicos tratados (NAM et al., 2012).

5.5- Lokivetmab

O Lokivetmab é um anticorpo monoclonal que se liga especificamente à citocina IL-31, impedindo a ligação com o seu receptor específico. Portanto, reduz o prurido e as lesões inflamatórias associadas. Quando utilizado na dose de 0,5 - 2 mg/kg por via subcutânea, a duração do efeito antipruriginoso foi de um mês (MICHELS et al., 2016a). Um estudo avaliou a segurança após duas administrações subcutâneas intervaladas de 28 dias. Não foram observadas reações de hipersensibilidade como vômitos, diarreia ou urticária. O desconforto após a aplicação foi similar ao do grupo placebo (MICHELS et al., 2016b).

Na avaliação da sua eficácia em comparação à ciclosporina, foi observada similaridade de resposta após 28 dias da administração dos fármacos, tanto na redução do prurido (51,9%) quanto na redução no índice de escore lesional (54,2%) (MOYAERT et al., 2017). As poucas evidências de efeitos colaterais a curto prazo e boa eficácia, a colocam como boa opção terapêutica para o tratamento de dermatite atópica canina, porém até o momento da escrita dessa tese é um produto ainda indisponível no Brasil.

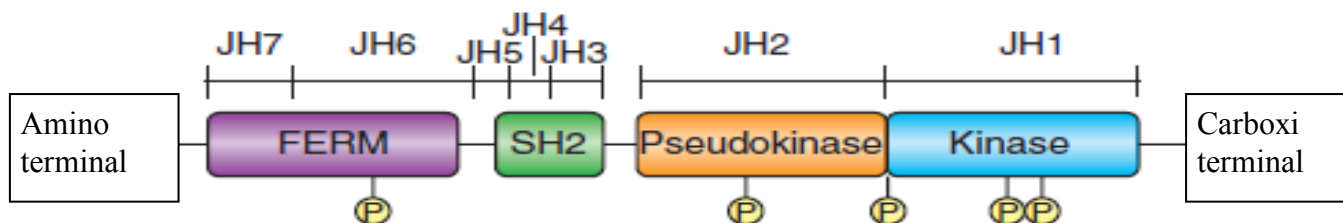
5.6 - Enzimas Janus quinase

As enzimas Janus quinase (JAK) pertencem a um grupo de tirosina quinases intracelulares que participam da cascata de sinalização de citocinas por associação com seus receptores (AVILA E ROMEIRO, 2010). Essas enzimas são encontradas em peixes, pássaros, insetos e mamíferos. Nestes, o grupo Janus quinase é composto por quatro enzimas: JAK1, JAK2, JAK3 e tirosina kinase 2 (TYK2) e tem um importante papel na ativação de numerosas citocinas (YAMAOKA et al., 2004; GONZALES et al., 2014). As enzimas JAK1, JAK2 e TYK2 têm distribuição ubíqua nos mamíferos, enquanto a expressão da enzima JAK3 é restrita às células da linhagem linfóide e mielóide (MUSSO et al., 1995; KISSELEVA et al., 2002). Elas participam do crescimento, sobrevivência, desenvolvimento, diferenciação e apoptose de uma variedade de células, com importância principal para as células do sistema imune e do sistema hematopoiético. (RANE e REDDY, 2000; GHORESCHI et al., 2010). O principal meio pelo qual as enzimas JAK exercem o seu efeito é pela ativação das proteínas transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT, *signal transducers and activators of transcription*), relação conhecida como JAK/STAT (GHORESCHI et al., 2010).

5.6.1- Estrutura das JAKs

Os genes que decodificam as enzimas janus quinase nos mamíferos são localizados em três diferentes cromossomos. São consideradas proteínas relativamente grandes contendo mais de 1.000 aminoácidos e massa molecular de 120-140 kDa. Sete regiões homólogas distintas foram identificadas (JH1-JH7), numeradas do grupo carboxil ao amino terminal e juntas participam da função completa dessa enzima (YAMAOKA et al., 2004; GHORESCHI et al., 2009) (Figura 6). Apesar de a atividade biológica de cada região não estar completamente elucidada, diversos domínios são bem caracterizados (KISSELEVA et al., 2002). A região JH1 está associada ao domínio quinase cataliticamente ativo e adjacente a este, a região JH2 ou pseudoquinase é uma região enzimaticamente inativa, porém com funções regulatórias importantes. A presença do domínio JH2 diferencia as JAKs de outras proteínas quinases (KISSELEVA et al., 2002). Essa arquitetura dos domínios JH1 e JH2 é a marca dos JAK e é por isso que recebem o nome de Janus quinase, em similaridade com o rei romano Janus, que tem duas faces (YAMAOKA et al., 2004). A porção amino terminal contém o domínio SH2 (JH3 e JH4) e o domínio FERM (JH6 e JH7), que tem uma extensão de 300 aminoácidos e está relacionado com as interações com os receptores de citocinas. Além disso, esse domínio se liga ao domínio kinase e regula positivamente a ação catalítica (YAMAOKA et al., 2004). Mutações em cada uma dessas regiões podem levar a problemas distintos. Como exemplo um ponto único de mutação dentro do domínio JH2 está

presente na maioria dos pacientes com policitemia vera e mielofibrose idiopática (LEVINE et



Fonte: adaptado de Yamaoka et al., 2004

Figura 6- Esquema estrutural do grupo Janus quinase (JAKs). Esse grupo compreende quatro quinases estruturalmente relacionadas: JAK-1, JAK-2, JAK-3 e TYK-2. Sete regiões homólogas dos JAKs (JH) são identificadas: o domínio quinase (JH1), cataliticamente ativo, o domínio pseudoquinase (JH2), enzimaticamente inativo, o domínio SH2 (JH3, JH4, JH5) e o domínio FERM (JH6 e JH7), responsável por mediar a ligação das enzimas JAK ao receptor de citocina e regular a atividade da quinase.

al., 2005)

5.6.2- Mecanismos regulatórios das JAKs

O principal meio pelo qual as enzimas JAK exercem o seu efeito por meio da ativação das STAT. Essa estreita relação entre as duas proteínas é conhecida como JAK-STAT (GHORESCHI et al., 2009).

As enzimas JAK residem no citoplasma das células e estão intimamente associadas com a porção próxima citoplasmática de uma variedade de receptores tipo 1 e 2 de citocinas. Essa associação pode ser de uma ou de mais JAKs associadas. Após a estimulação desses receptores pelas citocinas, ocorrem alterações conformacionais na porção citoplasmática do mesmo, ocasionando na ativação das JAKs. Essas enzimas ativadas fosforilam o domínio intracelular do receptor de citocina criando pontos de ancoragem para proteínas sinalizadas, as STATs (KISSELEVA et al., 2002). Uma vez nos receptores, as STATs sofrem fosforilação pelas JAKs, se despreendem do mesmo e se translocam até o núcleo onde se ligam a uma sequência específica de ácido desoxirribonucleico (DNA, *deoxyribonucleic acid*) e induz a transcrição (HARRISON, 2012) (Figura 7). Portanto, as enzimas do grupo JAK permitem que proteínas extracelulares, como as citocinas, transmitam sinais até o núcleo de células alvo para iniciar a resposta biológica específica (RAWLINGS et al., 2004; GONZALES et al., 2014).

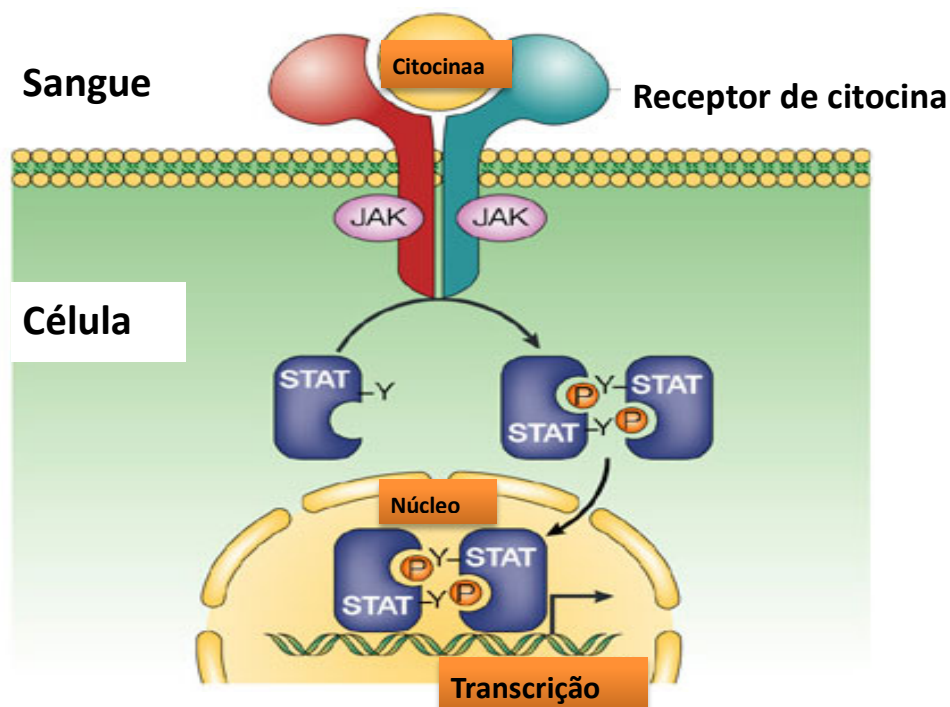


Figura 7- Atuação das enzimas Janus quinase (JAK), na ativação do receptor de citocinas. As citocinas se ligam ao receptor específico, associadas às enzimas JAK na sua porção citoplasmática. Isso ocasiona na dimerização do receptor e ativação dos JAK e consequente fosforilação do receptor, permitindo a ligação e fosforilação das proteínas transdutoras de sinal e ativadoras da transcrição (STAT, *signal transducer and activator of transcription*). A fosforilação do STAT induz a sua dimerização e translocação para o núcleo, onde regula a transcrição de vários genes envolvidos no crescimento e sobrevivência celular.

5.6.3- JAKs e a sinalização de citocinas

A efetividade da imunidade inata e adquirida requerem uma sinalização funcional das enzimas JAK para a proteção contra infecções e surgimento de tumores (GHORESCHI; LAURENCE; SHEA, 2010). Os inibidores de JAK alteram a resposta imune e podem aumentar o risco de infecção bacteriana, assim como aumentar o risco de neoplasias, como resultado de um bloqueio da ação de interferon e das células natural *killer* (KUBLER, 2014). Sabe-se que mutações que ocasionam a ativação excessiva ou a falha da regulação da sinalização das enzimas JAK em humanos são responsáveis por doenças inflamatórias, imunodeficiências, leucemias, policitemia vera e outras desordens mieloproliferativas (JATIANI et al., 2010; QUINTÁS-CARDAMA, 2013).

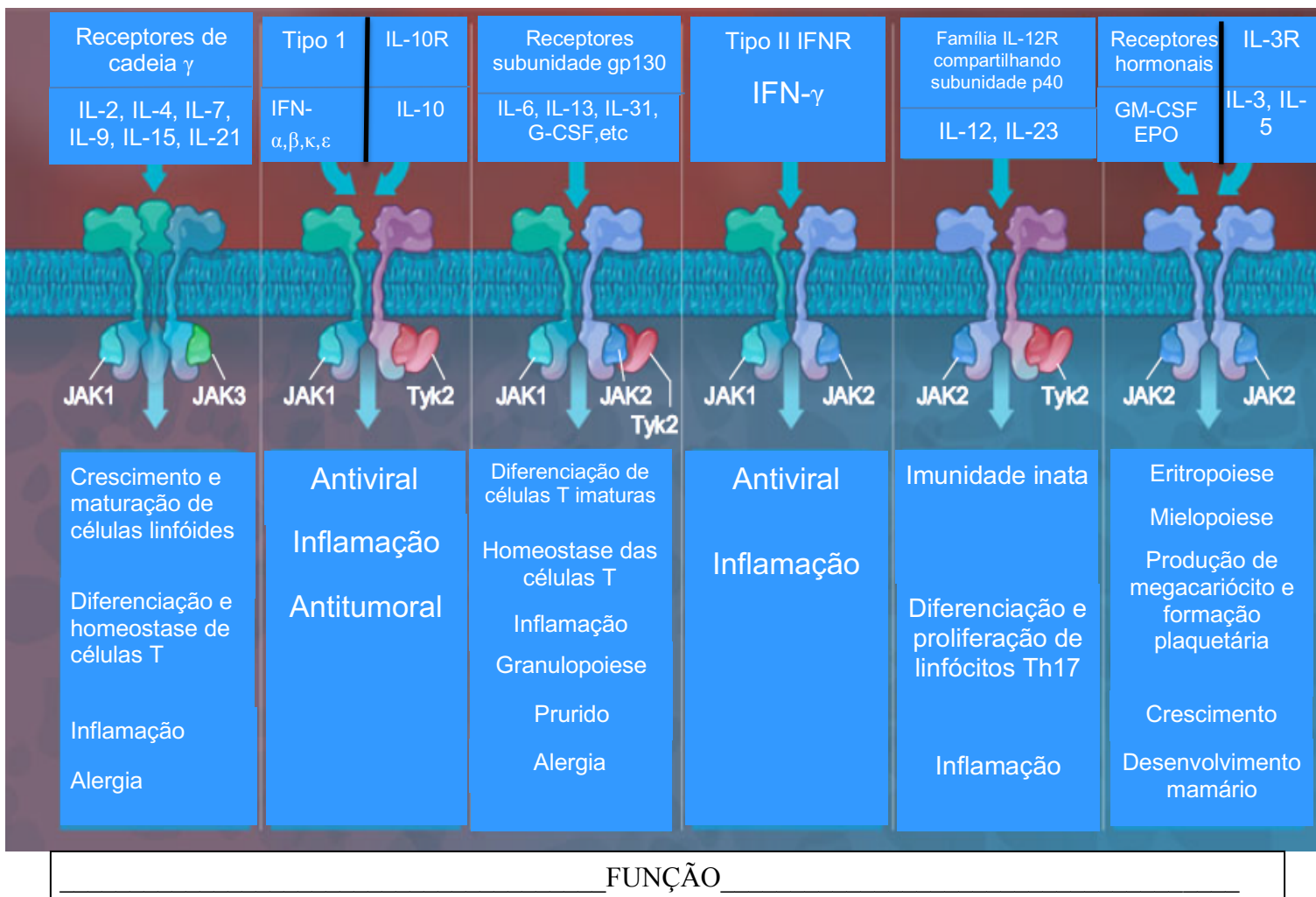
A primeira evidência que as JAKs são cruciais na sinalização de citocinas foi observada por linhagens de células mutantes que respondiam pouco ao interferon e que não possuíam a enzima TYK2. Após a correção da mutação, a expressão de TYK2 foi normalizada e a sinalização ao IFN foi reestabelecida (VELAZQUEZ et al., 1992). No entanto, uma pesquisa mais recente identificou que a TYK2 é essencial para a sinalização de IL-12, mas não de IFN- $\alpha\beta$, conforme havia sido demonstrado (SHIMODA et al., 2000).

Atualmente sabe-se que as enzimas Janus quinase são diferentemente ativadas em respostas as diversas citocinas que participam da patogênese da dermatite alérgica bem como do crescimento, sobrevivência, desenvolvimento, diferenciação e apoptose de uma variedade de células. Esses eventos celulares são críticos na hematopoiese, desenvolvimento do sistema imune, dimorfismo sexual e adipogênese (RAWLINGS et al., 2004).

Diversas citocinas são dependentes da JAK1 (Figura 8), incluindo as que utilizam uma subunidade de receptor compartilhada, denominada de cadeia γ (γc , γ chain), como as interleucinas (IL)-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (YAMAOKA et al., 2004). Essas citocinas são também dependentes de JAK3, que tem um papel essencial na sinalização de citocinas que utilizam receptores associados à γc (PARGANAS et al., 1998). A JAK1 também é importante na sinalização de citocinas que utilizam uma outra subunidade de receptor compartilhada gp130, como as IL-6, IL-11, IL-12, fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*) e IFN (YAMAOKA et al., 2004). Além disso, essa enzima participa da sinalização das citocinas pró-inflamatórias IL-2, IL-4, IL-6, IL-13 e IL-31 (GONZALES et al., 2014). A deficiência de JAK1, observada em camundongos *knockout*, ocasionou em imunodeficiência, devido à alteração no desenvolvimento dos linfócitos pela falta de sinalização de citocinas que utilizam essa enzima para atuação (RODIG et al., 1998). Portanto, sabe-se que JAK1 participa substancialmente de distintas respostas biológicas de diversas citocinas importantes (KISSELEVA et al., 2002).

A JAK2 tem papel fundamental na sinalização de citocinas com ação hormonal, como hormônio do crescimento (GH, *growth hormone*), prolactina, eritropoietina (EPO, *erythropoietin*), trombopoietina, assim como na ação da família de citocinas que sinalizam por meio do receptor para IL-3 [IL-3, IL-5 e fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF, *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*)] (YAMAOKA et al., 2004). Não obstante participa da ação de citocinas que utilizam gp130 e alguns IFNs. A deficiência de JAK2, experimentalmente induzida em camundongos, ocasionou em mortalidade fetal por deficiência na eritropoiese. Verificou-se por reconstituições experimentais, que JAK2 não é necessário para a produção de progenitores linfoides, nem para sua diferenciação e amplificação (PARGANAS et al., 1998). Algumas citocinas como IL-6, IL-10, IL-11, IL-19, IL-20, IL-22 e interferon gama (IFN- γ) são sinalizadas tanto por JAK1 como JAK2 (QUINTÁS-CARDAMA, 2013).

A expressão de JAK3 é restrita às células da linhagem linfóide e mielóide. Essa enzima, assim como JAK1, está implicada na sinalização de citocinas que utilizam a subunidade de receptor compartilhada, de cadeia γ (γc , γ chain), como as interleucinas (IL)-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21 (YAMAOKA et al., 2004). Verificou-se que IL-7 é um potente estímulo para células B e T imaturas, senso assim essencial para a expansão de progenitores de linfócitos (VON FREEDEN-JEFFREY et al., 1995; LEONARD; SHEA, 1998). Portanto, a JAK3 é essencial para o desenvolvimento das células linfoides. TYK2 é essencial para a ativação de IL-12 e participa da ativação de outras citocinas sinalizadas também por JAK1 e JAK2 (SHIMODA et al., 2000).



Fonte: adaptado de Gonzales et al., 2014

Figura 8- Grupos de receptores de citocinas que utilizam as enzimas Janus quinase (JAK) para sinalização. As citocinas são proteínas pequenas secretadas pelas células que produzem uma variedade de respostas como crescimento, desenvolvimento, diferenciação e ativação de diversas células, como as células do sistema imune. Elas produzem esse efeito biológico através da ligação a receptores da superfície celular. Diversos desses receptores dependem da associação e ativação das enzimas do grupo JAK para transmitir sinais ao núcleo e induzir alterações celulares. Os receptores de citocinas podem ser agrupados de acordo com o tipo de JAK que é recrutado a esse complexo de receptor. Diversas citocinas envolvidas na alergia, inflamação e prurido se ligam a receptores que utilizam JAK-1. Por exemplo, IL-2 e IL-4 se ligam a receptores que recrutam JAK-1 e JAK-3. IL-6 e IL-13 se ligam à receptores que utilizam JAK-1, JAK-2 e tirosina-quinase 2 (TYK-2), enquanto a IL-31 se liga à receptores ativados por JAK-1 e JAK-2. Em contraste, diversas citocinas envolvidas na hematopoiese (eritropoietina) ou nas células de defesa da imunidade inata (IL-12 e IL-23) ativam receptores dependentes de pares de JAK-2/JAK-2 ou JAK-2/TYK-2 (GONZALES et al., 2014).

5.6.4- Maleato de oclacitinib

O maleato de oclacitinib (APOQUEL®, Zoetis) é o primeiro fármaco inibidor de Janus quinase (JAK) desenvolvido para cães (COLLARD et al., 2014). Atua preferencialmente sobre JAK 1, que tem papel fundamental na atividade de citocinas pró-alérgicas (IL-4, IL-13), pró inflamatórias (IL-2, IL-6) e pruridogênicas (IL-31). Exerce pouco efeito nas citocinas envolvidas na hematopoiese e que são dependentes da enzima JAK2 (GONZALES et al., 2014). Foi recentemente aprovado para o controle do prurido em cães acima de 12 meses com DAC em diversos países, como o Brasil. Atinge pico de concentração plasmática 1 hora após a administração por via oral, e possui biodisponibilidade de 89%, não sendo interferida por estado prandial do animal (COLLARD et al., 2014).

Nos cães, o maleato de oclacitinib é biotransformado em vários metabólitos, sendo um metabólito oxidativo principal identificado no plasma e na urina. A principal via de excreção é pelo metabolismo hepático, porém há pouca inibição do citocromo canino P450.

Estudos clínicos demonstraram rápida eficácia da medicação, comparada ao placebo, com redução importante do prurido em 24h após administração em cães alergopatas (COSGROVE et al., 2013a, 2013b). Observa-se ainda importante redução do prurido e lesões, como eritema, alopecia e escoriações e hiperqueratose, quando administrados a longo prazo, ocasionando na melhora da qualidade de vida dos animais (COSGROVE et al., 2015). A posologia preconizada é de 0,4-0,6mg/kg a cada 12 horas nos primeiros 14 dias, seguidos da mesma dosagem a cada 24 horas de forma contínua. Efeitos adversos são incomuns, mas podem incluir anorexia, vômitos e diarreia (COSGROVE et al., 2015). Quando comparado à ciclosporina, em estudo conduzido por 84 dias, observaram-se ação mais rápida e menor frequência de efeitos colaterais, principalmente gastrointestinais, após uso do maleato de oclacitinib (LITTLE et al., 2015). Além disso, a administração da associação de maleato de oclacitinib e ciclosporina por três semanas mostrou-se segura nos animais (PANTERI et al., 2016).

Os inibidores de JAK alteram a resposta imune, e conseqüentemente podem aumentar o risco de infecções e de neoplasias como resultado do bloqueio da ação de interferon e das células natural killer (KUBLER, 2014). Identificaram-se em alguns animais, após o uso crônico, neoplasias malignas como carcinoma celular transitório, linfoma, mastocitoma de grau II e III e adenocarcinoma de glândulas apócrinas, porém não se estabeleceu associação direta com o uso do maleato de oclacitinib (COSGROVE et al., 2015; ROSENKRANTZ e BOURGEOIS, 2017). Tratamentos curtos com a droga aparentam ser seguros e já consta no consenso sobre tratamento de dermatite atópica canina (OLIVRY et al., 2015). Estudos independentes e mais longos, avaliando-se parâmetros mais específicos, são necessários para verificar a segurança a longo prazo dessa medicação (SARIDOMICHELAKIS e OLIVRY, 2016).

6- AVALIAÇÃO DE IMUNOTOXICIDADE

O sistema imune tem importante papel na proteção do organismo contra agentes patogênicos, como vírus e bactérias, na eliminação de células neoplásicas e na eliminação de componentes estranhos ao organismo (DERELANKO e HOLLINGER, 2002). É composto por órgãos linfoides como baço, timo, linfonodos, medula óssea e áreas do intestino (placas de Peyer). A principal

célula que o compõem são os linfócitos, acompanhados por macrófagos, células *natural killer* (NK), eosinófilos, basófilos, células dendríticas e células epiteliais (KAROL, 1998).

A imunotoxicologia avalia as consequências da exposição, aguda ou crônica, aos compostos químicos, biológicos e agentes ambientais na estrutura e função do sistema imune. Podem ser observados hiperativação do sistema imune como nas desordens de hipersensibilidade ou doenças autoimunes ou ainda imunossupressão, que ocasiona na sua reduzida capacidade no combate de agentes infecciosos e tumorais (KAROL, 1998). Há pelo menos duas características importantes desse sistema, que geram desafios na avaliação dos possíveis efeitos tóxicos de determinadas drogas: 1) O fato dele ser composto por componentes celulares dinâmicos que estão em constante adaptação, diferenciação e proliferação; 2) O fato de ser coordenado por mecanismos regulatórios e de *feedback* específicos que podem ser influência positiva ou negativa em determinada função imunológica (DERELANKO; HOLLINGER, 2002). Devido a essa complexidade, diversas análises têm sido desenvolvidas para caracterizar as propriedades imunotóxicas de xenobióticos em humanos e em animais.

Os ensaios validados e as abordagens experimentais utilizadas nas avaliações imunotoxicológicas atuais são resultados de um trabalho da década de 80 (LUSTER et al., 1988). A complexa estrutura e função do sistema imune requer que múltiplos parâmetros sejam examinados durante a avaliação da imunotoxicidade de fármacos e para isso uma abordagem em etapas é proposta. Essa abordagem consiste em uma tabela estruturada de exames apropriados para avaliar tanto a integridade como a estrutura da função imune em animais experimentais após exposição a xenobióticos (DERELANKO e HOLLINGER, 2002) As etapas foram conduzidas em ratos e camundongos, mas demonstraram ser confiáveis e reproduzíveis em outras espécies. Avaliam parâmetros como imunopatologia, imunidade humoral, imunidade celular, imunidade não específica e desafios à resistência do hospedeiro. Porém, não é necessário que se utilize todos esses exames para determinar a imunotoxicidade das drogas (KAROL, 1998). As normas para a avaliação funcional da imunotoxicidade em estudos regulatórios recomendam a condução de três testes. A avaliação da imunotoxicidade começa pela exposição ao xenobiótico por pelo menos 28 dias, seguindo-se avaliação da resposta humoral. Caso haja supressão significativa, é recomendada a realização de marcadores celulares por citometria de fluxo. No entanto, se o composto não produz supressão humoral a avaliação da imunidade inata (ensaio de linfócitos NK) deve ser feita (KAROL, 1998).

6.1- Etapa 1

A primeira etapa de avaliação consiste em um painel limitado de procedimentos, desenvolvidos para verificar potenciais alterações no sistema imune. As avaliações se restringem à procedimentos que acessam a imunopatologia, imunidade humoral e imunidade celular (Quadro 5) (DERELANKO e HOLLINGER, 2002).

Quadro 5- Primeira etapa de diagnósticos de imunotoxicidade em ratos

ETAPA 1	
Parâmetro	Procedimento
<i>Imunopatologia</i>	Hematologia
	Peso de órgãos_baço, rim, fígado
	Celularidade dos órgãos
	Histologia de órgãos linfóides
<i>Imunidade humoral</i>	Enumeração de IgM por PFC
	Blastogênese de linfócitos por LPS
<i>Imunidade celular</i>	Blastogênese de linfócitos à mitógenos e MLR
<i>Imunidade não específica</i>	Atividade das células Natural Killer (NK)

Fonte: Derelanko e Hollinger, 2002

PFC= *Plaque Forming Cell*
MLR= *Mixed Lymphocyte reaction*

6.1.1- Imunopatologia

As avaliações de imunopatologia envolvem exames de sangue e análises de órgãos linfóides, quanto à celularidade e arquitetura. Diversas colorações especiais podem ser utilizadas para detectar alterações na função celular (DERELANKO e HOLLINGER, 2002).

6.1.2- Imunidade humoral

A imunidade humoral é avaliada principalmente pela mensuração da produção de anticorpos frente a um antígeno específico, que é o principal parâmetro alterado em animais expostos a

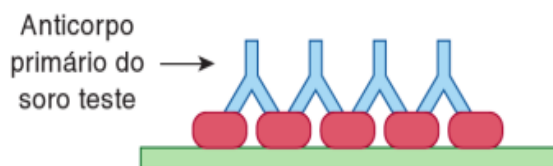
imunossupressores. Um teste padrão avalia essa função por meio do número de células formadoras de placas (PFC, *Plaque Forming Cell*) (DERELANKO e HOLLINGER, 2002).

Inocula-se por via intravenosa ou intraperitoneal, hemácias de carneiros para a imunização dos camundongos. Após quatro dias, os animais são eutanasiados, o baço é removido e separado em células. Os esplenócitos são misturadas no ágar pré-aquecido com hemácias de ovelhas e soro de cobaia. A mistura é plaqueada e incubada por 2-3 horas à 37°C, período em que as células B secretam anticorpos IgM anti-hemácias. Esses anticorpos se ligam às hemácias no ágar e observa-se áreas de hemólise. Após esse período, o halo de lise de eritrócitos de carneiro é contado e representado com número de PFC/10⁵ esplenócitos. Esse teste pode ainda ser realizado *in vivo* pela técnica de ELISA (Figura 9). O soro de camundongo imunizado com hemácias é incubado em uma microplaca previamente revestida com membrana de hemácias, que servirá de antígeno para os anticorpos específicos IgM ou IgG. Após a incubação, é adicionado um anticorpo monoclonal contra IgM (ou IgG) conjugado com enzima (anticorpo secundário). Esse anticorpo monoclonal reconhece IgM (ou IgG) e liga-se especificamente ao anticorpo que se ligou ao antígeno. Adiciona-se então um substrato-cromógeno específico para a enzima. O substrato em contato com a enzima do anticorpo secundário, sofre alteração de cor, que pode ser detectada e mensurada por espectrofotômetro de microplacas (DERELANKO e HOLLINGER, 2002)

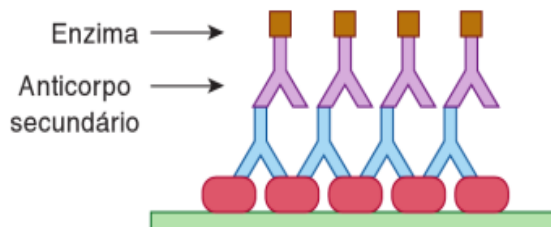
1. Ligação do antígeno à placa. Lavagens.



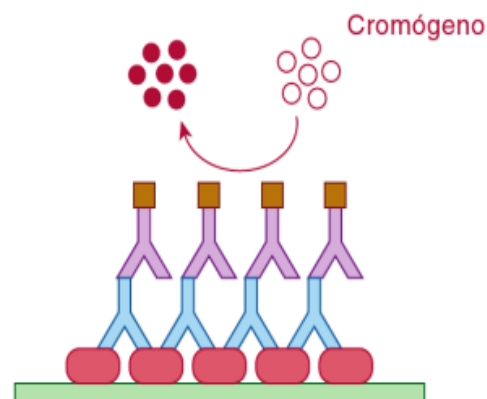
2. Adição do soro teste e incubação. Lavagens.



3. Adição do anticorpo secundário conjugado com enzima e incubação. Lavagens.



4. Adição do cromógeno e desenvolvimento de cor.



Fonte: Kaminski et al., 2010

Figura 9- Diagrama esquemático do teste ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

6.1.3- Imunidade celular

A imunidade celular pode ser verificada pela mensuração da blastogênese e proliferação de populações de linfócitos quando estimuladas com mitógenos não específicos, principalmente fitohemaglutinina (PHA, *phyto-hemagglutinin*) ou concanavalina A (ConA, *concanavalin A*). Os linfócitos B são testados pela incubação com lipopolissacarídeos (LPS) (DERELANKO e HOLLINGER, 2002).

Outro teste é a resposta mista dos linfócitos (MLR, *mixed lymphocyte reaction*) que mensura a proliferação dos linfócitos quando estimulados por células alogênicas. Esse teste é realizado incubando uma suspensão de células de linfonodos mesentéricos, inguinais, axilares e cervicais de ratos ou murinos associados a *H-thymidine* (KAROL, 1998).

Um terceiro teste para avaliar a resposta imune celular é por meio da verificação da função dos linfócitos NK, que são as primeiras células a sucumbir na imunossupressão ocasionada por xenobióticos. A avaliação da capacidade de células NK de lisar células é realizada após a incubação de células-alvo marcadas com um fluorocromo específico com as células NK por cerca de 20 horas em placas de poliestireno com 96 poços a 37°C e 5% CO₂. Um grupo controle, para avaliação de mortalidade espontânea das células-alvo também é incubado por 20 horas nas mesmas condições. A leitura é realizada no citômetro de fluxo (MARCUSSON-STÅHL e CEDERBRANT, 2003). Para a avaliação da porcentagem de células alvo mortas pela citotoxicidade das células NK expressa-se o resultado por porcentagem de citotoxicidade conforme a fórmula:

$$\text{Citotoxicidade (\%)} = \frac{\text{MA} - \text{ME}}{100 - \text{ME}} \times 100$$

MA= Porcentagem de células-alvo mortas na amostra incubada com células NK

ME= porcentagem de células-alvos mortas espontaneamente

A citometria de fluxo é uma técnica muito utilizada para prover informações sobre o subtipo de células T envolvido após a exposição à xenobióticos e identificar possíveis efeitos na sua maturação. Essa técnica emprega dispersão de luz, fluorescência e medidas de absorvância de luz emitidas para identificar e quantificar as células do indivíduo. Anticorpos monoclonais específicos são marcados com fluorocromo para determinadas moléculas celulares e, assim, podem detectar células específicas (TARRANT, 2005)

6.2- Etapa 2

A etapa 2 foi designada para estudos adicionais no intuito de definir o efeito imunotóxico do xenobiótico, e inclui testes para avaliar a imunidade mediada por células, respostas secundárias de anticorpos, enumeração de populações de linfócitos e modelos de resistência do hospedeiro (Quadro 6) (DERELANKO e HOLLINGER, 2002).

Quadro 6- 2ª Etapa de diagnósticos de imunotoxicidade em ratos

ETAPA 2	
Parâmetro	Procedimento
<i>Imunopatologia</i>	Quantificação de células B e T no baço

Imunidade humoral	Enumeração de IgG por PFC
Imunidade celular	Ensaio de linfócitos T citotóxicos
	Resposta tardia de hipersensibilidade
Imunidade não específica	Função macrofágica: quantificação de células peritoniais residentes e atividade fagocítica
Desafios à resistência do hospedeiro	Modelo de células tumorais singênicas (B16F10; PYB6), modelos bacterianos, virais e parasitários

Fonte: Derelanko e Hollinger, 2002

PFC= *Plaque Forming Cell*

6.3-Modelos animais em imunotoxocologia

Ratos e camundongos têm sido animais de escolha para o estudo da ação de xenobióticos sobre o sistema imune, devido ao baixo de custo de manutenção em relação a animais maiores, ampla variedade de reagentes disponíveis (citocinas e anticorpos) e amplo conhecimento do sistema imune desses animais. Há ainda a possibilidade de manipulação do genoma embrionário, criando camundongos transgênicos ou *knockout* para determinado gene, permitindo que a resposta imune seja destrinchada em seus componentes (KAMINSKI et al., 2010).

Os cães são um importante modelo para o estudo de mecanismos imunológicos de algumas doenças como dermatite atopica, anemia hemolítica imunomediada, condições dermatológicas autoimunes e lúpus eritematoso sistêmicos (PEDERSEN, 1999). Além disso, podem ser utilizados como modelo alternativo em ensaios clínicos para testes de imunotoxicidade (DERELANKO e HOLLINGER, 2002). Os níveis de globulinas séricas não específicas são considerados um dos principais parâmetros na avaliação da imunocompetência na rotina clínica de cães e devem ser considerados na avaliação de imunotoxicidade (GERMAN et al., 1998). Há alguns ensaios viáveis para avaliar o sistema imune de cães e sua resposta à drogas, como a avaliação de células NK, resposta linfoproliferativa a mitógenos, avaliação da formação de anticorpos por ELISA (DERELANKO e HOLLINGER, 2002). Jones et al. (2000), observaram que a técnica de ELISA para a mensuração de anticorpos e a citometria de fluxo para mensurar populações específicas de linfócitos canino podem ser adicionadas à bateria de testes utilizados para avaliar a imunotoxicidade de drogas em cães.

6.4- Citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica empregada para determinar componentes específicos do sistema imune (FUJIWARA et al., 2005). Permite a identificação e quantificação de diferentes subpopulações linfocitárias em uma suspensão celular por meio do uso de anticorpos monoclonais, assim como a análise de moléculas de superfície, intracitoplasmáticas e intranucleares (BYRNE et al., 2000; FALDYNA et al., 2001). Em animais de companhia, a análise de subpopulações de linfócitos é tipicamente utilizada em pesquisas para verificar a imunocompetência, a influência de drogas no sistema imune e a progressão de doenças infecciosas (TARRANT, 2005). Já foram observadas alterações nos valores séricos de CD4+ e CD8+, com razão CD4+/CD8+ significativamente menor do que em animais saudáveis, além de diminuição de CD21+ em cães da raça Pastor Alemão com piodermite (CHABANNE et al., 1995). Observou-se também valores absolutos reduzidos de CD4+ em animais com sarna demodécica, com consequente diminuição na razão CD4+/CD8+ desses cães (OLIVEIRA et al., 2015), bem como valores reduzidos de CD4+ em animais com parasitismo intenso por *Leishmania chagasi* (GUERRA et al., 2009). Esses estudos demonstram que em situações de imunossupressão é esperado encontrar valores reduzidos de CD4+.

Alguns estudos realizaram a mensuração das subpopulações linfocitária em cães saudáveis para estabelecer valores de referência, porém encontram-se diferenças significativas na porcentagem fenotípica dos valores basais (Quadro 7). Essa divergência pode ocorrer devido às diferenças na raça, idade dos cães avaliados, utilização de diferentes protocolos para imunofenotipagem, incluído fonte e clones dos anticorpos monoclonais (FALDYNA et al., 2001; REIS et al., 2005). Sendo assim, é fundamental utilizar valores de grupos controles apropriados para cada experimento realizado (FALDYNA et al., 2001)

Quadro 7- Compilação de valores médios percentuais de CD4+, CD8+, razão CD4+/CD8+, CD14, CD21 obtidos após citometria de fluxo em cães saudáveis

Autor	CD4+ (%)	CD8+(%)	CD21(%)	CD14(%)	RAZÃO CD4+/CD8+
Chabanne et al., 1995 ^a	47,5±8,8	19,3±4	12,2±6		2,6±0,8

Byrne et al., 2000 ^b	45±8,3	28,8±5,6	12,9±3,9		1,87±0,48
Byrne et al., 2000 ^{bb}	41,7±9	28,6±10	15,4±3,9		
Faldyna et al., 2001 ^c	45,6±8,6	16,5±6,6	11,7±5,7		
Faldyna et al., 2001 ^{cc}	43,2±6,9	19,1±5,7	14,4±5,9		2,5±0,9
Fujiwara et al., 2005 ^d	29,84	43,39	14,61	8,87	1,24
Reis et al., 2005 ^e	44,6±5,3	28,9±8,7	10,1±3,7		1,7±0,6
Majewska et al., 2016 ^f	70,7±1,94	14,71±1,11	6,24±0,82		5,31±0,41

^a Estudo realizado com 20 cães da raça Pastor alemão com idade média de 5,5 anos

^b Estudo realizado com 28 cães da raça Beagle com 18 meses de idade

^{bb} Estudo realizado com 21 cães de várias raças com idade média de 3.7 anos

^c Estudo realizado com 12 cães da raça Beagle acima de um ano de idade

^{cc} Estudo realizado com 54 cães de diversas raças entre 1-5 anos de idade

^d Estudo realizado com 40 da raça Beagle com idade entre 8-12 meses.

^e Estudo realizado com 40 cães sem raça definida com idade entre 4 meses-6 anos de idade

^f Estudo realizado com oito cães de diversas raças

No entanto, há poucos estudos mensurando subpopulações linfocitárias em sangue periférico de cães atópicos com resultados divergentes e inconclusivos (Quadro 8). Os linfócitos regulam e estimulam o sistema imune e estão ativamente envolvidos na fase efetora da resposta imune. Dados recentes consideram que os subtipos linfocitários CD4+ e CD8+ contribuem para a imunopatogênese da doença, com produção de interleucinas e citocinas produzidas nesse ambiente inflamatório, como IFN- γ e IL-4 (SCHLOTTER et al., 2011; JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014; MCCANDLESS et al., 2014). Estudos realizados em humanos com dermatite atópica demonstraram aumento na razão CD4+/CD8+ com diminuição de CD8+ circulante (LEONARDI et al., 2007). Em cães com dermatite atópica, foi observada infiltração de linfócitos CD4+ e CD8+ na pele com produção de IL-13, IL-22 e interferon- γ (JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014). Por outro lado, observa-se em humanos, altas quantidades de células CD4+ expressando IL-4, e

baixa quantidade de células CD4+ expressando IFN- γ (FARRELL et al., 2001). A avaliação de subpopulações linfocitárias é algo recente e os resultados obtidos, com relação à mensuração de linfócitos CD4+ e CD8+ e expressão de citocinas pró-inflamatórias, apresentam divergência entre os estudos existentes, devendo ser melhor esclarecido. No entanto entende-se que alterações na razão CD4+/CD8+ indicam uma resposta imune específica anormal (BECCATI et al., 2016).

Quadro 8- Compilação de valores médios percentuais de CD4+, CD8+, razão CD4+/CD8+, CD21 obtidos após citometria de fluxo em cães com dermatite atópica canina

Autor	CD4 +(%)	CD8+(%)	CD21(%)	RAZÃO CD4/CD8
Taszkun, 2013 ^a	28,7 \pm 7,8	20,1 \pm 4,4	21,5 \pm 3,8	
Becatti et al., 2016 ^b				1,98 \pm 0,52
Majewska et al., 2016 ^c	67,40 \pm 2,01	19,56 \pm 0,87	3,81 \pm 0,68	3,86 \pm 0,33

^aEstudo realizado com cães com dermatite atópica canina associado à infecção bacteriana

^bEstudo realizado com 10 animais de diversas raças com idade média de 3.3 anos

^cEstudo realizado com 20 cães de diversas raças com idade média de 3.8 anos

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO IMUNOFENOTIPA DE LEUCÓCITOS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA

RESUMO

A dermatite atópica canina é uma doença inflamatória e crônica, em que linfócitos CD4+ e CD8+ participam ativamente de sua patogenia. Uma resposta imune mista do tipo 1 e do tipo 2 tem sido apresentada na dermatite atópica canina, assim como ocorre na humana. Sendo assim, a participação de citocinas como IFN- γ e IL-4 se tornam fundamentais. Objetivou-se com esse trabalho, caracterizar cães atópicos empregando-se a imunofenotipagem de leucócitos *ex vivo* e *in vitro*. Foram coletados 10 ml de sangue periférico de 13 animais com diagnóstico clínico de dermatite atópica canina, para análise *ex vivo* por citometria de fluxo de LTCD4+, LTCD8+, razão de LT CD4+/CD8+, monócitos CD14 e LBCD21. Em cinco desses animais foi realizado também estudo *in vitro*, em que se avaliou a expressão de citocinas intracelulares (IL-4 e IFN- γ) em LTCD4+ e LTCD8+ após estímulo antígeno específico com *Dermatophagoides farinae*. Para ambos os testes, sete animais sadios foram utilizados como controle. No estudo *ex vivo*, observaram-se valores significativamente maiores de LTCD4+, menores de LTCD8+ e monócitos CD14 e razão de LTCD4+/CD8+ maior nos animais atópicos. No estudo *in vitro*, a expressão de citocinas IL-4 e IFN- γ nos LTCD4+ e LTCD8+ foram significativamente maiores nos animais atópicos nas culturas com e sem estímulo. No grupo dos atópicos, somente foi visto valor significativamente maior, após estímulo, no parâmetro CD4+IFN- γ +. Conclui-se que há participação importante de linfócitos CD4+, CD8+, e das citocinas IFN- γ + e IL-4 + na patogênese da dermatite atópica canina com balanço pró-inflamatório para LTCD4+IFN- γ /IL-4 antígeno específico em cães atópicos e com isso caracterização da resposta Th1 e Th2.

Palavras-chave: citometria de fluxo, citocinas, subpopulações de linfócitos, alergia e imunologia.

1-INTRODUÇÃO

A dermatite atópica canina (DAC) é uma dermatose crônica e frequente nos cães. É definida como uma doença cutânea inflamatória e pruriginosa com predisposição genética cujas características clínicas estão associadas à produção de anticorpos IgE, principalmente contra alérgenos ambientais (HALLIWELL, 2006; OLIVRY et al., 2010). Dentre os alérgenos ambientais, os provenientes de ácaros da poeira, mormente o *Dermatophagoides farinae*, são os mais associados à precipitação de dermatite atópica em cães intradomiciliados (SHIDA et al., 2004; BOTONI et al., 2012). Os primeiros sinais clínicos da DAC geralmente aparecem entre seis meses e três anos de idade, e incluem prurido, principalmente nas regiões perilabial, periocular, parte interna do pavilhão auricular, flexura do cotovelo, carpo, tarso, interdigital, abdômen ventral, períneo e porção ventral da cauda (SARIDOMICHELAKIS; OLIVRY, 2016a).

A patogenia da dermatite atópica por muito tempo foi considerada como uma resposta imune direcionada para perfil linfocitário Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) e ativação de linfócitos B. Atualmente, tem-se verificado, especialmente na medicina humana um perfil de resposta bifásica, onde além da resposta Th2, bem descrita nas alergopatias, há também uma resposta Th1, com produção expressiva de IFN- γ , principalmente após estímulo crônico causando dano na pele devido à indução de apoptose do queratinócito (THEPEN et al., 1996; PUCHEU-HASTON et al., 2015a; MAJEWSKA et al., 2016). As lesões crônicas, clinicamente definidas por liquenificação e hiperpigmentação, são resultados da ativação mista entre o fenótipo Th-1 e Th-2 (JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014; PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

Dados recentes consideram que os subtipos linfocitários CD4+ e CD8+ contribuem para a imunopatogênese da doença, com produção de interleucinas e citocinas produzidas nesse ambiente inflamatório, como IFN- γ e IL-4 (SCHLOTTER et al., 2011; JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014; MCCANDLESS et al., 2014). Estudos realizados em humanos com dermatite atópica demonstraram aumento na razão CD4+/CD8+ com diminuição de CD8+ circulante (LEONARDI et al., 2007). No entanto, em animais atópicos os estudos ainda são escassos. Foram observados infiltração de linfócitos CD4+ e CD8+ na pele de cães atópicos com produção de IL-13, IL-22 e interferon- γ (JASSIES-VAN DER LEE et al., 2014). Por outro lado, observam-se em humanos, altas quantidade de células CD4+ expressando IL-4, e baixa quantidades de células CD4+ expressando IFN- γ (FARRELL et al., 2001). A citometria de fluxo é um dos métodos utilizados para mensuração da secreção de citocinas pelas células, e que possui a vantagem de identificar rapidamente a célula envolvida na secreção de determinada citocina (HORIUCHI et al., 2007). Assim, o presente estudo investigou as características imunofenotípicas *ex vivo* de leucócitos de cães atópicos e cães saudios e *in vitro* após estimulação antígeno com *Dermatophagoides farinae*, para demonstrar a expressão de citocinas IL-4 e IFN- γ pelas células CD4+ e CD8+.

2- MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG com o protocolo de número 57/2016 (Anexo 2). Foram utilizados 13 cães diagnosticados com DAC sem tratamento, atendidos e acompanhados no setor de dermatologia do Hospital Veterinário da EV-UFMG no período de 2016-2017. Sete cães saudáveis, sem qualquer alteração clínica, devidamente vermifugados e vacinados, provenientes do canil do instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, fizeram parte do grupo controle. Esses cães foram submetidos à exame físico e

perfil sanguíneo (hemograma, perfil sérico renal, hepático e de proteínas totais), além da imunofenotipagem dos leucócitos.

Todos os tutores assinaram termo de anuência, autorizando a participação dos animais no experimento (Anexo 3).

2.1- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO AVALIADA

Foram utilizados 13 cães atópicos, de diversas raças, acima de 12 meses de idade, desprovidos de quadros infecciosos graves e/ou neoplasias, diagnosticados com dermatite atópica advindos da região metropolitana de Belo Horizonte (MG). O diagnóstico foi baseado no histórico e nos sinais clínicos característicos de acordo com os critérios de Favrot et al. (2010), associado à eliminação por exclusão de outras dermatopatias pruriginosas que a poderiam mimetizar, inclusive com dieta hipoalergênica por no mínimo dois meses. Pacientes que estavam sendo medicados com outras drogas (corticosteroides ou ciclosporina) foram incluídos apenas após 30 dias da retirada desses fármacos. Outros sete animais, saudáveis, sem raça determinada, acima de 12 meses de idade, desprovidos de quadros infecciosos e/ou neoplásicos, devidamente vermifugados e vacinados, provenientes do canil do ICB/UFMG fizeram parte do grupo controle.

2.2- IMUNOFENOTIPAGEM DOS LEUCÓCITOS

Sangue periférico foi coletado da veia jugular em tubos contendo heparina sódica para realização da imunofenotipagem leucocitária por citometria de fluxo. Essa técnica foi utilizada para duas avaliações distintas. 1) avaliação *ex vivo*, proporcionando os subtipos de linfócitos CD4+, CD8+, CD21+ e monócitos CD14+; 2) avaliação *in vitro* por meio de cultura celular e avaliação das citocinas (IL-4 e IFN- γ) produzidas pelos subtipos linfocitários (CD4+ e CD8+) após estímulo antigênico com *D. farinae*.

2.2.1- Avaliação *ex vivo*

Foram coletados 5 ml de sangue periférico total em tubo contendo heparina sódica. Em três tubos de poliestireno (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) foram transferidos 50 μ L de sangue e adicionados (tubo 1) 2,5 μ L do anticorpo anti-cão CD3-FITC/ CD4-PE/ CD8-AlexaFluor 647 e (tubo 2) 20 μ L de anticorpo anti-humano CD14-AlexaFluor 647 + 1 μ L de anticorpo anti-cão CD21-PE. No terceiro tubo (tubo 3) não foi adicionado anticorpo. Após a adição do sangue as amostras foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após a incubação as amostras foram submetidas ao processo de lise osmótica de eritrócitos com 3 ml de *Billing dog* (2,85g de citrato de sódio, 54ml de formaldeído, 30ml de dietilenoglicol, 400 μ L de heparina com concentração de 5000UI/ml e 100ml de água destilada) por 10 minutos. Posteriormente as células foram submetidas a centrifugação (1300 rpm, 18°C por sete minutos) e o sobrenadante removido. Em sequência as amostras foram lavadas duas vezes com PBS-W (PBS com 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica, pH 7,2), 1300rpm, 18°C por sete minutos. Ao *pellet* obtido, foram adicionados 100 μ L de solução fixadora (Facs Lysing Solution – BD Bioscience). Para aquisição dos dados foram obtidos 30.000 eventos totais, para os tubos contendo LTCD3+, LTCD4+ e LTCD8+, e para o tubo contendo monócitos CD14+ e LTCD21+, 5.000 eventos no gate de CD14+, utilizando o citômetro de fluxo FACSCantoII™-BD, pelo software DIVA™.

Para a análise dos dados foi utilizado o software FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software, versão 7.6.1).

As porcentagens de CD4+, CD8+ e CD21+ foram determinadas em linfócitos e CD14 em monócitos pela seleção de uma janela (“gate”), baseado nos aspectos morfométricos de tamanho (FSC- “*Forward scatter*”) e granulosidade (SSC-“*Side scatter*”) (Figura 1a). Após, selecionou-se em um novo “*gate*”, LTCD3+, que representa linfócitos T totais, em gráfico de densidade de fluorescência-1 (CD3 FITC-A) *versus* granulosidade (SSC) (Figura 1b). Logo em seguida, definiu-se a porcentagem da população de LTCD4+ e LTCD8+ em quadrantes, no gráfico de densidade de fluorescência-2 (CD4 Pe-A) *versus* densidade de fluorescência-3 (CD8 APC-A). O primeiro quadrante Q1 representa os linfócitos com marcação positiva para CD8+, já o quadrante Q3, representa os linfócitos positivos para CD4 (Figura 1c). Marcadores para linfócitos CD21 e monócitos (CD14) foram colocados em outro tubo para análise. Inicialmente selecionaram-se os linfócitos por um gate baseado nos aspectos morfométricos de tamanho (FSC- “*Forward scatter*”) e granulosidade (SSC-“*Side scatter*”) (Figura 1d). Seguiu-se com a seleção de um gate para CD21, em gráfico de densidade de fluorescência-2 (CD21 Pe-A) *versus* granulosidade (SSC) (Figura 1e). Para a mensuração de monócitos CD14, selecionou-se um gate no gráfico de densidade de fluorescência-3 (CD14 APC-A) por granulosidade (SSC) (Figura 1f)

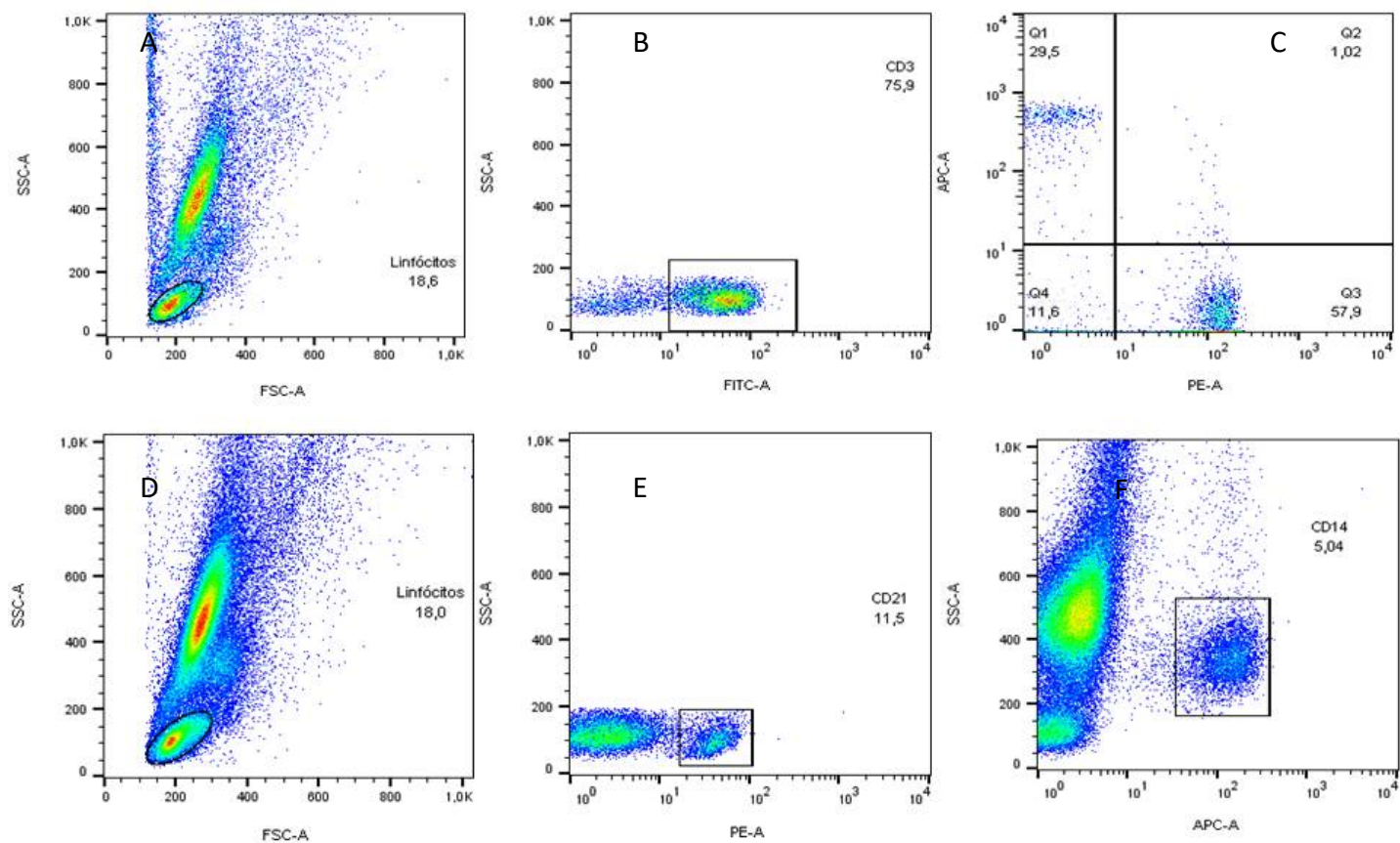


Figura 1- Representação sequencial para determinação de subpopulações linfocitárias e de monócitos em cães com dermatite atópica canina. A) Figura que representa o tamanho (FSC- “*Forward scatter*”) e granulosidade (SSC-“*Side scatter*”) para seleção de linfócitos totais. B) Figura que representa a densidade de fluorescência-1 (CD3 FITC-A) *versus* granulosidade (SSC) para determinar linfócitos marcados. C) Figura que representa a densidade de fluorescência-2 (CD4 Pe-A) *versus* densidade de fluorescência-3 (CD8 APC-A). O primeiro quadrante (Q1) representa os linfócitos com marcação positiva para CD8, já o quadrante Q3, representa os linfócitos positivos para CD4. D) Figura que representa o tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) para seleção de população linfocitária. E) Figura que representa a densidade de fluorescência-2 (CD21 Pe-A) *versus* granulosidade (SSC), para determinação de percentual de linfócitos CD21. F) Figura que representa a densidade de fluorescência-3 (CD14 APC-A) por granulosidade (SSC) para determinar percentual da população de monócitos.

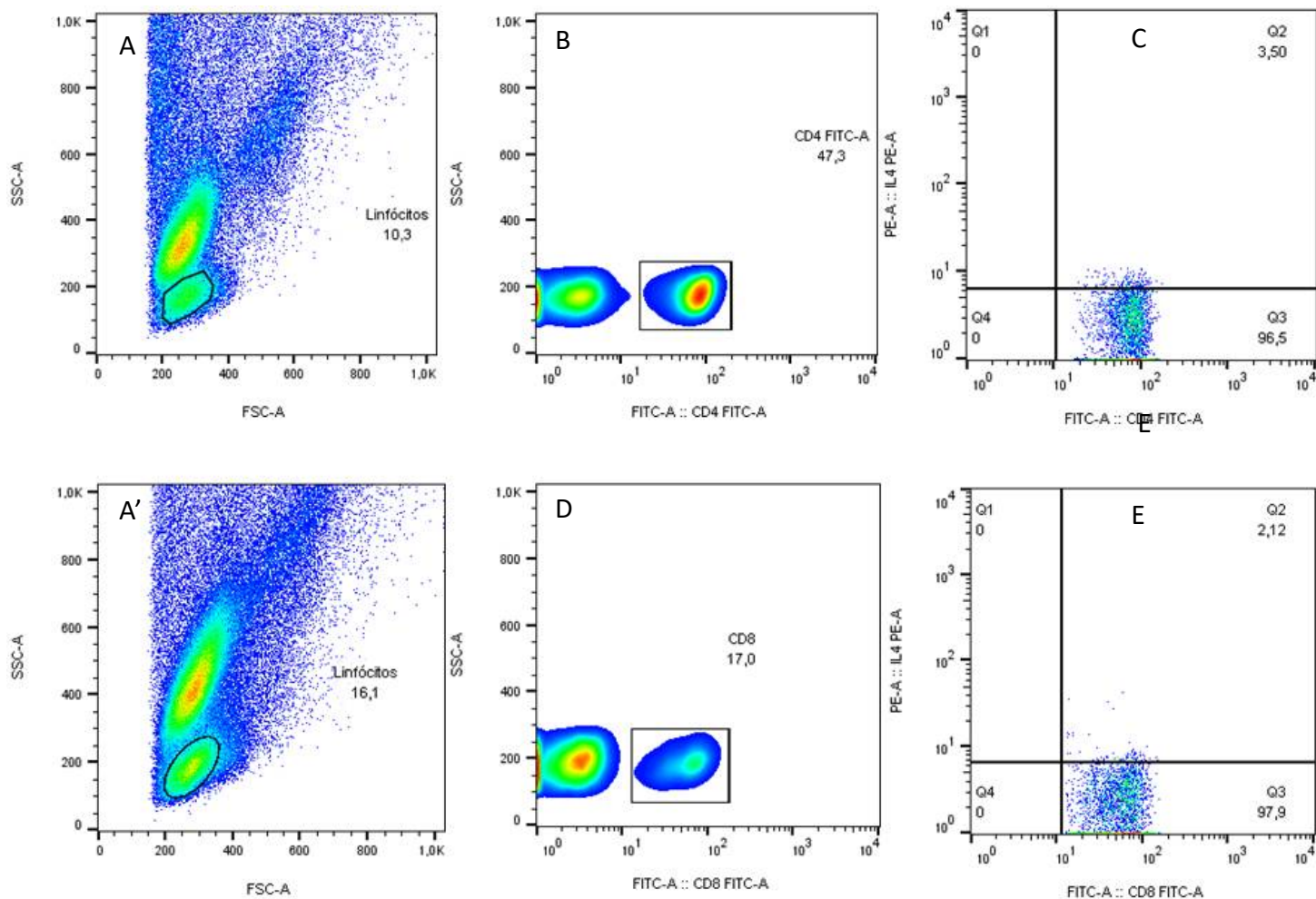
2.2.2- Avaliação *in vitro*

Foram coletados cinco ml de sangue periférico total em tubo contendo heparina sódica de cinco animais atópicos e sete animais controle. Para realizar as culturas, utilizou-se sangue total. A partir do número de leucócitos totais obtidos no hemograma, foram calculados a quantidade necessária do sangue total, para obtenção de preparação celular de 1×10^7 leucócitos/ml em tubos de polipropileno de 14 mL. Ao sangue, foi adicionado RPMI suplementado (10% de SFB inativado, L-glutamina 2mM, penicilina G 100 U/mL, pH 7,2) para volume total de 2 mL. As culturas foram divididas em: (1) sem estímulos; (2) contendo phorbol myristate acetate (PMA; 25 ng/mL) e ionomycin (1 μ g/mL) e (3) contendo antígenos de *D. farinae* (25 ng/mL), a todos os tubos foram adicionados 20 μ L de Brefeldina A. As amostras foram incubadas por 4 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L o ácido etilenodiaminotetracético – EDTA (Sigma, St Louis, USA) em concentração final de 2 mM. As amostras foram mantidas por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, acrescentou-se 3ml de PBS-W e centrifugação a 1300 rpm, 18°C por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado por aspiração com bomba a vácuo, o *pellet* foi ressuscitado e completo para 1,0 mL com PBS-W, 100 μ L da suspensão celular foram transferidos para os tubos de poliestireno de 5 mL correspondentes a cada condição de cultura, contendo anticorpos específicos para as populações celulares de interesse. Incubou-se por 30 minutos, a temperatura ambiente ao abrigo da luz e, submeteu-se ao processo de lise osmótica de eritrócitos com 3 ml de *Billing dog* por 10 minutos. Posteriormente as células foram submetidas a centrifugação (1300 rpm, 18°C por sete minutos) e o sobrenadante removido. Em sequência as amostras foram lavadas com PBS-W, 1300 rpm, 18°C por sete minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuscitado em 500 μ L de PBS-W e 3mL de PBS-P (PBS-W com 0,5% de saponina). Os tubos foram tampados e homogeneizados 10 vezes por inversão. Após centrifugação (1300 rpm, 18°C por sete minutos) e retirada de sobrenadante, foram adicionados 20 μ L de anticorpo anti-citocina (IL4-PE e IFN- γ -FITC) e incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente as amostras foram lavadas com PBS-W, 1300 rpm, 18°C por sete minutos. Ao *pellet* obtido, foram adicionados 100 μ L de solução fixadora. Para aquisição dos dados foram obtidos 30.000 eventos totais utilizando o citômetro de fluxo FACSCanthonII™-BD, pelo *software* DIVA™. Para a análise dos dados foi utilizado o *software* FlowJo (*Flow Cytometry Analysis Software*, versão 7.6.1)

A porcentagem de linfócitos CD4+ e CD8+ produtores de IL-4 e IFN- γ foi definida seguindo uma análise estratégica padrão. Para mensuração de IL-4 produzida, identificou-se os linfócitos por um “*gate*” no gráfico de tamanho (FSC) por granulocidade (SSC) (Figura 2a e 2a’). Após, selecionou-se em um novo “*gate*”, LTCD4+ (Figura 2b) ou LTCD8+ (Figura 2d), dependendo do tubo avaliado em um gráfico de densidade de fluorescência-1 (CD4 FITC-A ou CD8 FITC-A). Na sequência, definiu-se a porcentagem de LTCD4+ (Figura 2c) ou LTCD8+ (Figura 2e) produtores de IL-4 em quadrantes no gráfico de densidade de fluorescência-1 (CD4 FITC-A ou CD8 FITC-A) *versus* densidade de fluorescência-2 (IL-4 Pe-A). O quadrante 2 (Q2) representa

marcação dupla para LTCD4⁺ ou LTCD8⁺ e IL-4, portanto, representa as subpopulações linfocitárias produtoras dessa interleucina.

Figura 2- Representação sequencial para determinação de produção de IL-4 por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em cães com dermatite atópica canina. A e A') Figura que representa o tamanho (FSC- "Forward scatter") e granulosidade (SSC- "Side scatter") para seleção de linfócitos totais. B) Figura que representa a densidade de fluorescência-1 (CD4 FITC-A) versus granulosidade (SSC) para determinar LTCD4⁺ marcados. C) Figura que representa a densidade de fluorescência-1 (CD4+ FITC-A) versus densidade de fluorescência-

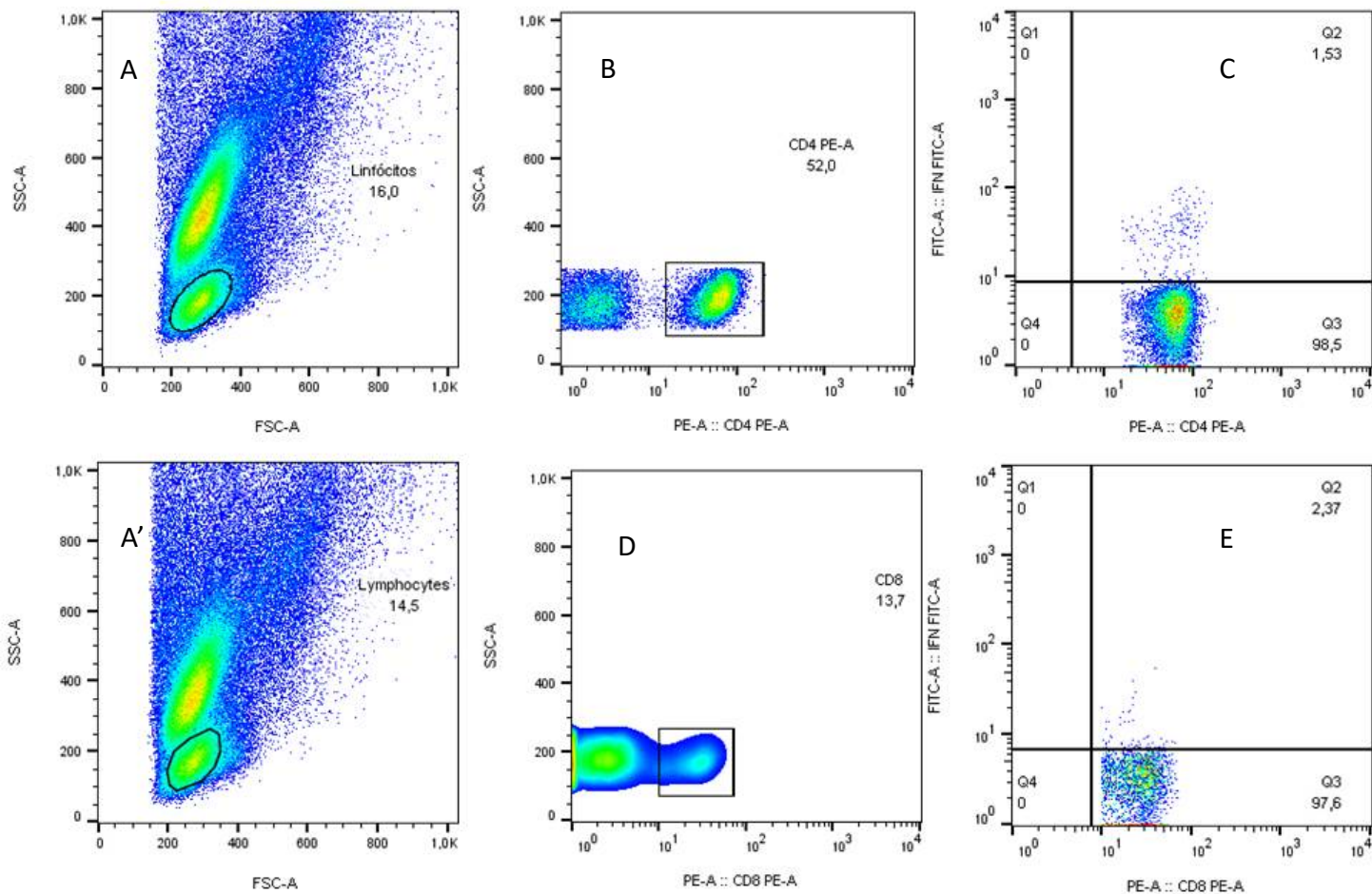


2 (IL-4 Pe-A). O segundo quadrante (Q2) representa marcação positiva dupla, e representa as células CD4⁺ produtoras de IL-4. D) Figura que representa a densidade de fluorescência-1 (CD8⁺ FITC-A) versus granulosidade (SSC) para determinar LTCD8⁺ marcados. E) Figura que representa a densidade de fluorescência-1 (CD8⁺ FITC-A) versus densidade de fluorescência-2 (IL-4 Pe-A). O segundo quadrante (Q2) representa marcação positiva dupla, e representa os LTCD8⁺ produtores de IL-4.

Para mensuração de IFN- γ produzido, identificaram-se os linfócitos por um "gate" no gráfico de tamanho (FSC) por granulosidade (SSC) (Figura 3a e Figura 3a'). Após, selecionou-se em um novo "gate", LTCD4⁺ (Figura 3b) ou LTCD8⁺ (Figura 3d), dependendo do tubo avaliado em um

gráfico de densidade de fluorescência-1 (CD4+ FITC-A ou CD8+ FITC-A). Na sequência, definiu-se a porcentagem de LTCD4+ (Figura 3c) ou LTCD8+ (Figura 3e) produtores de IL-4 em quadrantes no gráfico de densidade de fluorescência-1(CD4+ FITC-A ou CD8+ FITC-A) *versus* densidade de fluorescência-2 (IL-4 Pe-A). O quadrante 2 (Q2) representa marcação dupla para LTCD4+ ou LTCD8+ e IL-4, portanto, representa as subpopulações linfocitárias produtoras dessa interleucina.

Figura 3- Representação sequencial para determinação de produção de interferon gama (IFN- γ) por



LTCD4+ e LTCD8+ em cães com dermatite atópica canina.

A e A') Figura que representa o tamanho (FSC- "Forward scatter") e granulosidade (SSC- "Side scatter") para seleção de linfócitos totais. B) Figura que representa a densidade de fluorescência-1 (CD4 Pe-A) versus granulosidade (SSC) para determinar LTCD4+ marcados. C) Figura que representa a densidade de fluorescência-1 (CD4 Pe-A) versus densidade de fluorescência-2 (IFN- γ FITC-A). O segundo quadrante (Q2) representa marcação positiva dupla, e representa os LTCD4+ produtores de IFN- γ . D) Figura que representa a densidade de fluorescência-1 (CD8 Pe-A) versus granulosidade (SSC) para determinar LTCD8+ marcados. E) Figura que representa a densidade de fluorescência-1 (CD8 Pe-A) versus densidade de fluorescência-2 (IFN- γ FITC-A). O segundo quadrante (Q2) representa marcação positiva dupla, e representa LTCD8+ produtores de IFN- γ .

2.3- MENSURAÇÃO SÉRICA DE IgE TOTAL

Em 10 dos cães com dermatite atópica, realizou-se a mensuração de IgE total por ELISA com a metodologia de quimioluminescência. As amostras foram enviadas em duplicata para o laboratório TECSA®, tecnologia em sanidade animal (Belo Horizonte, MG).

2.4- ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software utilizado na análise estatística foi o R (versão 3.3.2).

Para comparar o grupo de cães atópicos e cães saudáveis foi utilizado o Teste de Mann-Whitney (HOLLANDER e WOLFE, 1999), após verificação de normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO AVALIADA

Foram selecionados 13 animais com DAC, sete machos e seis fêmeas. Destes, cinco eram da raça Shih-tzu (38,4%), dois sem raça definida (SRD) (15,38%) e um representante das raças: Maltês, Buldogue Inglês, Buldogue Francês, Pequinês, Schnauzer e Poodle, o que representa uma porcentagem de 7,69% da população avaliada. A porcentagem maior da raça Shih-Tzu se deve provavelmente a alta incidência de dermatite atópica nessa raça, associada à presença massiva dessa raça em grandes centros urbanos como Belo Horizonte (MG). Para o grupo controle, sete animais sem raça definida, três machos e quatro fêmeas foram selecionados, com idade entre três e seis anos.

3.2- IMUNOFENOTIPAGEM DOS LEUCÓCITOS

3.2.1- Avaliação *ex vivo*

Observaram-se valores significativamente maiores de CD4+ ($p=0,002$) e menores de CD8+ ($p=0,002$) (Figura 4) nos animais com dermatite atópica canina. Essa diferença refletiu na razão entre CD4+/CD8+, na qual os valores foram significativamente maiores nos cães com dermatite atópica ($p=0,000$) (Tabela 1). Observação similar foi verificada em estudo com 16 animais atópicos, no qual a razão CD4+/CD8+ foi de 2.92 (TARPATAKI et al., 2012), e um estudo humano, que demonstrou aumento da razão CD4+/CD8+ no sangue, principalmente por valores baixos de CD8+ em crianças com dermatite atópica (LEONARDI et al., 2007). Diferentemente, Beccati et al. (2016) não verificaram alteração significativa na razão CD4+/CD8+ entre cães atópicos e cães saudáveis e, Majewska et al. (2016) relataram quantidades similares de CD4+ e maior de CD8+ nos animais atópicos, quando comparados aos animais saudáveis. Os poucos estudos que mensuraram subpopulações linfocitárias em sangue periférico de cães atópicos tem

resultados divergentes e, portanto, inconclusivos. Com os resultados obtidos, sugere-se que alterações na subpopulação linfocitária no sangue periférico de animais atópicos representam um marcador de resposta inflamatória. Aumento na população de CD4+ no sangue é esperado, já que há um envolvimento importante das citocinas pró-inflamatórias produzidas por esse tipo celular, na patogênese da doença. O decréscimo de CD8+ pode indicar infiltração intensa desse subtipo linfocítico na pele de animais atópicos. De fato, foi observado por Jassies-van der Lee et al. (2014), uma relação CD4+/CD8+ menor que um na pele dos animais estudados. Além disso, observou-se que a infiltração de linfócitos CD8+ é essencial para o desenvolvimento das lesões inflamatórias características de dermatite atópica em ratos e humanos (HENNINO et al., 2007; HENNINO et al., 2011).

Não existem estudos mensurando a porcentagem de CD14 no sangue, um marcador específico de membrana de monócitos. Observou-se que animais com dermatite atópica possuem valores significativamente reduzidos ($p=0,009$), quando comparados aos animais saudáveis (Tabela 1). Isso pode indicar uma infiltração dessas células na pele dos animais. O padrão inflamatório cutâneo consiste de uma dermatite perivascular superficial a mononuclear intersticial (BIZIKOVA et al., 2015b). Apesar de os macrófagos não serem encontrados frequentemente em histopatologia de pele de animais atópicos, sabe-se que são células inflamatórias importantes nos processos crônicos, assim como é caracterizada a atopia (HOSGOOD, 2003).

Não foram observados valores significativamente diferentes estatisticamente de CD21 entre cães atópicos e saudáveis ($p=0,812$) (Tabela 1). Há escassos trabalhos comparando CD21 de cães com dermatite atópica e cães saudáveis. Valores similares ao desse estudo, foram observados por Tazkun, (2013) em cães com dermatite atópica. No entanto, Majewska et al. (2016), verificaram valores significativamente menores de linfócitos B em cães atópicos, quando comparados à cães saudáveis. O CD21 é um marcador de linfócitos B maduros que participam da patogênese da dermatite atópica por meio da produção de IgE alérgeno específico, após a sua diferenciação em plasmócitos (MARSELLA et al., 2012). Aumento de CD21 pode ser esperado, principalmente na fase de sensibilização. O estudo contemplou animais cronicamente afetados, em que os linfócitos T provavelmente tem maior participação.

Tabela 1- Comparação dos valores médios da imunofenotipagem *ex vivo* em sete cães saudáveis (controle) e treze cães com dermatite atópica canina

Variáveis	Grupo	Média	E.P	1° Q	2° Q	3° Q	Valor-P ¹
CD4+ (%)	Atópicos	52,4	3,29	42,4	53,0	58,6	0,002
	Controle	29,1	3,24	27,7	31,6	32,8	
CD8+ (%)	Atópicos	22,5	2,51	16,0	25,8	29,2	0,002
	Controle	47,4	6,34	35,6	46,8	51,1	
CD4/CD8 (%)	Atópicos	2,71	0,32	1,84	2,56	3,31	0,000
	Controle	0,71	0,12	0,54	0,84	0,91	
CD21 (%)	Atópicos	15,5	2,16	8,23	18,0	19,9	0,812
	Controle	18,2	4,20	10,6	15,0	28,2	
CD14 (%)	Atópicos	2,53	0,42	1,06	2,83	3,50	0,009

1- Teste de Mann-Whitney

E.P.- erro padrão; 1°Q= 1° quartil- Medida de posição que representa que pelo menos 25% das amostras são menores que ele; 2°Q= 2° quartil- Medida de posição que representa que pelo menos 50% das amostras são menores que ele; 3°Q= 3° quartil- Medida de posição que representa que pelo menos 75% das amostras são menores que ele. Valor de $p < 0,05$ indica dados estatisticamente significativos.

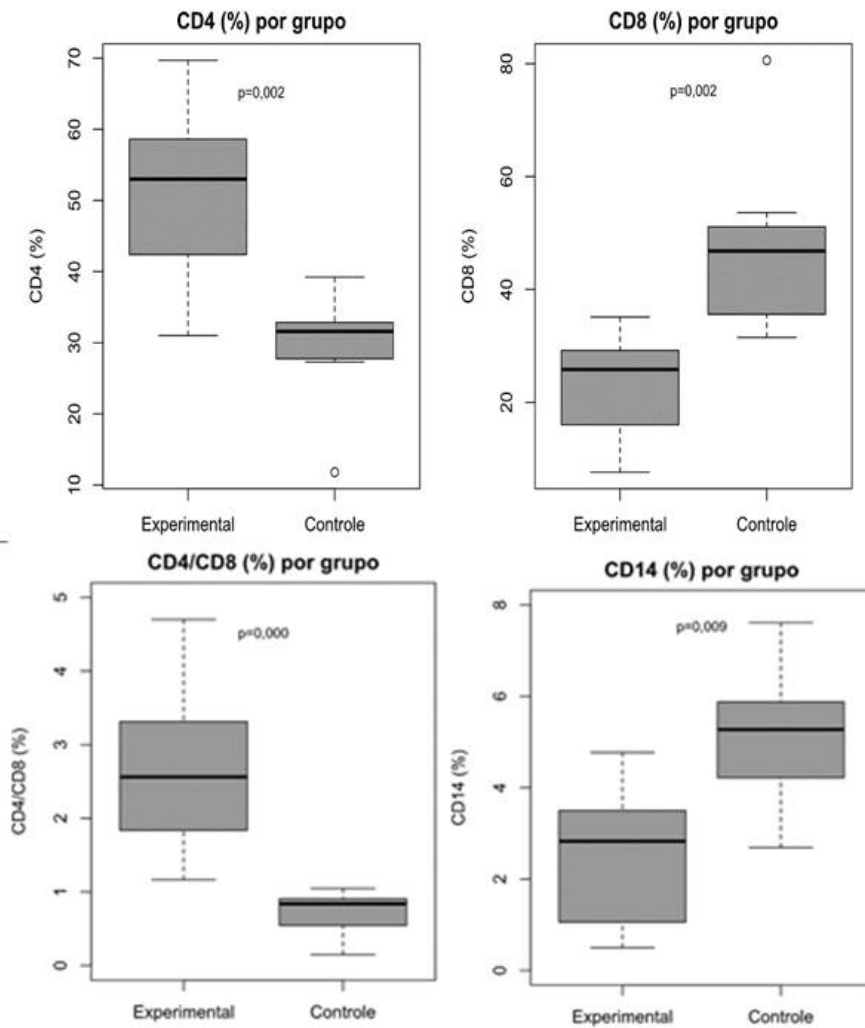


Figura 4- Representação comparativa dos valores médios da imunofenotipagem *ex vivo* de leucócitos entre cães com dermatite atópica canina (grupo experimental) e cães saudáveis (grupo controle). Os dados foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. O valor de $p < 0,05$ indica dados estatisticamente significativos.

3.2.2- Avaliação *in-vitro*

No presente estudo, identificaram-se valores maiores, estatisticamente significativos da produção de IFN- γ e IL-4 pelas subpopulações linfocitárias CD4+ e CD8+ dos animais atópicos quando comparados aos animais do grupo controle (Tabela 2). Quando se comparou a cultura de células de animais atópicos com estímulo antígeno específico e a cultura de células de animais atópicos sem estímulo antígeno específico, observou-se maior produção de IFN γ pelas células CD4+ após estímulo com o *D. farinae*, caracterizando um perfil inflamatório da própria doença (Tabela 2). A análise de citocinas intracelulares foi bem estabelecida em cães saudáveis (HORIUCHI et al., 2007). Possui a vantagem de ser uma avaliação rápida e identificar a fonte celular produtora de determinada citocina (FARRELL et al., 2001). No entanto, nenhum estudo havia avaliado o perfil de citocinas intracelulares de cães com dermatite atópica.

Tabela 2- Comparação dos valores médios da imunofenotipagem *in vitro* de sete cães saudáveis (controle) e 13 cães com dermatite atópica canina (atópicos)

Variáveis	Grupo	Média	E.P	1° Q	2° Q	3° Q	Valor-P ¹	
CD4+ IFN- γ +	CC	Atópicos ^a	9,61	1,02	9,96	10,1	10,7	0,015
		Controle	3,66	0,78	2,19	3,55	4,83	
	Ag	Atópicos ^b	12,5	1,68	11,3	13,4	15,2	0,015
		Controle	3,59	1,05	1,83	1,96	5,27	
CD4+ IL4+	CC	Atópicos	2,29	0,65	1,49	1,57	3,78	0,023
		Controle	0,76	0,09	0,61	0,65	0,98	
	Ag	Atópicos	2,98	0,97	1,31	2,66	5,17	0,074
		Controle	0,81	0,13	0,58	0,65	1,12	
CD8 +IFN- γ +	CC	Atópicos	4,72	1,54	2,14	4,89	4,93	0,006
		Controle	0,71	0,14	0,42	0,75	0,93	
	Ag	Atópicos	6,20	1,78	4,67	4,86	9,48	0,009
		Controle	0,74	0,12	0,48	0,66	0,95	
CD8+ IL-4+	CC	Atópicos	2,98	1,09	0,85	3,28	3,30	0,035
		Controle	0,76	0,22	0,40	0,65	0,87	
	Ag	Atópicos	2,84	1,04	1,68	1,89	3,78	0,074
		Controle	0,70	0,12	0,46	0,61	0,94	

1- Teste de Mann-Whitney

E.P- erro padrão; 1°Q= 1° quartil- Medida de posição que representa que pelo menos 25% das amostras são menores que ele; 2°Q= 2° quartil- Medida de posição que representa que pelo menos 50% das amostras são menores que ele; 3°Q= 3° quartil- Medida de posição que representa que pelo menos 75% das amostras são menores que ele. CC= cultura sem estímulo; Ag= cultura com estímulo antígeno específico (*Dermatophagoides farinae*). Valor de $p < 0,05$ indica dados estatisticamente significativos. Letras minúsculas (a,b) diferentes indicam diferença estatística entre as culturas sem estímulo e com estímulo antígeno específico.

Avaliar o perfil de citocinas chaves das respostas Th1 e Th2 associadas às células efetoras da dermatite atópica canina é importante para discorrer sobre a imunopatogênese dessa doença. O

presente estudo indicou que os linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ de animais atópicos produzem quantidades significativamente maiores de IL-4 e IFN- γ quando comparadas aos animais do grupo controle. Pelo que se conhece na literatura veterinária atual, nenhum estudo ainda aferiu citocinas intracitoplasmáticas em células CD4⁺ e CD8⁺ na circulação periférica de cães com dermatite atópica canina. Jassies Van Der Lee et al. (2014) observaram que as subpopulações linfocitárias CD4⁺ e CD8⁺ de pele lesionada e não lesionada de cães atópicos foram capazes de expressar grande quantidade de IL-13, IL-22 e IFN- γ após estimulação com mitógeno específico. Estudos em humanos com dermatite atópica observam maior produção de IL-4 e menor produção de IFN- γ em células CD4⁺ circulantes de pessoas atópicas, em relação à pessoas sem a doença (FARRELL et al., 2001; OKAZAKI et al., 2002). Porém quando essas citocinas são avaliadas no soro de animais, observam-se alguns resultados diferentes e contraditórios. McCandless et al., (2014) relatam aumento de IFN- γ , após sensibilização crônica de cães atópicos com ácaro da poeira e concentrações de IL-4 elevadas durante o período de sensibilização. Um estudo mensurou a quantidade de RNA de IFN- γ e de IL-4 em cultura de cães atópicos quatro horas após estímulo com várias concentrações de ácaro de poeira. Observaram níveis de RNA menores de IL-4 e IFN- γ nos animais atópicos quando comparados aos saudáveis (SHIDA et al., 2004).

Sabe-se que a IL-4 é a principal citocina produzida pelo perfil linfocitário Th2, na qual participa o linfócito CD4⁺, reguladora da produção de IgE, e com isso é esperado a maior produção dessas em quadros alérgicos. Já o IFN- γ é considerado a citocina chave da resposta Th1. As lesões crônicas, clinicamente definidas por liquenificação e hiperpigmentação, são resultados da ativação dessa resposta (HAMID et al, 1994; THEPEN et al., 1996). Esse estudo avaliou animais afetados cronicamente pela dermatite atópica, sendo assim os valores maiores de IFN- γ tanto em CD4⁺ como em CD8⁺ são compatíveis com o quadro inflamatório crônico. Esses resultados indicam a participação conjunta e sem predominância do perfil Th1 e Th2 na DAC.

3.3-MENSURAÇÃO DE IgE TOTAL

Em todas as análises realizadas o resultado obtido foi inferior a 2,0 U.I/ml (valor de referência = 0 a 87 UI/ml), sendo considerada uma mensuração muito baixa, compatível com animais saudáveis. O anticorpo IgE participa da patogênese da dermatite atópica e é considerado o principal anticorpo produzido durante as respostas alérgicas. O papel da IgE na patogenia da DAC já é bem documentado, no entanto, IgE alérgeno-específicas podem ser encontradas mesmo em animais saudáveis (PUCHEU-HASTON et al., 2016). Além disso, animais atópicos podem não ter IgE alérgeno-específicas circulantes ou na pele, portanto a sua mensuração não auxilia na discriminação entre cães atópicos e cães saudáveis (HILL et al. 1995; HILL e DEBOER, 2001; MILLER et al., 2013). Ressalta-se que, alteração nos níveis de IgE sérico total em cães não tem relevância clínica (PUCHEU-HASTON, 2016). Os cães com sinais clínicos compatíveis com dermatite atópica, porém sem IgE alérgeno específico identificáveis são atualmente definidos com dermatite atópica *símile* (HALLIWELL ET AL., 2006).

CONCLUSÕES

- 1- A avaliação comparativa da imunofenotipagem de leucócitos na circulação sanguínea de animais saudáveis e animais atópicos, demonstrou que os subtipos linfocitários CD4+ e CD8+ e monócitos CD14+ são importantes para a patogênese da DAC.
- 2- A expressão aumentada das citocinas IL-4 e IFN- γ em ambos os subtipos linfocitários CD4+ e CD8+ nos animais com dermatite atópica, mesmo sem estímulo antigênico corroboram uma resposta imune mista do tipo 1 e tipo 2.
- 3- A ausência de alteração nos linfócitos CD21+ em cães com dermatite atópica, quando comparados aos cães saudáveis, associada à ausência de mensuração significativa de IgE total, demonstra que a patogênese da dermatite atópica não é direcionada somente ao perfil Th2, e talvez seja interessante pensar na atualização da definição da dermatite atópica estabelecida por Haliwell em 2006

CAPÍTULO 3

AValiação da Eficácia e dos Efeitos Tóxicos do Maleato de Oclacitinib no Controle da Dermatite Atópica Canina

RESUMO

A DAC é uma doença crônica, frequente nos cães, em que estão envolvidas interações complexas e multifatoriais como alterações imunológicas, disfunção da barreira cutânea e interações neuroimunes que, associados, produzem uma desordem de hipersensibilidade aos alérgenos ambientais. Há uma variedade de terapias propostas que reduzem a inflamação e o prurido com eficácia comprovada, porém com efeitos colaterais desafiadores, como ocorre com o uso de corticosteroides. Dentro das novas abordagens terapêuticas se destacam o uso de fármacos que atuem na inibição seletiva de mediadores pró-inflamatórios associados ao curso da DAC como os inibidores seletivos de Janus quinase, representado pelo maleato de oclacitinib. No entanto, os efeitos tóxicos, principalmente sobre a imunocompetência, após o uso crônico destes inidores, precisam ser melhor estudados. Assim, o objetivo desse estudo é comprovar a eficácia do maleato de oclacitinib e determinar os possíveis efeitos tóxicos com o seu uso crônico em cães. Foram selecionados treze cães após o diagnóstico de dermatite atópica canina. Estes animais foram tratados com 0,4-0,6mg/kg por via oral de maleato de oclacitinib a cada 12 horas por 14 dias, seguido de 0,4-0,6mg/kg por via oral a cada vinte e quatro horas por 12 meses. O acompanhamento foi feito por exame físico, com o auxílio de escalas para monitorar o prurido e documentação da inflamação e lesões cutâneas. Além disso, foram coletadas amostras de sangue periférico para realização de exames hematológicos, bioquímicos e citometria de fluxo para avaliação *ex vivo* de sub-tipos de linfócitos. Em 5 desses animais foi realizado um estudo *in vitro* em que se avaliou as citocinas intracelulares (IL-4 e IFN- γ) antígeno específicas em LTCD4+ e LTCD8+. Observou-se que o maleato de oclacitinib reduziu significativamente o prurido dos cães ($p=0,05$) e as lesões cutâneas avaliadas ($p=0,00$), demonstrando eficácia rápida, já nos primeiros 14 dias e prolongada do fármaco. Os valores médios de hemograma e bioquímica mantiveram-se dentro dos padrões de referência, com algumas variações individuais. A análise celular por citometria de fluxo indicou um aumento significativo de CD4+ ($p=0.002$) e CD14 ($p=0.001$) e comportamento razoavelmente constante da relação CD4+/CD8+ durante o curso de tratamento. Esses resultados inéditos são indício de que o maleato de oclacitinib, na dose recomendada em bula, não ocasiona imunossupressão à longo prazo e, portanto, pode ser utilizado de forma frequente e segura no controle da DAC por 12 meses. Não se observou efeito significativo do maleato de oclacitinib nos valores de citocinas IL-4 e IFN- γ , produzidas pelos CD4+ e CD8+, dosadas após cultura celular. Esse estudo corrobora que a principal ação do fármaco é na inibição da sinalização das citocinas e não em sua produção.

Palavras-Chave: tratamento farmacológico, toxicidade crônica, Janus quinases, citometria de fluxo, subpopulações de linfócitos, alergia e imunologia

1-INTRODUÇÃO

A dermatite atópica é uma dermatopatia inflamatória crônica que acomete cerca de 10% da população canina mundial (MILLER et al., 2013). O principal sinal clínico observado é o prurido, muitas vezes intenso, e que geralmente tem efeito significativo na qualidade de vida dos animais e de seus tutores. Seu diagnóstico presuntivo é clínico e baseado no histórico e sinais clínicos característicos, associado à exclusão de outras dermatopatias pruriginosas que a poderiam mimetizar (HENSEL et al., 2015). Atualmente recomenda-se uma abordagem multifacetada para o tratamento da dermatite atópica em cães, já que é uma doença multifatorial que envolve interações complexas entre alterações imunológicas, disfunção da barreira cutânea e interações neuroimunes à fatores extrínseco ambientais (SINKE et al., 2002; OLIVRY et al., 2010a; GONZALES et al., 2013).

A gravidade do prurido e das lesões tegumentares podem ser controladas por meio do controle da disbiose, recuperação da barreira tegumentar e do controle da inflamação e do prurido com a utilização de fármacos sistêmicos antiinflamatórios e imunomoduladores. Podem ser utilizados os corticoesteroides, os inibidores de calcineurina e o maleato de oclacitinib, em associação ou não à dessensibilização com a utilização de imunoterapia alérgeno específica (ITAE) (OLIVRY et al., 2010a; SHAW, 2013; COSGROVE et al., 2015; SARIDOMICHELAKIS; OLIVRY, 2016a).

O maleato de oclacitinib é um fármaco que atua sobre as enzimas Janus quinase 1 e inibe a atividade de diversas citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e IL-6), pró-alérgicas (IL-4, IL-13) e pruritogênicas (IL-31) (YAMAOKA et al., 2004; GONZALES et al., 2014). A sua eficácia em reduzir o prurido de forma rápida já foi demonstrada em cães e este tem sido indicado no controle do eczema agudo e do prurido crônico associado à dermatite atópica. Apesar de eficaz, os efeitos da inibição à longo prazo dessas vias de sinalização tem sido pouco elucidadas, e os estudos atuais fornecem principalmente dados de perfil hematológico e bioquímico sérico (COSGROVE et al., 2013b, 2015; GADEYNE et al., 2014). Nenhum estudo avaliou as interferências no sistema imune de cães com dermatite atópica durante o uso crônico de maleato de oclacitinib. Portanto, o objetivo desse trabalho é avaliar a eficácia e segurança do maleato de oclacitinib em cães com dermatite atópica e verificar a sua influência a longo prazo nas subpopulações de linfócitos CD4+, CD8+, CD14 e monócitos CD21, e na produção de citocinas IL-4 e IFN- γ produzidas pelos LTCD4+ e CD8+.

2- MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da UFMG com o protocolo de número 57/2016 (Anexo 2). Este estudo utilizou as dependências físicas e infraestrutura do Hospital Veterinário da Escola de Veterinária (EV da UFMG), dos laboratórios Toxicologia Veterinária EV-UFMG e Patologia Clínica, ambos do Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinárias EV-UFMG, e do Laboratório de Biologia das Interações Celulares (LBIC) do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Foram utilizados 13 cães diagnosticados com DAC, atendidos e acompanhados no Hospital Veterinário da EV-UFMG no período de 2016-2017 antes e durante o tratamento com maleato de oclacitinib por um ano.

2.1-CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO AVALIADA

Foram utilizados 13 cães, de diversas raças, acima de 12 meses de idade, desprovidos de quadros infecciosos graves e/ou neoplasias, diagnosticados com dermatite atópica advindos da região metropolitana de Belo Horizonte (MG). O diagnóstico foi baseado no histórico e nos sinais clínicos característicos de acordo com os critérios de Favrot et al. (2010), associado à eliminação por exclusão de outras dermatopatias pruriginosas de origem infectoparasitária, dermatite alérgica à saliva de artrópodes e de reação adversa exclusiva a alimentos, com instituição de dietas de exclusão com proteínas originais por no mínimo dois meses. Pacientes que eram medicados com outros fármacos (corticosteroides ou ciclosporina) foram incluídos após 30 dias da retirada desses fármacos. A inclusão dos animais na pesquisa foi realizada após a autorização por escrito de termo de consentimento livre e esclarecido pelos tutores (Anexo 3). Animais com qualquer alteração nos exames laboratoriais iniciais não foram incluídos no experimento, bem como animais com sorologia positiva para leishmaniose infantum, ou ainda animais com infecção generalizada, neoplasias malignas, demodicidose, escabiose, neoplasias malignas ou doenças imunossupressoras.

2.2- TRATAMENTO

Os cães incluídos no estudo foram tratados com maleato de oclacitinib na dose de 0,4-0,6 mg/kg por via oral, duas vezes ao dia por 14 dias, seguido do uso da dose diária de 0,4-0,6 mg/kg por via oral durante o período de um ano.

2.3- MONITORIZAÇÃO DOS PACIENTES

2.3.1-Avaliação da eficácia do fármaco

A avaliação da eficácia do fármaco foi realizada nos dias 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 por dois parâmetros: (1) avaliação de lesões pela escala de CADESI IV (*Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index, version 4*) (OLIVRY et al., 2014) (Anexo 4) e, (2) avaliação do prurido pela escala visual análoga (VAS- *visual analog scale*) de Rybnicek et al. (2009) (Anexo 1).

A avaliação de lesões pelo CADESI IV foi realizada por três examinadores no intuito de diminuir a subjetividade das análises. Para a avaliação do prurido, os proprietários foram requisitados para marcar na linha vertical da escala utilizada, de acordo com a sua percepção da intensidade do prurido do seu cão.

A categorização da intensidade do quadro atópico foi realizada segundo um conjunto de resultados fundamentais para ensaios clínicos em animais com dermatite atópica, proposta pela ICADA (*International committee on allergic diseases of animals*) (Quadro 1). Essa categorização leva em conta a PVAS e o CADESI-IV.

Quadro 1- Categorização da intensidade da dermatite atópica, baseada nas escalas lesionais CADESI-IV, CADLI e de prurido VAS10

Intensidade da DAC	CADESI-IV	CADLI	VAS10
Cão normal	0-9	0-5	0.0-1.9
Dermatite atópica discreta	10-34	6-7	2.0-3.5
Dermatite atópica moderada	35-59	8-23	3.6-5.5
Dermatite atópica intensa	60-180	24-50	5.6-10

2.3.2- Avaliação da segurança do fármaco

2.3.2.1- Exame físico

O exame físico dos pacientes ocorreu nos dias 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360. Antes do exame físico foram obtidos o histórico dos pacientes pelos tutores (estado geral, comportamento, apetite, fezes e urina). O exame físico consistiu em avaliação de mucosas, linfonodos, ausculta cardíaca (com documentação da frequência cardíaca e traçado eletrocardiográfico) e pulmonar, temperatura e palpação abdominal (Anexo 5). A avaliação eletrocardiográfica foi realizada segundo Tilley (1992), com o animal posicionado em decúbito lateral direito e eletrodos colocados em membros pélvicos e torácicos para a obtenção das derivações I, II, III, aVL, aVR, aVF. Foi utilizado o equipamento computadorizado (TEB, São Paulo, Brasil) e os traçados foram obtidos com velocidade 50mm/s e sensibilidade N. Os exames foram obtidos nos tempos e gravados durante cinco minutos.

2.3.2.2- Avaliação hematológica

Amostras sanguíneas foram coletadas antes e durante o tratamento com Maleato de oclacitinib nos momentos 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330 e 360 dias por venopunção jugular, sendo 1,0ml armazenado em um frasco contendo anticoagulante ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 10% para realização do hemograma. Cerca de 4,0ml foram acondicionados em tubos sem anticoagulante para produção de soro e análise bioquímica. Os outros 10,0ml foram acondicionados em tubos contendo heparina sódica para realização de citometria de fluxo de amostras de sangue total (*ex vivo*) e após cultura celular (*in vitro*).

2.3.2.2.1- Hemograma

O hemograma foi realizado em analisador hematológico veterinário (Poch-100iV Diff®) utilizando-se o sangue coletado com EDTA a 10%, para determinar o número de eritrócitos, leucócitos e plaquetas, volume globular (VG), concentração da hemoglobina e índices

hematimétricos: volume globular médio (VGM) e concentração de hemoglobina globular média (CHGM). Os esfregaços sanguíneos foram realizados em lâminas de vidro e corados com Panótico rápido para contagem diferencial de leucócitos em microscopia óptica.

2.3.2.2.2- Bioquímica sérica

Para a avaliação bioquímica, o sangue armazenado em frascos sem anticoagulantes foi centrifugado à 3.000 rpm durante cinco minutos, para obtenção do soro. Esse material foi utilizado para determinações de proteína total sérica, por meio de refratometria, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (FA), gama glutamil transpeptidase (GGT), uréia e creatinina por método colorimétrico cinético, colesterol e triglicéridos de acordo com o protocolo dos kits comerciais de diagnóstico (Kits Bioclin®).

2.3.2.3- Citometria de fluxo

Sangue periférico foi coletado por venopunção jugular em tubos contendo heparina sódica para realização por citometria de fluxo antes do tratamento e a cada dois meses até completar um ano de acompanhamento. Essa técnica foi utilizada para duas avaliações distintas. 1) avaliação *ex vivo*, proporcionando os subtipos de LTCD4+, CD8+, CD21+ e monócitos CD14+; 2) avaliação *in vitro* por meio de cultura celular e avaliação das citocinas (IL-4 e IFN- γ) produzidas pelos subtipos linfocitários (CD4+ e CD8+), sem estímulo, após estímulo com mitógeno fitohemaglutinina específico (PMA) e após estímulo antigênico com *Dermatophagoides farinae*.

2.3.2.3.1- Avaliação *ex vivo* de leucócitos

Foram coletados cinco ml de sangue periférico total em tubo contendo heparina sódica. Desse total, 50 μ L foram transferidos para tubos de poliestireno (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA): (1) contendo 2,5 μ L do anticorpo anti-cão CD3-FITC/ CD4+-PE/ CD8+-AlexaFluor 647; (2) contendo 20 μ L de anticorpo anti-humano CD14-AlexaFluor 647 + 1,0 μ L de anticorpo anti-cão CD21-PE; (3) ausência de anticorpo. Após a adição do sangue, as amostras foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após a incubação, as amostras foram submetidas ao processo de lise osmótica de eritrócitos com 3 ml de *Billing dog* (2,85 g de citrato de sódio, 54 ml de formaldeído, 30ml de dietilenoglicol, 400 μ L de heparina com concentração de 5000 UI/ml e 100ml de água destilada) por 10 minutos. Posteriormente os tubos foram submetidos à centrifugação (1300 xg, 18°C por sete minutos) e o sobrenadante removido. Em sequência as amostras foram lavadas duas vezes com PBS-W (PBS com 0,5% de BSA e 0,1% de azida sódica, pH 7,2), e novamente centrifugados a 1300 rpm, 18°C por sete minutos. Ao *pellet* obtido, foram adicionados 100 μ L de solução fixadora (Facs Lysing Solution – BD Bioscience). Para aquisição dos dados, foram obtidos 30.000 eventos totais, para os tubos contendo CD3, CD4+ e CD8+, e para o tubo contendo CD14 e CD21, 5.000 eventos no *gate* de CD14, utilizando o citômetro de fluxo FACScanthoII™-BD, pelo software DIVA™. Para a análise dos dados foi utilizado o *software FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software, versão 7.6.1)*. As porcentagens de CD4+, CD8+, CD14+ e CD21+ foram determinadas seguindo-se a mesma análise estratégica padrão descrita no capítulo 2.

2.3.2.3.2- Avaliação *in vitro*

Foram coletados 5 ml de sangue periférico total em tubo contendo heparina sódica (cinco animais atópicos e sete animais controle). A partir do número de leucócitos totais obtidos no hemograma, foram calculados a quantidade necessária do sangue total, para obtenção de preparação celular de 1×10^7 leucócitos/ml em tubos de polipropileno de 14 mL. Ao sangue foi adicionado RPMI suplementado (10% de SFB inativado, L-glutamina 2mM, penicilina G 100 U/mL, pH 7,2) para volume total de 2mL. As culturas foram divididas em: (1) sem estímulos; (2) *phorbol myristate acetate* (PMA; 25 ng/mL) e ionomycin (1 μ g/mL); (3) antígenos de *Dermatophagoides farinae* (25 ng/mL). Em todos os tubos foram adicionados 20 μ L de Brefeldina A. As amostras foram incubadas por 4 horas em estufa a 37°C e 5% CO₂. Posteriormente, foram adicionados 200 μ L of ethylene diamine tetra acetic acid – EDTA (Sigma, St Louis, USA) em concentração final de 2 mM, as amostras foram mantidas por 10 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, acrescentou-se 3ml de PBS-W e foi realizada a centrifugação a 1300 rpm, 18°C por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado por aspiração com bomba a vácuo, o *pellet* foi ressuspenso e completado para 1 mL com PBS-W, 100 μ L da suspensão celular foram transferidos para os tubos de poliestireno de 5 mL correspondentes a cada condição de cultura, contendo anticorpos específicos para as populações celulares de interesse: 1- anticorpo anti-cão CD4-PE; 2- anticorpo anti-cão CD4-FITC; 3- anticorpo anti-cão CD8+-PE; 4- anticorpo anti-cão CD8+-FITC; 5- sem marcação. Incubou-se por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz e submetidas ao processo de lise osmótica de eritrócitos com 3 ml de *Billing dog* por 10 minutos. Posteriormente as células foram submetidas a centrifugação (1300 rpm, 18°C por sete minutos) e o sobrenadante removido. Em sequência as amostras foram lavadas com PBS-W (PBS 0,5% BSA 0,1% azida sódica, pH 7,2), 1300 rpm, 18°C por sete minutos. O sobrenadante foi retirado e o *pellet* ressuspenso em 500 μ L de PBS-W e 3mL de PBS-P (PBS-W e 0,5% de saponina), os tubos foram tampados e homogeneizados 10 vezes por inversão. Após centrifugação (1300 rpm, 18°C por sete minutos) e retirada de sobrenadante, foram adicionados 20 μ L de anticorpo anti-citocina (IL4-PE e IFN- γ -FITC) e incubação por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente as amostras foram lavadas com PBS-W (PBS 0,5% BSA 0,1% azida sódica, pH 7,2), 1300rpm, 18°C por sete minutos. Ao *pellet* obtido, foram adicionados 100 μ L de solução fixadora. Para aquisição dos dados foram obtidos 30.000 eventos totais utilizando o citômetro de fluxo FACSCanthonII™-BD, pelo software DIVA™. Para a análise dos dados foi utilizado o software FlowJo (Flow Cytometry Analysis Software, versão 7.6.1). A porcentagem de linfócitos CD4+ e CD8+ produtores de IL-4 e IFN- γ foi definida seguindo uma análise estratégica padrão, assim como descrita no capítulo 2.

2.4- ANÁLISE ESTATÍSTICA

O banco de dados é composto por 51 variáveis medidas ao longo de um ano e para descrevê-las utilizaram-se gráficos de linha para a média com intervalo de 95% de confiança.

Para avaliar as variáveis ao longo do tempo foi utilizado o método GEE (*Generalized Equations Estimating*) (LIANG e ZEGER, 1986), que é uma forma para contabilizar a correlação existente entre as medidas repetidas. O método GEE é conhecido como Modelos Marginais e pode ser considerado uma extensão de Modelos Lineares Generalizados (MCCULLAGH E NELDER, 1989) que diretamente incorporam a correlação entre as medidas da mesma unidade amostral. Foram ajustadas Regressões Marginais Log-Lineares com variância constante e variância proporcional à média para cada variável tendo o tempo como variável explicativa. Além disso, para o conjunto “Análise clínica”, ajustaram-se os modelos com a variável “Tempo” e

“Intensidade dos sinais da dermatite atópica”, juntamente com a interação entre elas, sendo então calculados os devidos contrastes.

O *software* utilizado nas análises foi o R (versão 3.3.2). Consideraram-se valores estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO AVALIADA

Foram selecionados 13 cães com dermatite atópica, sete machos e seis fêmeas. Destes, cinco foram da raça Shih-tzu (38,4%), dois sem raça definida (SRD) (15,38%) e um representante das raças: Maltês, Buldogue Inglês, Buldogue Francês, Pequinês, Schnauzer e Poodle, o que representa uma porcentagem de 7,69% da população avaliada (Quadro 2). Um cão não completou o estudo, pois veio à óbito durante o curso experimental (descrever o por que).. A porcentagem maior da raça Shih-Tzu se deve provavelmente a alta incidência de dermatite atópica nessa raça, associada à presença massiva dessa raça em grandes centros urbanos como Belo Horizonte (MG).

Após o uso do CADESI e VAS conseguiu-se categorizar os animais quanto à intensidade da dermatite atópica, assim como recomenda a ICADA. Dos 13 animais, quatro (30,7%) foram definidos com dermatite atópica discreta; seis (46,1%) foram definidos com dermatite atópica moderada e, três (23,0%) com dermatite atópica intensa. Para aqueles cães que tinham prurido acima de 5,5 (cães que seriam enquadrados com dermatite atópica intensa), porém pontuação no CADESI abaixo de 59 (animais que seriam enquadrados com dermatite atópica moderada), decidiu-se enquadrá-los de acordo com o CADESI. Assim, foi dado mais importância ao caráter objetivo da análise do CADESI, realizada por médicos veterinários experientes, em detrimento da avaliação subjetiva dos tutores com relação à nota do prurido. A distribuição observada é similar aos estudos que realizaram essas análises em cães com dermatite atópica antes do tratamento (COSGROVE et al., 2013a, 2013b; LITTLE et al., 2015).

Quadro 2- Perfil dos animais selecionados para o estudo: raça, idade, gênero, peso e categorização da intensidade da dermatite atópica.

Nº	Raça	Idade (anos)	Sexo	Peso (kg)	Categorização
1	Shih-tzu	5	Fêmea	3,9	Moderada
2	Pequinês	5	Macho	7,6	Moderada
3	SRD	2	Fêmea	7,8	Discreta
4	Shih-Tzu	4	Macho	7,8	Intensa
5	SRD	4	Fêmea	11,5	Intensa
6	Buldogue inglês	2	Fêmea	19,6	Moderada
7	Shih-tzu	6	Fêmea	6,5	Moderada
8	Shih-tzu	2	Fêmea	7,1	Intensa
9	Schnauzer	5	Macho	9,9	Discreta

10	Buldogue francês	6	Macho	11	Discreta
11	Poodle	10	Macho	9,7	Discreta
12	Maltês	7	Macho	8,6	Moderada
13	Shih-tzu	3	Macho	8,9	Moderada

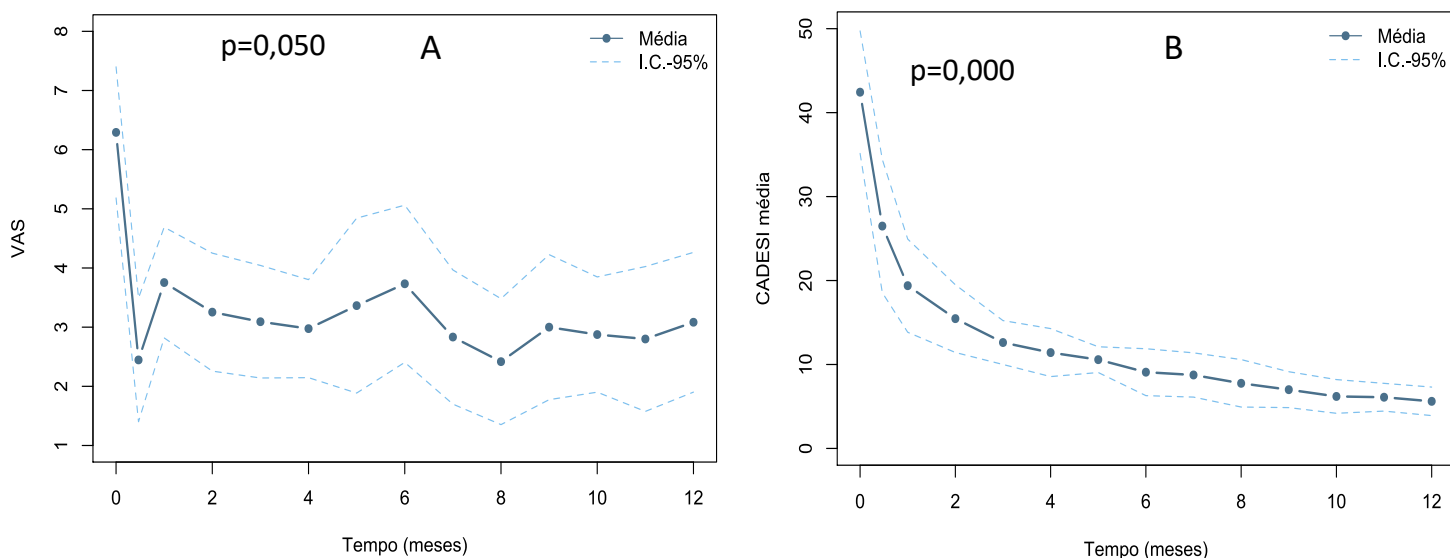
3.2- MONITORIZAÇÃO DOS PACIENTES

3.2.1-Avaliação da eficácia do fármaco

O tratamento apresentou efeito significativo ($p=0,05$) sobre a variável VAS, sendo que o nível médio de VAS foi 3,3% (variação de 0% a 6,5%) menor a cada mês (Gráfico 1a). O prurido médio de T0 (antes do início do fármaco) era 6,29 e reduziu para 2,45 (61% de redução) já nos primeiros 14 dias de tratamento (Quadro 3). A redução rápida no prurido é uma característica importante do fármaco, e que é observada pelos tutores logo nas primeiras quatro horas, assim como ocorre com a prednisolona (GADEYNE et al., 2014). Após a administração oral, o maleato de oclacitinib é rapidamente absorvido e pico de concentração plasmática ocorre uma hora após essa administração (COLLARD et al., 2014). Essa rápida eficácia aumenta a aceitação pelo fármaco, pois suprime rapidamente o principal sinal clínico da dermatite atópica canina (COSGROVE et al., 2013a, 2013b). Após os 14 dias, observou-se um aumento do prurido, porém ainda significativamente menor que antes do início do tratamento. Isso ocorreu pela mudança na frequência de administração, que passou de 12 em 12 horas, para cada 24 horas após os primeiros 14 dias de administração do fármaco.

Em relação a avaliação de lesões de pele utilizando-se o CADESI IV, os resultados obtidos corroboram os encontrados na literatura (COSGROVE et al., 2013b, 2015; LITTLE et al., 2015). Observou-se efeito significativo (valor- $p=0,000$) sobre essa variável no decorrer do tempo de tratamento. O nível médio de pontuação foi 13,4% (11,6% a 15,3%) menor a cada mês (Gráfico 1b). Em 180 dias, observou-se redução de 78,5% na pontuação média, e em 360 dias, redução de 86,7% na pontuação média, o que representa recuperação gradual da pele, após o estímulo pruriginoso ter cessado (Quadro 3). Sendo assim observou-se melhora importante durante o exame físico dos animais, com redução das áreas de alopecia/hipotricose, escoriação, eritema e hiperpigmentação (Figura 1). A redução gradativa é esperada, já que a maioria das lesões, como alopecia e escoriações decorrem do prurido crônico, e a eritrodermia hiperpigmentação e liquenificação são advindas do estímulo inflamatório crônico. Portanto, é necessário que haja um tempo para que a pele se recupere sem os estímulos, como o prurido, que estavam contribuindo para o aparecimento dessas lesões (COSGROVE et al., 2015). Colocar o mecanismo patogênico desse prurido.

Gráfico 1- Avaliação da eficácia do maleato de oclacitinib na dermatite atópica canina durante 12 meses de tratamento. A) Pontuação média do prurido, utilizando escala análoga visual. B) Pontuação média de lesão, utilizando CADESI-IV (*Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index*).



O tratamento apresentou efeito significativo ($p=0,05$) sobre a variável VAS, sendo que o nível médio de VAS foi 3,3% menor a cada mês. O tratamento apresentou efeito significativo ($p=0,000$) sobre a variável CADESI IV, sendo que o nível médio de pontuação foi de 13,4% menor a cada mês.

Quadro 3 -Monitorização da eficácia do maleato de oclacitinib em cães com dermatite atópica por 12 meses. O percentual de redução de todos os tempos é baseado na comparação com o tempo 0 (antes do tratamento)

Dias do estudo	VAS	Percentual de redução	CADESI-IV	Percentual de redução
0	6,29		42,4	
14	2,45	61	26,5	37,5
30	3,75	40,4	19,6	53,7
60	3,25	48,3	15,5	63,4
90	3,09	50,8	12,6	70,2
120	2,98	52,6	11,4	73,1
150	3,36	46,6	10,6	75,0
180	3,73	40,7	9,1	78,5
210	2,83	55	8,8	79,2

240	2,42	61,5	7,8	81,6
270	3,00	52,3	7,0	83,4
300	2,88	54,2	7,0	83,4
330	2,80	55,5	6,2	85,3
360	3,08	51	5,6	86,7

VAS= Visual analog scale, CADESI IV= Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index, version 4.

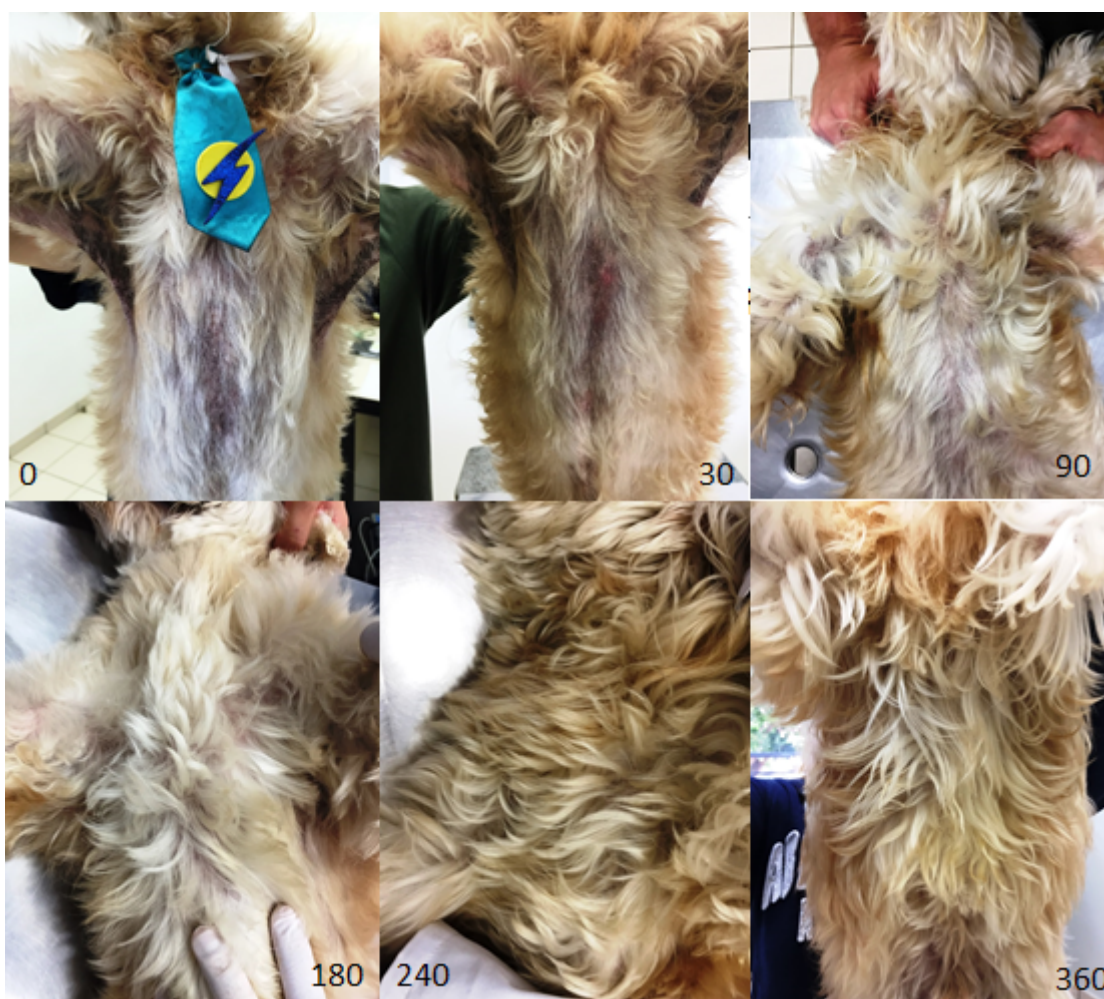


Figura 1- Monitorização fotográfica de um cão, da raça Poodle, com 10 anos de idade, diagnosticado com dermatite atópica e tratado com maleato de oclacitinib por 12 meses [a figura mostra os tempos 0 (antes do fármaco), e 30, 90, 180, 240 e 360 dias após a instituição da terapia]. Observa-se no tempo 0, a região peitoral e axilar com hiperpigmentação, hipotricose e hiperqueratose. Com a instituição do tratamento houve melhora considerável com relação a esses parâmetros, verificando-se recuperação completa aos 180 dias, que se manteve até o último dia de avaliação (360 dias).

3.2.2- Avaliação da segurança do fármaco

3.2.2.1- Ocorrências anormais isoladas

As ocorrências anormais isoladas durante todo o período de tratamento estão listadas no Quadro 4. Um dos animais apresentou, após 100 dias da medicação, vômitos, diarreia e prostração. Após exame ultrassonográfico, observou-se aumento de volume considerável do fígado, com alterações da ecogenicidade em baço e pâncreas. Após procedimento de laparotomia exploratória seguido de biópsia de órgãos, definiu-se como diagnóstico definitivo colangiocarcinoma hepático. O animal veio a óbito três dias após o procedimento laparoscópico.

Quadro 4- Ocorrências anormais isoladas em relação ao dia de acompanhamento experimental

Ocorrência	Número de animais	Tempo após a medicação (dias)
Infecção do trato urinário	1	250
Colangiocarcinoma	1	100
Piodermite superficial	3	180-210
Dermatofitose	1	210
Ulceração corneana	1*	120-330

* O mesmo animal apresentou 2 episódios nos dias 120 e 330 após a medicação

A associação entre inibidores de *Janus quinase* e neoplasias ainda não é clara e poucas informações podem ser encontradas a cerca do risco de neoplasia após o uso do maleato de oclacitinib. Os inibidores de JAK alteram a resposta imune, e consequentemente podem aumentar o risco de infecções e de neoplasias como resultado do bloqueio da ação de interferon e das células natural *killer* (KUBLER, 2014). Porém em estudo utilizando Tofacitinib, inibidor preferencial de JAK 1 e 3, para tratamento de artrite reumatoide em humanos, não foi verificado risco de maior incidência de neoplasias em pessoas tratadas com essa medicação em relação à outras formas de terapia (CURTIS et al., 2016). Rosenkratz e Bourgeois (2017) observaram após pelo menos seis meses de uso de oclacitinib uma porcentagem de 6,3% (11/175) de neoplasias em cães. Destas, foram identificados um caso de hemangiossarcoma retroperitoneal, um de tumor de bainha de mielina, um de mastocitoma grau I, um de tumor linfocítico, um de linfoma, um de carcinoma mamário, um de adenocarcinoma de glândulas ceruminosas, um de adenoma adrenal e quatro casos de histiocitoma. Porém, quando se avalia a incidência de neoplasia na população canina, verifica-se que o câncer é a principal causa de óbito nos cães (25%) (REIF, 2007). Entende-se ainda que muitas raças predispostas à dermatite atópica, também são predispostas a neoplasias. Portanto não há relatos suficientes para a associação direta do uso de inibidores de JAK e aumento da incidência de neoplasias.

A maior parte dos eventos adversos observados está relacionada comorbidades, geralmente secundárias à própria doença primária (DAC). Em três animais, foram observadas lesões disseminadas em colarinho epidérmico, associado à eritema e aumento do prurido entre 180-210 dias após o tratamento. Esses animais foram diagnosticados com piodermite superficial e foram tratados com antibioticoterapia (cefalexina 30 mg/kg/ a cada 12h por 30 dias por via oral). O controle da infecção foi suficiente para controlar novamente o prurido desses animais.

A infecção de trato urinário foi identificada em um cão macho após 250 dias da medicação. Observou-se hematúria e disúria, com melhora após antibioticoterapia (enrofloxacino 2,5mg/kg a cada 24 horas por 15 dias por via oral). A infecção do trato urinário é uma alteração relatada em outros estudos que utilizaram o maleato de oclacitinib a longo prazo. Cosgrove et al., (2015) verificaram em 11,3% dos cães, durante o acompanhamento por 630 dias. Nesse, todos os animais precisaram de terapia antimicrobiana, porém em nenhum foi suspenso o maleato de oclacitinib. Rosenkratz e Bourgeois (2017) relataram infecção urinária em 6,3% dos animais acompanhados durante 180 dias.

Apesar de se encontrar uma frequência de infecção urinária superior a 5% na maioria dos estudos, não se correlacionou o uso crônico do maleato de oclacitinib à maior prevalência de infecção urinária em animais sem histórico anterior dessa afecção (SIMPSON et al., 2017).

Não foram observadas alterações nos exames de ECG em nenhum dos animais avaliados. Tais resultados mostram que o uso prolongado do maleato de oclacitinib não promoveu efeitos tóxicos cardiovasculares, indicando maior segurança no uso dessa medicação.

3.2.2.2- Hemograma

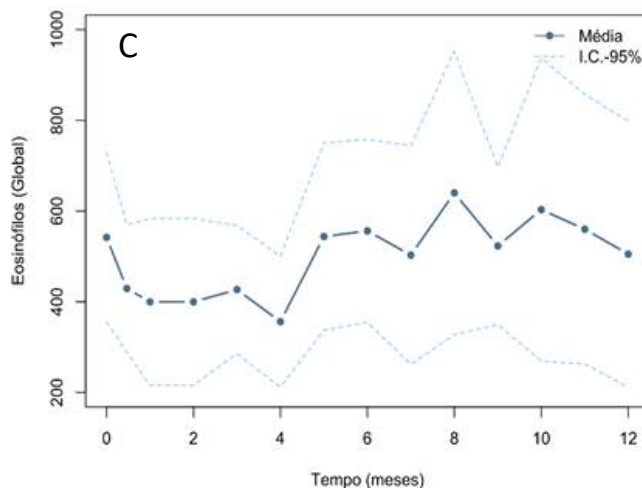
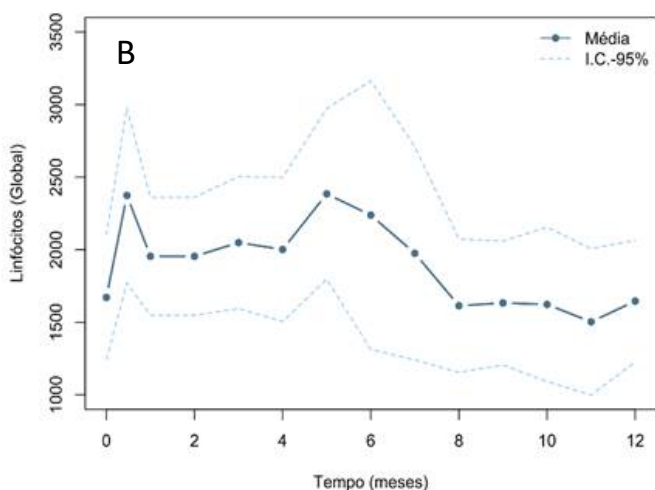
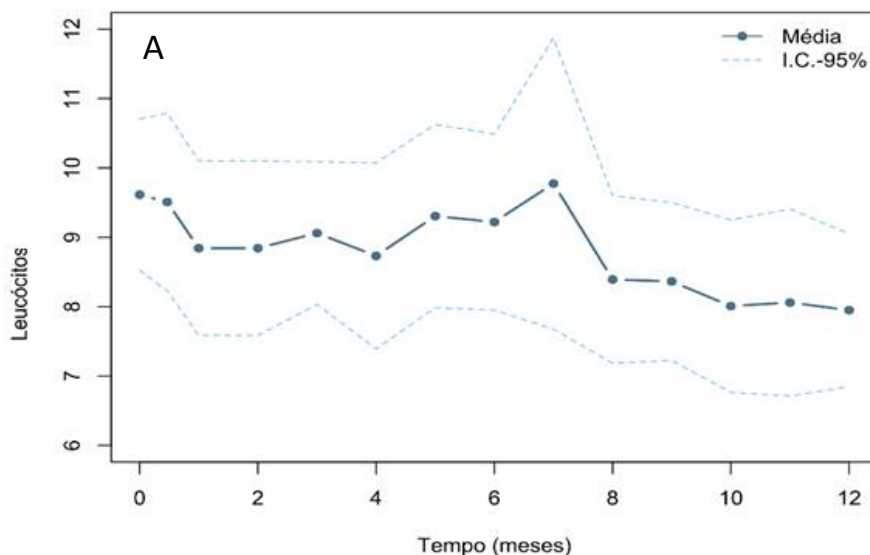
No presente estudo foram verificadas poucas alterações nos valores médios do hemograma, assim com observados em outro estudo clínico de longo prazo (COSGROVE et al., 2015). Houve diferença estatística de acordo com o tempo em alguns parâmetros (Tabela 1), mas os valores médios mantiveram-se dentro do padrão de referência.

Observou-se efeito significativo ($p=0,003$) do tempo em relação aos leucócitos totais (Tabela 1). O nível médio foi 1,5% (0,5% a 2,3%) menor a cada mês (Gráfico 2a). Apesar dessa tendência de queda, os valores médios mantiveram-se dentro do padrão de referência. Quando se avalia o diferencial de leucócitos, pode-se observar que essa tendência está relacionada aos linfócitos. Houve efeito significativo (valor- $p=0,004$) do tempo em relação a valores absolutos de linfócitos (Tabela 1). O nível médio foi 2,5% (0,8% a 4,2%) menor a cada mês, porém, mantendo-se dentro do padrão de referência (Gráfico 2b). Observando-se os animais individualmente, verificou-se leucopenia e trombocitopenia importante em um deles a partir do 210º dia, com os valores de leucócitos atingindo $3,3 \times 10^3/\mu\text{l}$ no 300º dia (valor de referência= $6-17 \times 10^3/\mu\text{l}$). Observou-se também linfopenia persistente do 180º dia ao término do estudo em dois animais.

A leucopenia é relatada como possível efeito colateral dos inibidores de *Janus quinase* (CHAPLIN, 2017). Altas doses por longos períodos do maleato de oclacitinib podem inibir as vias de sinalização dependentes de JAK-2, ocasionando assim a leucopenia (ROSENKRANTZ; BOURGEOIS, 2017). Em estudo *in vitro* avaliando-se sistemas enzimáticos isolados, foi verificado que uma concentração duas vezes maior daquela necessária para inibir JAK-1, foi suficiente para inibir pelo menos 50% da atividade de JAK-2 (GONZALES et al., 2014). No

presente estudo, todos os animais receberam a dose indicada em bula à longo prazo. Houve efeito significativo (valor-p=0,009) do tempo em relação aos eosinófilos (Tabela 1). O nível médio de eosinófilos foi 2,9% (0,7% a 5,1%) maior a cada mês (Gráfico 2c). Apesar de a tendência de aumento do número de eosinófilos, os valores se mantiveram dentro do padrão de referência para a espécie estudada.

Gráfico 2- Valores do leucograma de cães com dermatite atópica, após tratamento com maleato de oclacitinib por 12 meses. A) Nível médio de leucócitos totais. O nível médio foi 1,5% menor a cada mês (p=0,003); B) Nível médio de linfócitos totais. O nível médio foi 2,5% menor a cada mês (p=0,004); C) Nível médio de eosinófilos totais. O nível médio foi 2,9% maior a cada mês (p=0,009)



*Valores de referência de leucócitos totais segundo Meyer e Harvey (2004): $6-17 \times 10^3/\mu\text{l}$

*Valores de referência de linfócitos segundo Meyer e Harvey (2004): $1-4,8 \times 10^3/\mu\text{l}$

*Valores de referência de eosinófilos segundo Meyer e Harvey (2004): $0,1-1,25 \times 10^3/\mu\text{l}$

Houve efeito significativo ($p=0,004$) (Tabela 1) do tempo em relação as plaquetas, sendo que o nível médio de plaquetas foi 1,3% (0,4%; 2,2%) menor a cada mês (Gráfico 3). Os valores, no entanto, mantiveram-se dentro do padrão de referência (Tabela 1)

Gráfico 3- Valores de plaquetas de cães com dermatite atópica, após tratamento com maleato de oclacitinib por 12 meses. O nível médio foi 1.3% menor a cada mês ($p=0,004$).

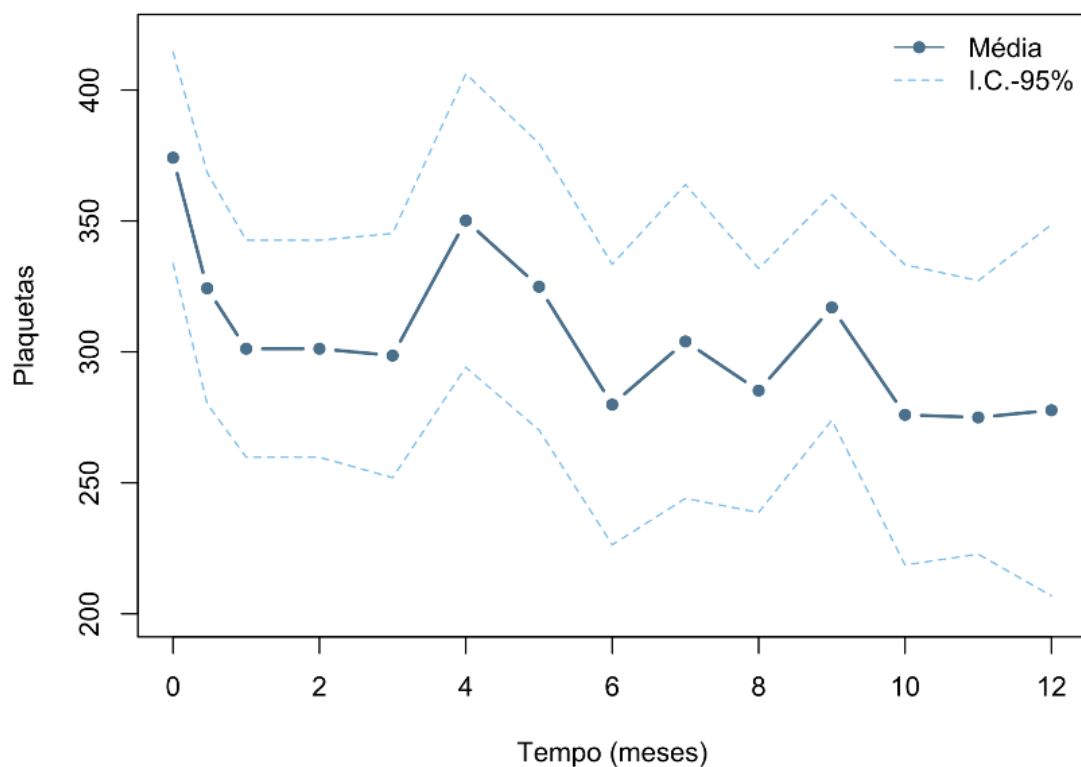


Tabela 1- Efeito do tempo sobre as variáveis de hemograma em cães tratados com maleato de oclacitinib por 12 meses através dos ajustes dos Modelos Marginais Log-Lineares

Variáveis	β^1	E.P.(β) ²	Exp(β) ³	I.C.-95% ⁴	Valor-P
Leucócitos	-0,014	0,005	0,986	[0,977; 0,995]	0,003
Linfócitos	-0,026	0,009	0,975	[0,958; 0,992]	0,004
Monócitos	0,005	0,010	1,005	[0,985; 1,026]	0,600
Neutrófilos	-0,013	0,007	0,987	[0,973; 1,001]	0,068
Eosinófilos	0,028	0,011	1,029	[1,007; 1,051]	0,009
Hemácias	-0,003	0,001	0,997	[0,995; 1,000]	0,071
Plaquetas	-0,014	0,005	0,987	[0,978; 0,996]	0,004

¹ Coeficiente de Regressão; ² Erro Padrão; ³ Exponencial do Coeficiente; ⁴ Intervalo de 95% de Confiança.
*Valor P<0,05 representa dados estatisticamente significativos

Apesar da tendência de decréscimo e significância estatística ter sido observada nos valores médios de plaquetas, não houve valores fora do padrão de referência. Isso pode indicar a seletividade do maleato de oclacitinib para as JAK-1, e ausência de inibição de JAK-2 nas doses recomendadas em bula (GONZALES et al., 2014), já que JAK-2 tem papel fundamental na sinalização de trombopoetina (YAMAOKA et al., 2004)

3.2.2.3- Bioquímica sérica

No presente estudo foram verificadas poucas alterações nos valores médios de bioquímica sérica. Houve diferença estatística de acordo com o tempo de tratamento em alguns parâmetros (Tabela 2). Os valores de GGT permaneceram discretamente acima dos valores de referência durante todo o período de tratamento (Gráfico 4). Observou-se que o nível médio foi 2% maior a cada mês, com efeito significativo do tempo ($p=0,016$). Diferentemente do que foi observado com AST, em que houve uma tendência de decréscimo de acordo com o tempo. O nível médio foi 2,6% menor a cada mês ($p=0,000$) e manteve-se dentro dos parâmetros de referência, exceto nos primeiros 14 dias de tratamento em que a frequência de administração era duas vezes ao dia, no qual foi observado um pico (58.4U/L) dessa enzima hepática (Gráfico 4).

Observou-se uma tendência de decréscimo nos níveis de proteínas totais. Os valores médios foram 0,5% menor a cada mês ($p=0,010$), porém se mantiveram dentro dos valores de referência (Gráfico 4).

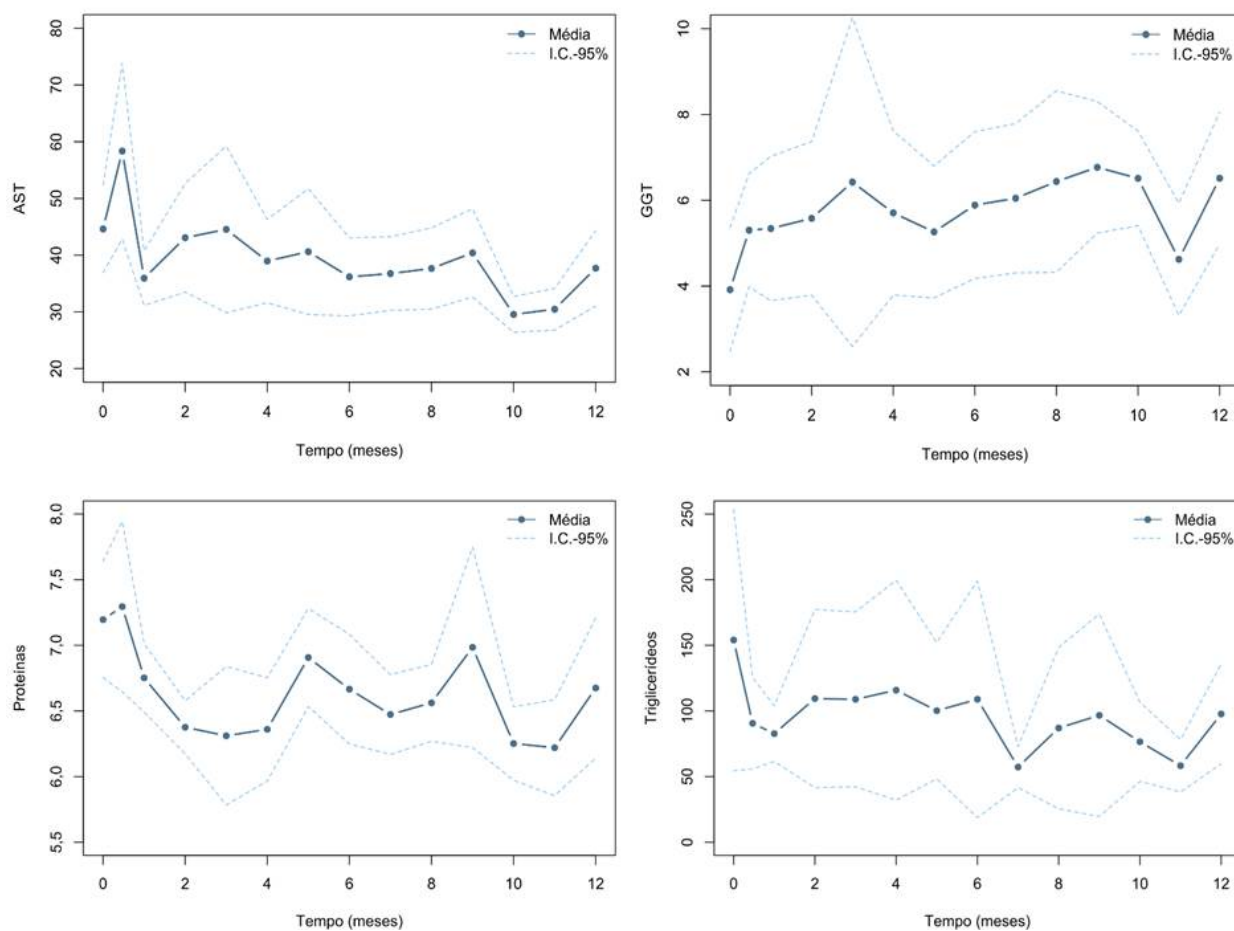
Houve efeito significativo ($p=0,000$) do tratamento em relação aos triglicerídeos. Os valores médios foram 4.4% menor a cada mês (Gráfico 4), mas mantiveram-se dentro do padrão de referência (Tabela 2). No entanto, um animal da raça Shih-tzu, de cinco anos de idade apresentou valores acima do valor de referência de triglicerídeos e colesterol durante todo o período experimental. Uma teoria discutida é a possibilidade do tecido adiposo ser afetado por inibidores de JAK, já que algumas citocinas adipogênicas utilizam essa via de sinalização e assim podem modular o armazenamento de lipídeos (ROSENKRANTZ; BOURGEOIS, 2017).

Gráfico 4- Valores de bioquímica sérica de cães com dermatite atópica, após tratamento com maleato de oclacitinib por 12 meses. A) Nível médio de aspartato aminotransferase (AST). O nível médio foi 2,6% menor a cada mês ($p=0,000$); B) Nível médio de gama glutamiltransferase (GGT). O nível médio foi 2 % maior a cada mês ($p=0,016$); C) Nível médio de proteínas totais. O nível médio foi 0,5% menor a cada mês ($p=0,010$). D) Nível médio de triglicerídeos. O nível médio foi 4.4% menor a cada mês ($p=0,000$)

*Valores de referência de AST segundo Meyer e Harvey (2004): 16-43U/l

*Valores de referência de GGT segundo Meyer e Harvey (2004): 1-5U/l

*Valores de referência de proteínas totais segundo Meyer e Harvey (2004): 5.4-7.1g/dl

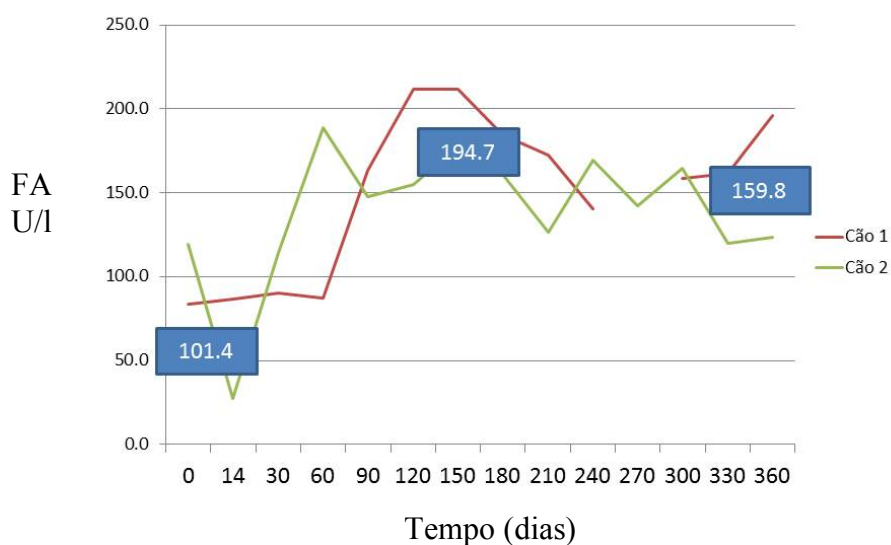


*Valores de referência de triglicerídeos segundo Meyer e Harvey (2004): 20-112 mg/dl

Avaliando-se os cães individualmente, notou-se aumento da fosfatase alcalina (FA) acima dos valores de referência em dois animais, a partir dos 60 dias de tratamento, que se manteve alto até o final do experimento. Todavia, deve ser ressaltado que em um desses animais, o valor já se apresentava aumentado, antes do tratamento ser iniciado (Gráfico 5). Rosenkrantz e Bourgeois (2017) relataram que 26,8% dos animais apresentaram aumento de FA, quando avaliados por seis meses, porém 1/4 desses animais estavam recebendo corticosteróide em concomitante. Outros

estudos que fizeram o acompanhamento por longos períodos não mostraram alterações significativas nas enzimas hepáticas (COSGROVE et al., 2015; VERDE et al., 2016).

Gráfico 5- Monitorização da Fosfatase alcalina (FA) em dois cães com dermatite atópica em tratamento com maleato de oclacitinib por 360 dias. Cão 1- Fêmea Shih-tzu de 2 anos de idade pesando 6.5kg. Cão 2- Macho de Buldogue Francês com 6 anos de idade, pesando 11kg



Valor de referência de FA segundo Meyer e Harvey (2004): 10-92 U/l

Tabela 2- Efeito do tempo nas variáveis da bioquímica sérica em cães tratados com maleato de oclacitinib por 12 meses através dos ajustes dos Modelos Marginais Log-Lineares

Variáveis	β^1	E.P.(β) ²	Exp(β) ³	I.C.-95% ⁴	Valor-P
Ureia	-0,008	0,005	0,992	[0,983; 1,001]	0,068
Creatinina	-0,004	0,005	0,996	[0,987; 1,005]	0,378
ALT	-0,004	0,006	0,996	[0,984; 1,009]	0,548
AST	-0,026	0,005	0,974	[0,965; 0,984]	0,000
FA	0,009	0,012	1,009	[0,985; 1,033]	0,466
GGT	0,020	0,008	1,020	[1,004; 1,036]	0,016
Glicose	-0,003	0,002	0,997	[0,992; 1,002]	0,215
Proteínas	-0,005	0,002	0,995	[0,990; 0,999]	0,010

¹	Albumina	0,001	0,001	1,001	[0,999; 1,004]	0,167
	Colesterol	0,004	0,003	1,004	[0,998; 1,010]	0,239
	Triglicerídeos	-0,045	0,013	0,956	[0,932; 0,980]	0,000

Coeficiente de Regressão; ² Erro Padrão; ³ Exponencial do Coeficiente; ⁴ Intervalo de 95% de Confiança

*Valor P<0,05 representa dados estatisticamente significativos

3.2.3- Imunofenotipagem *ex vivo*

Observa-se uma tendência de crescimento de 1,4% ao mês do nível médio percentual de CD4+ com efeito significativo do tratamento ao longo do tempo (p=0,002) (Gráfico 6). Apesar de a tendência de crescimento nos valores percentuais de CD8+, não houve diferença estatística de acordo com o tempo de tratamento (Tabela 3). A razão entre CD4+/CD8+ apresentou um comportamento razoavelmente constante (Gráfico 6). Além disso, observou-se efeito significativo do tempo de tratamento em relação aos níveis médios de CD14 (p=0,001), que foram 3% maior a cada mês (Gráfico 7)

Gráfico 6- Representação gráfica da imunofenotipagem *ex vivo* de cães com dermatite atópica canina, tratados durante 12 meses com maleato de oclacitinib. O nível percentual médio de CD4+ foi 1,4% maior a cada mês ($p=0.002$). Não houve diferença estatística no nível de CD8 e na razão CD4+/CD8+ ao longo do tempo

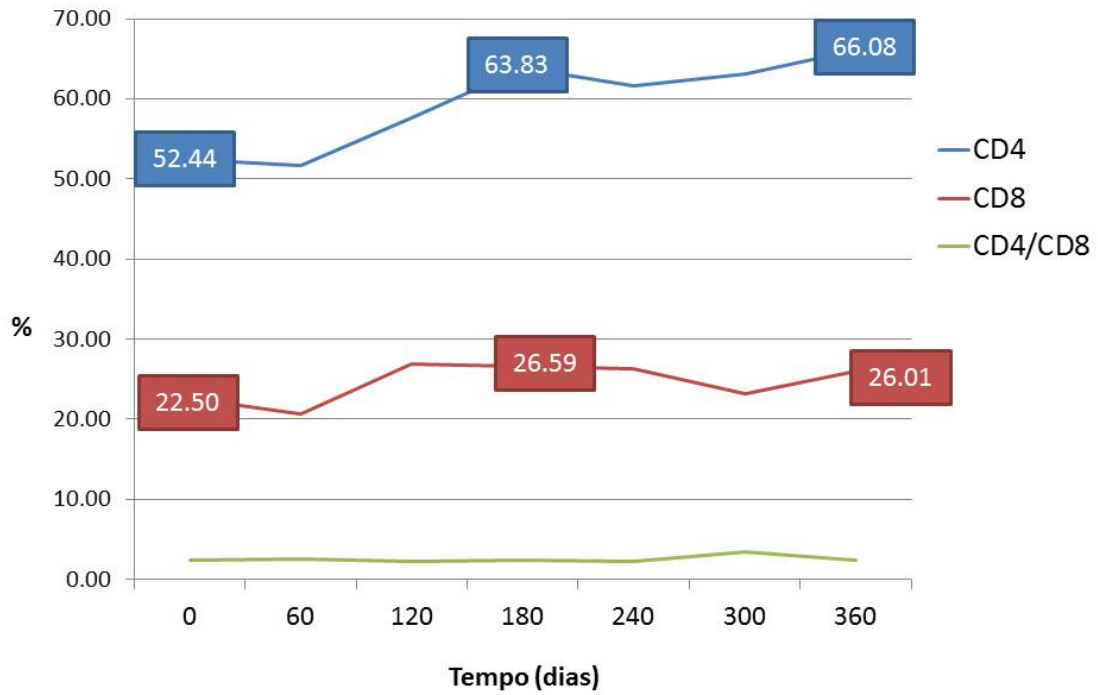


Gráfico 7- Frequência de monócitos CD14 em cães com dermatite atópica, após tratamento com maleato de oclacitinib por 12 meses. Observa-se uma tendência de crescimento no período inicial (até os seis meses de tratamento) e uma tendência de decrescimento a partir do oitavo mês de tratamento. O nível médio foi de 3% maior a cada mês ($p=0,001$)

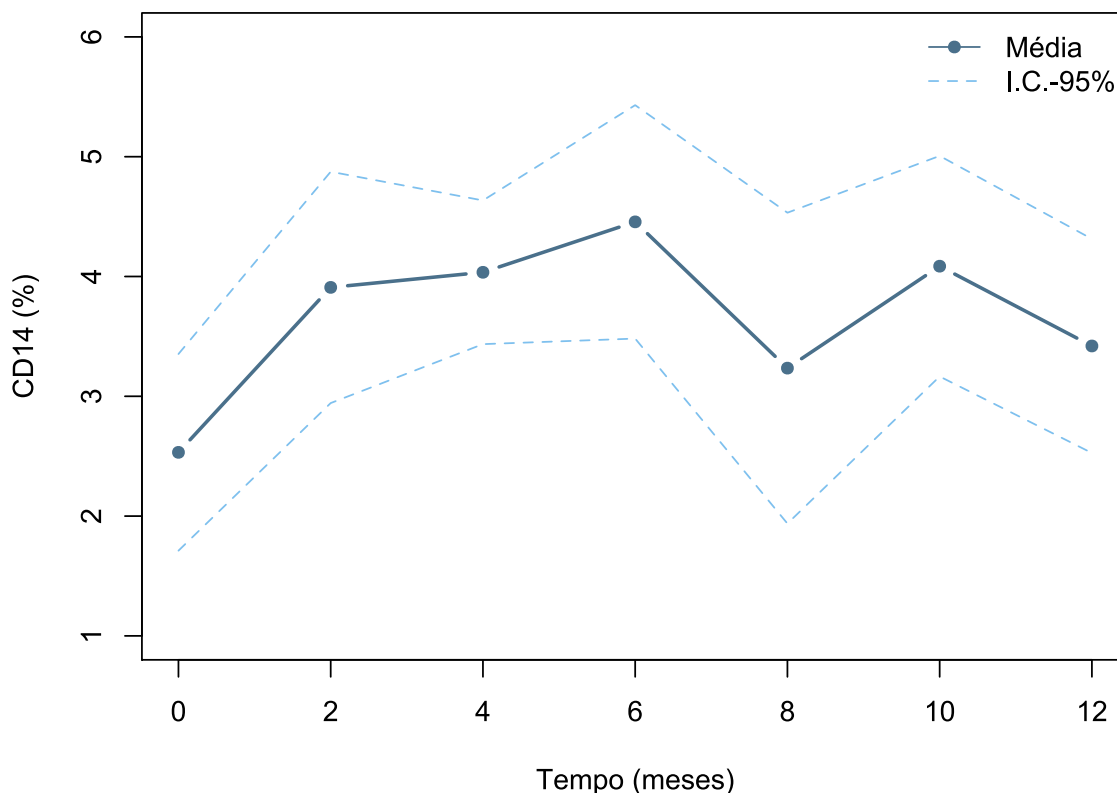


Tabela 3- Efeito do tempo sobre as variáveis de imunofenotipagem *ex vivo* em cães com dermatite atópica tratados com maleato de oclacitinib por um ano

Variáveis	β^1	E.P.(β) ²	Exp(β) ³	I.C.-95% ⁴	Valor-P
CD4+ (%)	0,014	0,004	1,014	[1,005; 1,023]	0,002
CD8+ (%)	0,008	0,009	1,008	[0,991; 1,026]	0,347
CD4/CD8	0,009	0,014	1,009	[0,982; 1,036]	0,514
CD21+ (%)	0,008	0,010	1,008	[0,988; 1,029]	0,428
CD14+ (%)	0,029	0,009	1,030	[1,012; 1,048]	0,001

¹Coefficiente de Regressão; ²Erro Padrão; ³Exponencial do Coeficiente; ⁴Intervalo de 95% de Confiança.

Valor $P < 0,05$ representa dados estatisticamente significativos

Não há dados disponíveis na literatura sobre o perfil de imunofenotipagem de leucócitos circulantes com discriminação de subpopulações linfocitárias em cães tratados com maleato de oclacitinib. A análise de subpopulações de linfócitos é importante para verificar a imunocompetência, a influência dos fármacos no sistema imune e a progressão de doenças infecciosas (TARRANT, 2005). Por ser um fármaco que inibe especificamente uma enzima acoplada a receptor específico de citocina (GONZALES et al., 2014), diferentemente de fármacos menos seletivos como os glicocorticóides, não era esperado encontrar redução de valores de subpopulações linfocitárias com o tempo (RINKARDT et al., 1999). Relatos informais indicavam uma maior prevalência de demodicose em animais com uso prolongado do maleato de oclacitinib, o que poderia fazer com que encontrássemos redução de CD4+ séricos durante o período experimental já que, houve demonstração de que animais com sarna demodéica apresentam valores reduzidos de CD4+ (OLIVEIRA et al., 2015). Observou-se, no entanto, aumento de CD4+, porém sem alterar a razão CD4+/CD8+ que se manteve razoavelmente constante. Esse aumento, associado ao aumento de CD14+ pode ter ocorrido pelo próprio curso da doença alérgica, em que o papel do linfócito CD4+ e o perfil Th2 já estão bem definidos (PUCHEU-HASTON et al., 2015a).

Após a pesquisa do efeito de outros fármacos imunomoduladores utilizados em cães com dermatite atópica, verificou-se ausência de alteração significativa nas subpopulações linfocitárias após 90 dias do uso de ciclosporina (BECCATI et al., 2016). Todavia, com o uso de corticosteroide, relatou-se diminuição significativa das subpopulações linfocitárias com apenas 14 dias de uso em dose imunossupressora (RINKARDT et al., 1999). Outro estudo verificou aumento significativo do percentual de linfócitos T reguladores (Treg), uma subpopulação de linfócitos CD4+ aos 6,9 e 12 meses pós imunoterapia alérgica específica, correlacionando positivamente a porcentagem de Treg com a redução do prurido (KEPPEL et al., 2008).

3.2.2.5- Imunofenotipagem *in vitro*

As concentrações de citocinas livres na circulação sanguínea geralmente são muito baixas e os valores reportados obtidos variam consideravelmente (SHIDA et al., 2004; MCCANDLESS et al., 2014; MAJEWSKA et al., 2016). Além disso, o teste de ELISA, utilizada nessa determinação, não identifica a fonte celular produtora da citocina. A técnica de citometria de fluxo utilizada permite que a produção das citocinas seja avaliada em nível celular, de forma rápida e simultânea (FARRELL et al., 2001)

No presente estudo não foi verificado efeito significativo do tratamento em relação à produção de citocinas inflamatórias IL-4 e IFN- γ pelos linfócitos CD4+ e CD8+, mesmo quando estimuladas com o alérgeno específico, durante os 12 meses de tratamento (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito do tempo sobre os valores médios de imunofenotipagem *in vitro*, em culturas sem estímulo (CC) e estimuladas com ácaro *Dermatophagoides farinae* (Ag)

Variáveis		β^1	E.P.(β) ²	Exp(β) ³	I.C.-95% ⁴	Valor-P
CD4+ IFN+	CC	-0,015	0,023	0,985	[0,941; 1,030]	0,505
	Ag	-0,016	0,024	0,984	[0,938; 1,032]	0,504
CD4+ IL4+	CC	-0,039	0,023	0,962	[0,919; 1,007]	0,096
	Ag	-0,032	0,026	0,968	[0,921; 1,018]	0,212
CD8 +IFN+	CC	-0,038	0,030	0,963	[0,907; 1,021]	0,206
	Ag	-0,028	0,044	0,972	[0,892; 1,059]	0,515
CD8+ IL-4+	CC	-0,039	0,034	0,962	[0,900; 1,028]	0,253
	Ag	0,004	0,037	1,004	[0,934; 1,079]	0,913

¹Coefficiente de Regressão; ²Erro Padrão; ³Exponencial do Coeficiente; ⁴Intervalo de 95% de Confiança. Valor P>0,05 representa dados não significativos estatisticamente.

Consegue-se observar uma tendência de decréscimo de CD4+IL-4+ com o tempo, mas sem significância estatística, tanto na cultura sem estímulo (Gráfico 8), como na cultura estimulada (Gráfico 9). Neste, pode ser observada também tendência de decréscimo de CD8+IFN- γ +, mas sem significância estatística. Não há dados disponíveis na literatura, até a presente data, sobre a influência do uso de maleato de oclacitinib na produção de IL-4 e IFN- γ por subtipos linfocitários CD4+ e CD8+. Um estudo humano verificou que a ciclosporina foi capaz de reduzir em 50% a porcentagem de CD4+IL4+ após oito dias do início da terapia (FARRELL et al., 2001). Porém, a ciclosporina é um fármaco com ação inibitória da calcineurina, uma enzima essencial para ativação de linfócitos T e conseqüentemente, reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias (STEFFAN et al., 2005; NUTTALL et al., 2014; OLIVRY et al., 2014). Por outro lado, o maleato de oclacitinib apresenta a sua eficácia por inibição na sinalização das citocinas pruritogênicas e não por interferência em sua produção.

Diversas citocinas são dependentes da JAK1, incluindo as que utilizam uma subunidade de receptor compartilhada, denominada de cadeia γ (γc , γ chain), como IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21, citocinas que utilizam uma outra subunidade de receptor compartilhada gp130, como as IL-6, IL-11, IL-12, fator estimulador de colônia de granulócitos (G-CSF, *granulocyte colony-stimulating factor*) e IFN- γ (YAMAOKA et al., 2004). Além disso, essa enzima participa da sinalização das citocinas pruritogênicas como a IL-31 (GONZALES et al., 2013).

Gráfico 8 – Valores médios, com respectivos desvios padrão, da mensuração de produção de IL-4 e IFN- γ por linfócitos CD4+ e CD8+ em cultura sem estímulo antigênico, por citometria de fluxo, em cães com dermatite atópica canina, e tratados com maleato de oclacitinib por um ano

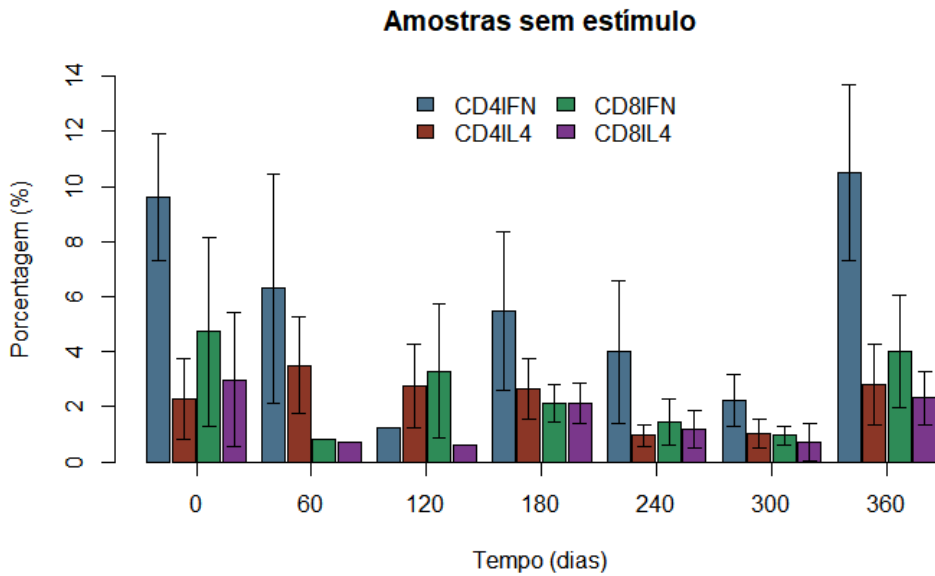
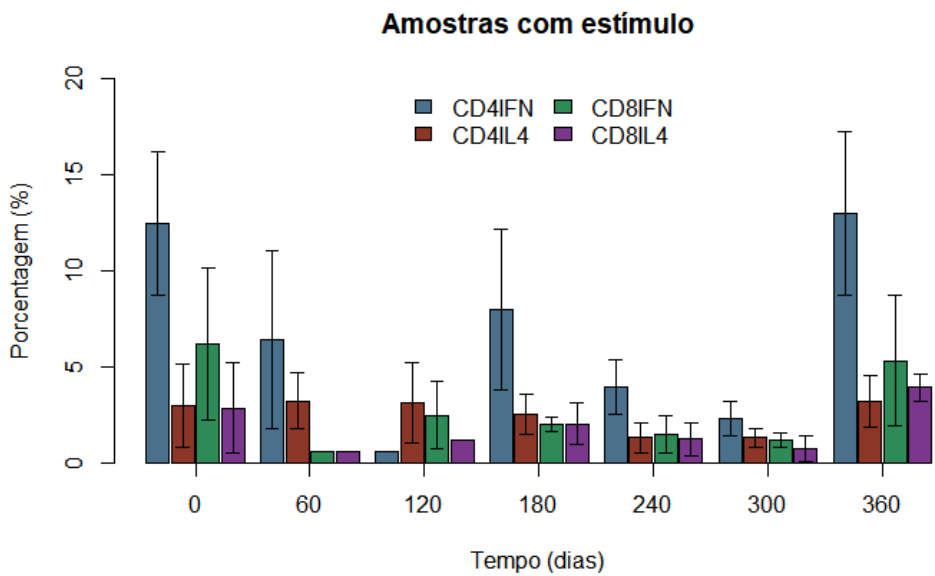


Gráfico 9 – Valores médios, com respectivos desvios padrão, da mensuração de produção de IL-4 e IFN- γ por linfócitos CD4+ e CD8+ em cultura com estímulo antigênico com o ácaro *Dermatophagoides farinae*, por citometria de fluxo, em cães com dermatite atópica canina, e tratados com maleato de oclacitinib por um ano.



CONCLUSÕES

- 1- O maleato de oclacitinib foi eficaz em reduzir prurido e conseqüentemente o quadro sintomato-lesional de cães com dermatite atópica
- 2- O uso regular do maleato de oclacitinib por 12 meses não interfere com os índices hematológicos, porém há uma tendência à linfopenia, trombocitopenia e eosinofilia. Portanto orienta-se uma monitorização continua desses valores ao longo de todo o período da utilização do maleato de oclacitinib.
- 3- O uso regular de maleato de oclacitinib por 12 meses não interfere com os índices bioquímicos, entretanto há uma tendência a aumento da fosfatase alcalina e GGT, o que sugere colangiopatias ou colestase. Portanto orienta-se a monitorização de enzimas hepáticas, devido as respostas individuais durante o uso regular desse medicamento.
- 4- Não há indícios de imunomodulação por meio da avaliação das subpopulações linfocitárias, já que, além de um aumento de CD4+, provavelmente pelo curso da própria doença, a razão CD4+/CD8+ manteve-se relativamente constante.
- 5- A eficácia do maleato de oclacitinib não está correlacionada com alterações da IL-4 e IFN- γ pelas linfócitos T auxiliares e citotóxicos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A DAC é uma doença crônica e incurável. Há diversas modalidades terapêuticas disponíveis, mas que podem demorar a agir, ou apresentar à longo prazo efeitos colaterais importantes que prejudiquem a qualidade de vida dos animais.

O maleato de oclacitinib é um fármaco, que possui eficácia comprovada na redução rápida do prurido e na melhora das lesões cutâneas. Os estudos que mostram a sua segurança são baseados em hematologia e perfil bioquímico. Assim, o presente estudo contribuiu para evidenciar que além de eficaz, esse fármaco não influenciou negativamente nas subpopulações linfocitárias durante um ano de utilização continua. Portanto, é um fármaco sem características de imunossupressão e pode assim, ser considerado uma opção segura à longo prazo para o controle da dermatite atópica canina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AUXILIA, S. T.; HILL, P. B. Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanations for the predilection sites of atopic dermatitis? **Veterinary Dermatology**, v. 11, n. 4, p. 247–254, 2000.
- 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, 2009.
- BECCATI, M.; MARTINI, V.; COMAZZI, S.; FANTON, N.; CORNEGLIANI, L. Lymphocyte subpopulations and Treg cells in dogs with atopic dermatitis receiving ciclosporin therapy: A prospective study. **Veterinary Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 17-e5, 2016.
- 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, n. 2, p. 95-e26, 2015a.
- 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, n. 2, p. 79-e24, 2015b.
- BOTONI, L. S.; MARTINS, G. D. C.; GOMES, C.; BATISTA, L. M.; COSTA-VAL, A. P. Prevalência de reações positivas a alérgenos causadores de dermatite atópica em cães na região metropolitana de Belo Horizonte. **Medvep Dermato- Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária**, v. 2, n. 3, p. 140–146, 2012.
- BYRNE, K. M.; KIM, H. W.; CHEW, B. P.; REINHART, G. A.; HAYEK, M. G. A standardized gating technique for the generation of flow cytometry data for normal canine and normal feline blood lymphocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 2, p. 167–182, 2000.
- CHABANNE, L.; MARCHAL, T.; DENEROLLE, P.; MAGNOL, J. P.; FOURNEL,

C.; MONIER, J. C.; RIGAL, D. Lymphocyte subset abnormalities in German shepherd dog pyoderma (GSP). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 49, n. 3, p. 189–198, 1995.

CHAPLIN, S. Tofacitinib: a janus kinase inhibitor for rheumatoid arthritis. v. 28, n. 8, p. 30–32, 2017.

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

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.

COSGROVE, S. B.; WREN, J. A.; CLEAVER, D. M.; MARTIN, D. D.; WALSH, K. F.; HARFST, J. A.; FOLLIS, S. L.; KING, V. L.; BOUCHER, J. F.; STEGEMANN, M. R. Efficacy and safety of oclacitinib for the control of pruritus and associated skin lesions in dogs with canine allergic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 5, 2013a.

COSGROVE, S. B.; WREN, J. A.; CLEAVER, D. M.; WALSH, K. F.; FOLLIS, S. I.; KING, V. I.; TENA, J. K. S.; STEGEMANN, M. R. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the Janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel®) in client-owned dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 6, 2013b.

CURTIS, J. R.; LEE, E. B.; KAPLAN, I. V.; KWOK, K.; GEIER, J.; BENDA, B.; SOMA, K.; WANG, L.; RIESE, R. Tofacitinib, an oral Janus kinase inhibitor: analysis of malignancies across the rheumatoid arthritis clinical development programme. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v. 75, n. 5, p. 831–841, 2016.

DE MORA, F.; DE LA FUENTE, C.; JASMIN, P.; GATTO, H.; MARCO, A.; FERRER, L.; FONDATI, A.; FONDEVILA, D.; TORRES, R. Evaluation of the expression of P-selectin, ICAM-1, and TNF-alpha in bacteria-free lesional skin of

atopic dogs with low-to-mild inflammation. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 115, p. 223–229, 2007.

DERELANKO, M. J.; HOLLINGER, M. a. **Handbook of Toxicology. Second Edition Edited by Michael J. Derelanko (Honeywell International Inc., Morristown, New Jersey) and Mannfred A. Hollinger (University of California, Davis). CRC Press: Boca Raton. 2002.**v. 124

DEVRIESE, L. A.; VANCANNEYT, M.; BAELE, M.; VANEECHOUTTE, M.; DE GRAEF, E.; SNAUWAERT, C.; CLEENWERCK, I.; DAWYNDT, P.; SWINGS, J.; DECOSTERE, A.; HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1569–1573, 2005.

DI CESARE, A.; DI MEGLIO, P.; NESTLE, F. O. A role for Th17 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis? **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 11, p. 2569–2571, 2008.

FALDYNA, M.; LEVÁ, L.; KNÖTIGOVÁ, P.; TOMAN, M. Lymphocyte subsets in peripheral blood of dogs--a flow cytometric study. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 82, n. 1–2, p. 23–37, 2001.

FARRELL, A. M.; ANTROBUS, P.; SIMPSON, D.; POWELL, S.; CHAPEL, H. M.; FERRY, B. L. A rapid flow cytometric assay to detect CD4+ and CD8+ T-helper (Th) 0, Th1 and Th2 cells in whole blood and its application to study cytokine levels in atopic dermatitis before and after cyclosporin therapy. **British Journal of Dermatology**, v. 144, n. 1, p. 24–33, 2001.

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. 23–30, 2010.

FORSYTHE, P.; PATERSON, S. Ciclosporin 10 years on: indications and efficacy. **The Veterinary record**, v. 174 Suppl, p. 13–21, 2014.

FUJIWARA, R. T.; BUENO, L. L.; VALE, a M.; FRANCA-SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; QUETZ, J. D. S.; MACHADO-COELHO, G. L.; REIS, a B.; MARTINS FILHO, O. a; GENARO, O.; NASCIMENTO, E.; MAYRINK, W. Flow

cytometric assay in peripheral blood of dogs--reference values for leukocytes from Brazilian beagles. **Polish journal of veterinary sciences**, v. 8, n. 1, p. 17–22, 2005.

GADEYNE, C.; LITTLE, P.; KING, V. L.; EDWARDS, N.; DAVIS, K.; STEGEMANN, M. R. Efficacy of oclacitinib (Apoquel) compared with prednisolone for the control of pruritus and clinical signs associated with allergic dermatitis in client-owned dogs in Australia. **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 6, p. 512-e86, 2014.

GERMAN, A. J.; HALL, E. J.; DAY, M. J. Measurement of IgG, IgM and IgA concentrations in canine serum, saliva, tears and bile. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 2, p. 107–121, 1998.

GHORESCHI, K.; LAURENCE, A.; SHEA, J. J. O. Janus kinases in immune cell signaling. **Immunological Reviews**, v. 228, n. 1, p. 273–287, 2010.

GONZALES, A. J.; BOWMAN, J. W.; FICI, G. J.; ZHANG, M.; MANN, D. W.; MITTON-FRY, M. Oclacitinib (APOQUEL??) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 37, n. 4, p. 317–324, 2014.

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

GONZALES, A. J.; HUMPHREY, W. R.; MESSAMORE, J. E.; FLECK, T. J.; FICI, G. J.; SHELLY, J. A.; TEEL, J. F.; BMMERT, G. F.; DUNHAM, S. A.; FULLER, T. E.; MCCALL, R. B. Interleukin-31: Its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 24, n. 1, 2013.

GUERRA, L. L.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; MARTINS-FILHO, O. A.; REIS, A. B.; CORRÊA-OLIVEIRA, R. Evaluation of the influence of tissue parasite density on hematological and phenotypic cellular parameters of circulating leukocytes and splenocytes during ongoing canine visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 104, n. 3, p. 611–622, 2009.

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

- HALLIWELL, R. E. W.; DEBOER, D. J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (III): The role of antibodies in canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, n. 3–4, p. 159–167, 2001.
- HALLIWELL, R. E. W.; SCHWARTZMAN, R. .; ROCKEY, J. . Antigenic relationship between human IgE and canine IgE. **Clinical and experimental immunology**, v. 10, p. 399–407, 1972.
- HAMID, Q.; BOGUNIEWICZ, M.; LEUNG, D. Y. M. Differential in situ cytokine gene expression in acute versus chronic atopic dermatitis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 94, n. 2, p. 870–876, 1994.
- HARRISON, D. A. The JAK/STAT pathway. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 3, p. 1–4, 2012.
- HENNINO, A.; VOCANSON, M.; TOUSSAINT, Y.; RODET, K.; BENETIERE, J.; SCHMITT, A.-M.; ARIES, M.-F.; BERARD, F.; ROZIERES, A.; NICOLAS, J.-F. Skin-Infiltrating CD8+ T Cells Initiate Atopic Dermatitis Lesions. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 9, p. 5571–5577, 2007.
- HENSEL, P.; SANTORO, D.; FAVROT, C.; HILL, P.; GRIFFIN, C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. **BMC veterinary research**, v. 11, p. 196, 2015.
- 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. 88–95, 2010.
- HILL, P. B.; DEBOER, D. J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis IV - environmental allergens. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p. 169–186, 2001.
- HILL, P. B.; MORIELLO, K. A.; DEBOER, D. J. Concentration of total serum igE, igA, and igG in atopic and parasited dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 44, p. 105–113, 1995.
- HILLIER, A.; GRIFFIN, C. E. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (X): Is there a relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, n. 3–4, p. 227–231,

2001.

HORIUCHI, Y.; NAKAJIMA, Y.; NARIAI, Y.; ASANUMA, H.; KUWABARA, M.; YUKAWA, M. Th1/Th2 balance in canine peripheral blood lymphocytes-A flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 118, n. 3–4, p. 179–185, 2007.

HOSGOOD, G. Reparo de Feridas e Resposta Tecidual Específica à Lesão. In: SLATTER, D. (Ed.). **Manual de cirurgia de pequenos animais**. New York: Elsevier Science, 2003. p. 66–86.

HSIAO, Y.-H.; CHEN, C.; WILLEMSE, T. Effects of cetirizine in dogs with chronic atopic dermatitis: a randomized, double blind, placebo-controlled trial. **Journal of Veterinary Science**, v. 17, n. 4, p. 549–553, 2016.

INMAN, O.; OLIVRY, T.; DUNSTON, S. M.; MONTEIRO-RIVIERE, N.; GATTO, H. Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids in normal and atopic dogs. **Veterinary pathology**, v. 38, n. 6, p. 720–723, 2001.

JASSIES-VAN DER LEE, A.; RUTTEN, V. P. M. G.; BRUIJN, J.; WILLEMSE, T.; BROERE, F. CD4⁺ and CD8⁺ skin-associated T lymphocytes in canine atopic dermatitis produce interleukin-13, interleukin-22 and interferon- γ and contain a CD25⁺FoxP3⁺ subset. **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 5, p. 456–72, 2014.

JATIANI, S. S.; BAKER, S. J.; SILVERMAN, L. R.; REDDY, E. P. JAK/STAT Pathways in Cytokine Signaling and Myeloproliferative Disorders: Approaches for Targeted Therapies. **Genes & Cancer**, v. 1, n. 10, p. 979–993, 2010.

KABURAGI, Y.; SHIMADA, Y.; NAGAOKA, T.; HASEGAWA, M.; TAKEHARA, K.; SATO, S. Enhanced production of CC-chemokines in patients with atopic dermatitis. **Arch Dermatol Res**, v. 293, p. 350–355, 2001.

KAROL, M. H. Target organs and systems: Methodologies to assess immune system function. **Environmental Health Perspectives**, v. 106, p. 533–540, 1998.

KENNEDY, M. A. A Brief Review of the Basics of Immunology: The Innate and Adaptive Response. **Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice**, v. 40, n. 3, p. 369–379, 2010.

KEPPEL, K. E.; CAMPBELL, K. L.; ZUCKERMANN, F. A.; GREELEY, E. A.;

- SCHAEFFER, D. J.; HUSMANN, R. J. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3–4, p. 337–344, 2008.
- KISSELEVA, T.; BHATTACHARYA, S.; BRAUNSTEIN, J. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. **Gene**, v. 285, p. 1–24, 2002.
- LEONARD, W. J.; SHEA, J. J. O. JAKS AND STATS : Biological implications. **Annu. Rev. Immunol**, n. 1, p. 293–322, 1998.
- LEONARDI, S.; ROTOLO, N.; VITALITI, G.; SPICUZZA, L.; LA ROSA, M. IgE values and T-lymphocyte subsets in children with atopic eczema/dermatitis syndrome. **Allergy and Asthma Proceedings**, v. 28, n. 5, p. 529–534, 2007.
- LIANG, K. Y. E ZEGER, S.L. Longitudinal data analysis using generalized linear models. **Biometrika**, v. 73, n. 1, p. 13-22, 1986.
- LITTLE, P. R.; KING, V. L.; DAVIS, K. R.; COSGROVE, S. B.; STEGEMANN, M. R. A blinded, randomized clinical trial comparing the efficacy and safety of oclacitinib and ciclosporin for the control of atopic dermatitis in client-owned dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 26, n. 1, p. 23-e8, 2015.
- LUSTER, M. I.; MUNSON, A. E.; THOMAS, P. T.; HOLSAPPLE, M. P.; FENTERS, J. D.; WHITE, K. L.; LAUER, L. D.; GERMOLEC, D. R.; ROSENTHAL, G. J.; DEAN, J. H. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National toxicology program’s guidelines for immunotoxicity evaluation in mice. **Toxicological Sciences**, v. 10, n. 1, p. 2–19, 1988.
- 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.
- MAJEWSKA, A.; GAJEWSKA, M.; DEMBELE, K.; MACIEJEWSKI, H.; PROSTEK,

A.; JANK, M. Lymphocytic, cytokine and transcriptomic profiles in peripheral blood of dogs with atopic dermatitis. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 174, 2016.

MARCUSSON-STÅHL, M.; CEDERBRANT, K. A flow-cytometric NK-cytotoxicity assay adapted for use in rat repeated dose toxicity studies. **Toxicology**, v. 193, n. 3, p. 269–279, 2003.

MARSELLA, R.; AHRENS, K.; SANFORD, R. Investigation of the correlation of serum IL-31 with severity of dermatitis in an experimental model of canine atopic dermatitis using beagle dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 442, p. 441–442, 2017.

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.; HARRINGTON, L. Immunohistochemical evaluation of filaggrin polyclonal antibody in atopic and normal beagles. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5–6, p. 547–554, out. 2009.

MARSELLA, R.; SOUSA, C. A.; GONZALES, A. J.; FADOK, V. A. Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 241, n. 2, p. 194–207, 2012.

MARTINS, G. D. C.; MARTINS, B. D. C.; BOTONI, L. S.; MELO, M. M.; COSTA-VAL, A. P. Acute neurotoxicity in two yorkshire terriers after use of cyclosporine. **Medvep Dermato- Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária**, v. 3, n. 10, p. 266–268, 2014.

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.

MCCULLAGH, P. E NELDER, J. A. Generalized linear models. CRC press, 1989.

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, 2016a.

HOLLANDER, M.; WOLFE, D. A. Nonparametric Statistical Methods. New York: John Wiley & Sons, 1999.

MICHELS, G. M.; WALSH, K. F.; KRYDA, K. A.; MAHABIR, S. P.; WALTERS, R. R.; HOEVERS, J. D.; MARTINON, O. M. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the safety 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. 505-e136, 2016b.

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

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.

MUSSO, T.; JOHNSTON, J. A.; LINNEKIN, D.; VARESIO, L.; ROWE, T. K.; SHEA, J. J. O.; MCVICAR, D. W. Regulation of JAK3 expression in Human Monocytes: Phosphorylation in response to interleukins 2,4 and 7. **The journal of experimental medicine**, v. 181, p. 1425–1431, 1995.

NAM, E. H.; PARK, S. H.; JUNG, J. Y.; HAN, S. H.; YOUN, H. Y.; CHAE, J. S.; HWANG, C. Y. Evaluation of the effect of a 0.0584 % hydrocortisone aceponate spray on clinical signs and skin barrier function in dogs with atopic dermatitis. **Journal of Veterinary Science**, v. 13, n. 2, p. 187–191, 2012.

NUTTALL, T.; REECE, D.; ROBERTS, E. Life-long diseases need life-long treatment_long term safety of ciclosporin in canine atopic dermatitis. **Veterinary Record**, v. 174, p. 3–12, 2014.

NUTTALL, T.; URI, M.; HALLIWELL, R. Canine atopic dermatitis - what have we learned? **The Veterinary record**, v. 172, n. 8, p. 201–207, 2013.

ODA, H.; MORI, A.; SHONO, S.; ONOZAWA, E.; SAKO, T. The effect of 1 year of

trilostane treatment on peripheral lymphocyte subsets in dogs with pituitary-dependent hyperadrenocorticism. **J. Vet. Med. Sci**, v. 78, n. 5, p. 851–854, 2016.

OKAZAKI, H.; KAKURAI, M.; HIRATA, D.; SATO, H.; KAMIMURA, T.; ONAI, N.; MATSUSHIMA, K.; NAKAGAWA, H.; KANO, S.; MINOTA, S. Characterization of chemokine receptor expression and cytokine production in circulating CD4+ T cells from patients with atopic dermatitis: up-regulation of C-C chemokine receptor 4 in atopic dermatitis. **Clinical and experimental allergy**, v. 32, p. 1236–1242, 2002.

OLIVEIRA, C. D.; LARSSON, C. E.; DE CAMARGO, M. M. Longitudinal assessment of T-lymphocyte subpopulations during generalized demodicosis in dogs and their relationship with remission. **Veterinary Dermatology**, v. 26, n. 1, p. 18-e6, 2015.

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

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

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. 1–15, 16 dez. 2015.

OLIVRY, T.; FOSTER, A. P.; MUELLER, R. S.; MCEWAN, N. A.; CHESNEY, C.; WILLIAMS, H. C. Interventions for atopic dermatitis in dogs: A systematic review of randomized controlled trials. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 1, p. 4–22, 2010b.

OLIVRY, T.; MOORE, P. F.; AFFOLTER, V. K.; NAYDAN, D. K. Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. **Arch Dermatol Res**, v. 288, n. 10, p. 579–585, 1996.

OLIVRY, T.; RIVIERRE, C.; JACKSON, H. A.; MURPHY, K. M.; DAVIDSON, G.; SOUSA, C. A. Cyclosporine decreases skin lesions and pruritus in dogs with atopic dermatitis: A blinded randomized prednisolone-controlled trial. **Veterinary Dermatology**, v. 13, n. 2, p. 77–87, 2002.

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. 77–86, 2014.

OLIVRY, T.; SOUSA, C. A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XX): Glucocorticoid pharmacotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, n. 3–4, p. 317–322, 2001.

OLIVRY, T.; STEFFAN, J.; FISCH, R. Randomized controlled trial of the efficacy of cyclosporine in the treatment of atopic dermatitis in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 2002.

PALMER, C. N. a; IRVINE, A. D.; TERRON-KWIATKOWSKI, A.; ZHAO, Y.; LIAO, H.; LEE, S. P.; GOUDIE, D. R.; SANDILANDS, A.; CAMPBELL, L. E.; SMITH, F. J. D.; O'REGAN, G. M.; WATSON, R. M.; CECIL, J. E.; BALE, S. J.; COMPTON, J. G.; DIGIOVANNA, J. J.; FLECKMAN, P.; LEWIS-JONES, S.; ARSECULERATNE, G.; SERGEANT, A.; MUNRO, C. S.; EL HOUATE, B.; MCELREAVEY, K.; HALKJAER, L. B.; BISGAARD, H.; MUKHOPADHYAY, S.; MCLEAN, W. H. I. 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.

PARGANAS, E.; WANG, D.; STRAVOPODIS, D.; TOPHAM, D. J.; MARINE, J. C.; TEGLUND, S.; VANIN, E. F.; BODNER, S.; COLAMONICI, O. R.; VAN DEURSEN, J. M.; GROSVELD, G.; IHLE, J. N. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. **Cell**, v. 93, n. 3, p. 385–395, 1998.

PEDERSEN, N. C. A review of immunologic diseases of the dog. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 69, n. 2–4, p. 251–342, 1999.

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.

PUCHEU-HASTON, C. M. Atopic dermatitis in the domestic dog. **Clinics in dermatology**, v. 34, p.299-303.

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, 2015a.

PUCHEU-HASTON, C. M.; SANTORO, D.; BIZIKOVA, P.; EISENSCHENK, M. N. C.; MARSELLA, R.; NUTTALL, T. Review: Innate immunity, lipid metabolism and nutrition in canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 26, n. 2, p. 104-e28, 2015b.

QUINTÁS-CARDAMA, A. The role of Janus kinase 2 (JAK2) in myeloproliferative neoplasms: Therapeutic implications. **Leukemia Research**, v. 37, n. 4, p. 465–472, 2013.

RANE, S. G.; REDDY, E. P. Janus kinases: components of multiple signaling pathways. **Oncogene**, v. 19, n. 49, p. 5662–5679, 2000.

RAWLINGS, J. S.; ROSLER, K. M.; HARRISON, D. A. The JAK/STAT signaling pathway. **Journal of Cell Science**, v. 117, n. 8, p. 1281–1283, 2004.

REIF JS. The epidemiology and incidence of cancer. In: WITHROW; SJ, M. G. (Ed.). **Small Animal Clinical Oncology**. 4. ed. Philadelphia: Saunders, 2007. p. 68–76.

REIS, A. B.; CARNEIRO, C. M.; CARVALHO, M. D. G.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; GIUNCHETTI, R. C.; MAYRINK, W.; GENARO, O.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O. A. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 103, n. 3–4, p. 173–185, 2005.

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.

RINKARDT, N. E.; KRUTH, S. A.; KAUSHIK, A. The effects of prednisone and

azathioprine on circulating immunoglobulin levels and lymphocyte subpopulations in normal dogs. **Canadian Journal of Veterinary Research**, v. 63, n. 1, p. 18–24, 1999.

ROSENKRANTZ, W. S.; BOURGEOIS, A. . Pros and cons of oclacitinib therapy. In: TORRES, S. M. F.; ROUDEBUSH, P. (Ed.). **Advances in Veterinary Dermatology**. John Wiley ed. [s.l.] Wiley Blackwell, 2017. 1.

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, n. 2, p. 115–122, 2009.

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, 2013.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; OLIVRY, T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 207, p. 29–37, 2016a.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; OLIVRY, T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 207, p. 29–37, 2016b.

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

SCHNABL, B.; BETTENAY, S. V.; DOW, K.; MUELLER, R. S. Results of allergen-specific immunotherapy in 117 dogs with atopic dermatitis. **The Veterinary record**, v. 158, p. 81–85, 2006.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H. Antihistamines in the management of allergic pruritus in dogs and cats. **The Journal of small animal practice**, v. 40, n. 8, p. 359–364, 1999.

SHAW, S. A therapeutic approach to allergic pruritus in the dog. **In Practice**, v. 35, n. November, p. 24–29, 2013.

SHIDA, M.; KADOYA, M.; PARK, S. J.; NISHIFUJI, K.; MOMOI, Y.; IWASAKI, T. Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis.

Veterinary Immunology and Immunopathology, v. 102, n. 1–2, p. 19–31, 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. 541–546, out. 2009.

SHIMODA, K.; KATO, K.; AOKI, K.; MATSUDA, T.; MIYAMOTO, a;
SHIBAMORI, M.; YAMASHITA, M.; NUMATA, a; TAKASE, K.; KOBAYASHI, S.; SHIBATA, S.; ASANO, Y.; GONDO, H.; SEKIGUCHI, K.; NAKAYAMA, K.; NAKAYAMA, T.; OKAMURA, T.; OKAMURA, S.; NIHO, Y.; NAKAYAMA, K.
Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function. **Immunity**, v. 13, n. 4, p. 561–571, 2000.

SIMOU, C; THODAY, KL; FORSYTHE, P. . Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 352–361, 2005.

SIMPSON, A. C.; SCHISLER, J. R.; ROSYCHUK, R. A. W.; MOORE, A. R. The frequency of urinary tract infection and subclinical bacteriuria in dogs with allergic dermatitis treated with oclacitinib: a prospective study. **Veterinary Dermatology**, 17 maio 2017.

SINKE, J. D.; RUTTEN, V. P. M. G.; WILLEMSE, T. Immune dysregulation in atopic dermatitis. v. 87, p. 351–356, 2002.

STEFFAN, J.; FAVROT, C.; MUELLER, R. A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of cyclosporin for the treatment of atopic dermatitis in dogs. **Veterinary dermatology**, p. 3–16, 2006.

STEFFAN, J.; PARKS, C.; SEEWALD, W. Clinical trial evaluating the efficacy and safety of cyclosporine in dogs with atopic dermatitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 11, p. 1855–1863, 2005.

TARRANT, J. M. The role of flow cytometry in companion animal diagnostic medicine. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 170, n. 3, p. 278–88, 2005.

THEPEN, T.; LANGEVELD-WILDSCHUT, E. G.; BIHARI, I. C.; VAN WICHEN, D.

F.; VAN REIJSSEN, F. C.; MUDDE, G. C.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C. A. F. M. Biphasic response against aeroallergen in atopic dermatitis showing a switch from an initial TH2 response to a TH1 response in situ: An immunocytochemical study. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 97, n. 3, p. 828–837, 1996.

TODA, M.; LEUNG, D. Y. M.; MOLET, S.; BOGUNIEWICZ, M.; TAHA, R.; CHRISTODOULOPOULOS, P.; FUKUDA, T.; ELIAS, J. A.; HAMID, Q. A. Polarized in vivo expression of IL-11 and IL-17 between acute and chronic skin lesions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 4, p. 875–881, 2003.

VELAZQUEZ, L.; ET AL. A protein tyrosine kinase in the interferon α/β signaling pathway. **Cell**, v. 70, p. 313–322, 1992.

VERDE, M.; MAGALLON, P.; MARTELES, D.; VILLANUEVA, S. Experiencia con Apoquel (oclacitinib) después de dos años de uso en España por el grupo de expertos en dermatología de AVEPA GTA. **Argos Veterinaria**, n. 178, p. 64–65, 2016.

VON FREEDEN-JEFFRY, U.; VIEIRA, P.; LUCIAN, L. A.; MCNEIL, T.; BURDACH, S. E.; MURRAY, R. Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine. **J Exp Med**, v. 181, n. 4, p. 1519–1526, 1995.

WELLE, M.; OLIVRY, T.; GRIMM, S.; SUTER, M. Mast cell density and subtypes in the skin of Dogs with atopic dermatitis. **Journal of Comparative Pathology**, v. 120, n. 5, p. 187–197, 1999.

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

WILKIE, J. S.; YAGER, J. a; EYRE, P.; PARKER, W. M. Morphometric analyses of the skin of dogs with atopic dermatitis and correlations with cutaneous and plasma histamine and total serum IgE. **Veterinary pathology**, v. 27, p. 179–186, 1990.

WOOD, S. H.; KE, X.; NUTTALL, T.; MCEWAN, N.; OLLIER, W. E.; CARTER, S. D. Genome-wide association analysis of canine atopic dermatitis and identification of disease related SNPs. **Immunogenetics**, v. 61, n. 11–12, p. 765–772, 2009.

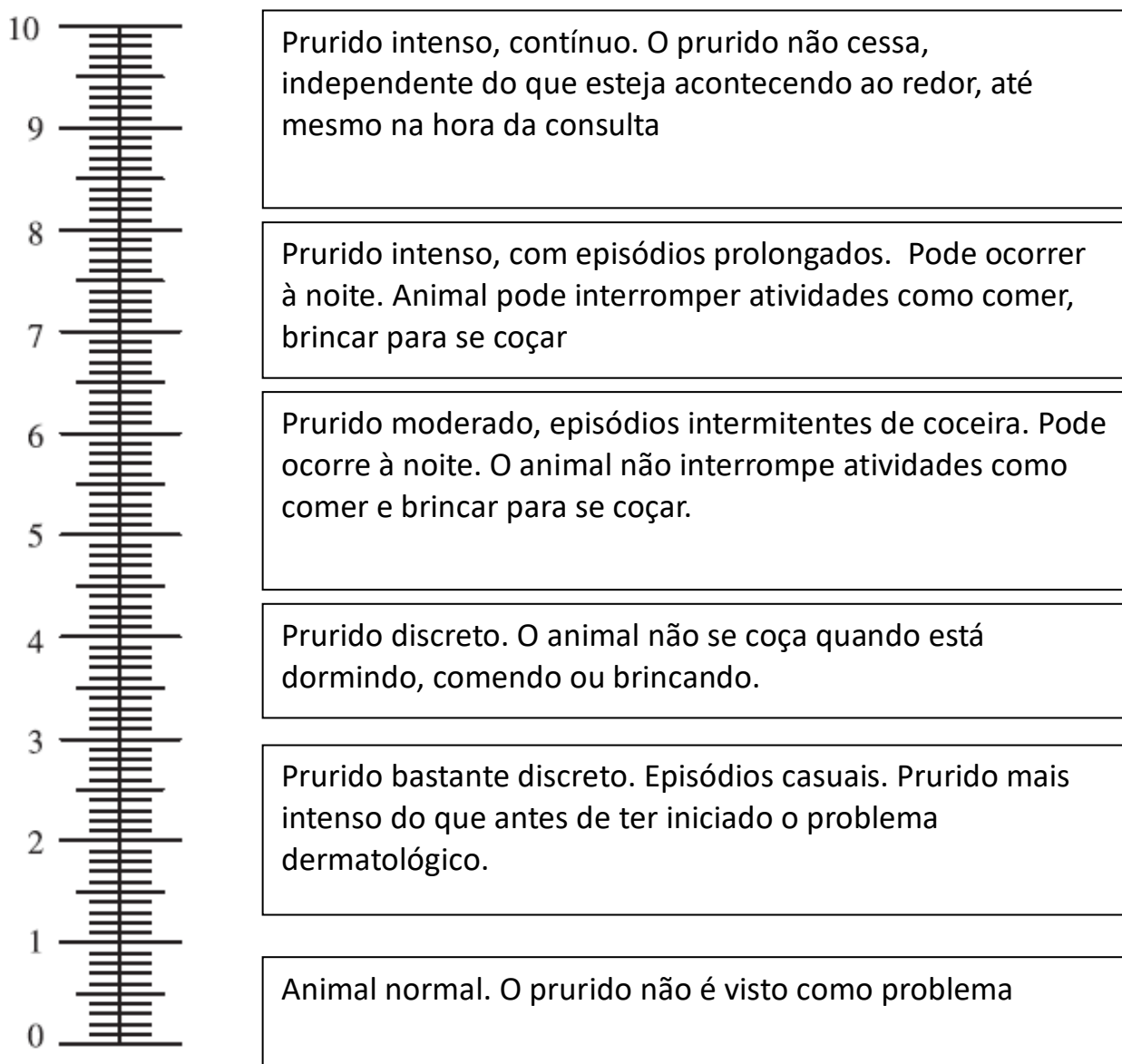
YAMAOKA, K.; SAHARINEN, P.; PESU, M.; ET, V.; III, H.; SILVENNOINEN, O.; SHEA, J. J. O. Protein family review The Janus kinases (Jaks). **Genome Biology**, v. 5,

n. 12, p. 253.0-253.6, 2004.

ANEXO 1- ESCALA VISUAL ANÁLOGA (VAS)

Quanto o seu cão se coça?

Utilize essa escala para mensurar a intensidade da coceira do seu cão. A coceira pode se manifestar de diversas formas como: arranhaduras, roçar em objetos, lambeduras e mordiscamentos. Leia todas as descrições abaixo, iniciando do ponto 0 e aponte em qual valor de 0-10, associando às descrições ao lado, você acredita que seja a intensidade da coceira do seu cão.



Fonte: adaptado de (Hill et al., 2007; Rybnicek et al., 2009)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 57 / 2016, relativo ao projeto intitulado “Avaliação da eficácia e efeitos tóxicos da utilização prolongada do maleato de oclacitinib no controle da dermatite atópica canina”, que tem como responsável MARILIA MARTINS MELO, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMG), tendo sido aprovado na reunião de 07/06/2016. Este certificado espira-se em 07/06/2021.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Protocol nº. 57 / 2016, related to the Project entitled “Evaluation of efficacy and toxicity after long-term use of oclacitinib maleate in canine atopic dermatitis”, under the supervision of MARILIA MARTINS MELO, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEUA/UFMG), and was approved in 07/06/2016. This certificate expires in 07/06/2021.

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3499-4516 – Fax: (31) 3499-4592

www.ufmg.br/bioetica/cetea - cetea@prpq.ufmg.br

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>

ANEXO 3- TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO UTILIZADO NO HOSPITAL VETERINÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)



Universidade Federal de Minas Gerais
Comitê de Ética no Uso de Animais- CEUA

Você, _____ é convidado(a), como tutor(a) ou responsável pelo(a) paciente _____, da espécie canina, raça _____, sexo _____, com _____ de idade, à incluir o animal referido na pesquisa intitulada “Avaliação da eficácia e segurança da utilização prolongada do maleato de oclacitinib no controle da dermatite atópica canina”.

A JUSTIFICATIVA, OS OBJETIVOS E PROCEDIMENTOS: a dermatite atópica é uma doença crônica e pruriginosa, e sua terapia é baseada em medicação contínua, com fármacos que podem ocasionar em diversos efeitos colaterais com uso crônico, como corticoesteróide, e terapias com efeito tardio na redução do prurido, o que acarreta diminuição da qualidade de vida do animal como ciclosporina e imunoterapia. O maleato de oclacitinib é uma alternativa terapêutica, com ação rápida e aparentemente seguro para uso crônico, já que é um fármaco utilizado nos EUA desde do início de 2014. Os objetivos deste estudo são de avaliar a eficácia e segurança do maleato de oclacitinib a longo prazo no tratamento da dermatite atópica canina e aumentar a possibilidade de escolha de fármacos para o tratamento da dermatite atópica canina. O tratamento com o fármaco será conduzido em casa, pelo próprio responsável pelo animal, mas o paciente deverá retornar ao Hospital nos dias pré determinados pela pesquisa em questão, para reavaliação clínica e coleta de sangue para monitorização da saúde do paciente e avaliação de imunotoxicidade por citometria de fluxo.

DESCONFORTOS, RISCOS E BENEFÍCIOS: existe um desconforto e risco mínimo para o paciente que será submetido à venopunção da veia jugular para a coleta de sangue, que se justifica pela necessidade de monitorização dos exames, necessária para a prevenção de efeitos adversos à medicação. Os benefícios relacionados com participação do animal são de melhorar a efetividade do tratamento da dermatite atópica canina, além de estabelecer protocolos mais seguros para o tratamento dessa afecção em relação aos tratamentos mais utilizados atualmente.

MÉTODOS ALTERNATIVOS EXISTENTES: caso você não concorde com os termos dessa pesquisa, o tratamento convencional será oferecido normalmente, sem o benefício do maleato de oclacitinib e envolvimento da pesquisa.

FORMA DE ACOMPANHAMENTO E ASSISTÊNCIA: caso sejam observadas alterações nos exames clínico ou complementares, relacionados ao uso da medicação, o paciente será acompanhado e encaminhado para tratamento adequado no Hospital Veterinário, com redução da dose ou suspensão da medicação, e tratamento sintomático.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTO, LIBERDADE DE RECUSA E GARANTIA DE SIGILO: você será esclarecido (a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar, inclusive sobre a metodologia. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade.

O (s) pesquisador (es) irá (ão) tratar a sua identidade, e do seu animal de estimação, com padrões profissionais de sigilo. Os resultados dos exames clínicos e laboratoriais poderão ser obtidos a qualquer momento por você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você e seu animal de estimação não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar desse estudo. Uma cópia desse consentimento informado será arquivada no Hospital Veterinário da UFMG e a outra será fornecida a você.

CUSTOS DA PARTICIPAÇÃO, RESSARCIMENTO E INDENIZAÇÃO POR EVENTUAIS DANOS: a participação no estudo não acarretará nenhum custo adicional, exceto aquele necessário para o tratamento do paciente e não será disponível nenhuma compensação financeira adicional. Não estão previstos nenhuma forma de compensação ou indenização caso o paciente ou proprietário sofra algum dano decorrente da pesquisa.

DECLARAÇÃO DO TUTOR OU RESPONSÁVEL PELO PACIENTE: eu, _____ fui informado (a) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. A professora orientadora Marília Martins Melo e a co-orientadora professora Adriane Pimenta da Costa Val Bicalho certificam-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Em casos de dúvidas poderei chamar o doutorando Guilherme De Caro Martins, a professora orientadora Marília Martins Melo ou a co-orientadora professora Adriane Pimenta da Costa Val no telefone (31) 3409-2276 ou o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Minas Gerais, situado à Av. Antônio Carlos Magalhães, 6627, Pampulha, prédio unidade administrativa II, 2º andar, sala 2005, Belo Horizonte, MG- 31270-901, no telefone 3499-4516.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dado a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas

Nome

Assinatura do participante

Data

Nome	Assinatura do pesquisador	Data
Nome	Assinatura da testemunha	

ANEXO 4- TABELA CADESI-IV

CADESI-04		Eritema	Liquenificação	Escoriação e/ou alopecia	TOTAL
Perilabial (lado direito e esquerdo combinados)	1				
Pavilhão auricular (parte medial)	Esquerda	2			
	Direita	3			
Axila	Esquerda	4			
	Direita	5			
Patas torácicas (avaliação dorsal e ventral)	Esquerda	6			
	Direita	7			
Patas lombares (avaliação dorsal e ventral)	Esquerda	8			
	Direita	9			
Flexura cubital (dobra do cotovelo)	Esquerda	10			
	Direita	11			
Metacarpo palmar	Esquerda	12			
	Direita	13			
Flanco	Esquerda	14			
	Direita	15			
Região inguinal	Esquerda	16			
	Direita	17			
Abdomen	18				

Períneo (vulva/escroto até o ânus)	19				
Cauda (ventro- proximal)	20				
Pontue cada região corporal associado ao tipo lesional: sem lesão (0); discreto (1), moderado (2), intenso (3)		Pontuação total (20 x 3 x 3= 180)			

ANEXO 5- CHECK LIST- FICHA INDIVIDUAL

DATA:

DIA DE AVALIAÇÃO PÓS INÍCIO DA DROGA: _____

NOME DO PACIENTE: RAÇA: SEXO: IDADE:

DOSAGEM DA MEDICAÇÃO:

EXAME FÍSICO

EG: T°C: FC: FR: MUCOSAS:

OBS:

MENSURAÇÃO DO PRURIDO

CADESI Avaliador 1: Avaliador 2: Avaliador 3:

FOTOS

COLETA DE SANGUE

- SANGUE TOTAL PARA HEMOGRAMA
- SANGUE TOTAL PARA CITOMETRIA DE FLUXO
- SANGUE PARA BIOQUÍMICA
- SANGUE PARA CITOCINAS
- ELETROCARDIOGRAMA
-

Próxima reavaliação dia _____

Procedimentos específicos a serem realizados na próxima reavaliação