

MARGARIDA ANTÓNIO MARTINS

**ESTUDO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE INTERLEUCINA-
31 (IL-31) EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA E
SOB TRATAMENTO COM LOKIVETMAB
(CYTOPOINT®)**

Orientador: Professora Doutora Margarida Alves

Coorientador: Doutora Diana Ferreira

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

MARGARIDA ANTÓNIO MARTINS

**ESTUDO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE INTERLEUCINA-
31 (IL-31) EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA E
SOB TRATAMENTO COM LOKIVETMAB
(CYTOPOINT®)**

Dissertação defendida em provas públicas para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Veterinária no curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, conferido pela Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, no dia 18 de Março de 2020, segundo o Despacho Reitoral nº85/2020, de 3 de Março, perante a seguinte composição de Júri:

Presidente: Professora Doutora Laurentina Pedroso

Arguente: Professora Doutora Maria Soares

Orientador: Professora Doutora Margarida Alves

Coorientador: Doutora Diana Ferreira.

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

Faculdade de Medicina Veterinária

Lisboa

2020

Quero, terei. Se não aqui;
noutro lugar que ainda não sei.

Nada perdi; tudo serei.

- Fernando Pessoa

Aos meus pais,
responsáveis pelo que sou hoje
e a quem eu devo tudo.

AGRADECIMENTOS

À ULHT-FMV pela educação de excelência que me proporcionaram ao longo de cinco anos e pela base de investigação que proporcionou à realização do presente trabalho.

À professora Margarida Alves, por toda a orientação, apoio e carinho dispendido.

À doutora Diana Ferreira, por ter aceite este desafio, pela exigência, apoio e me ter feito crescer a nível profissional e pessoal.

Ao doutor Joaquim Henriques, por me ter recebido no HVB.

À doutora Patrícia Duarte, pela orientação e todo o apoio e compreensão ao longo do estágio.

Ao Hospital Veterinário de Berna (HVB), por me proporcionar tão bons conhecimentos.

À doutora Rita Neres e Professora Raquel Matos pelo auxílio na área de estatística.

Ao Hospital Veterinário de Portimão (HVP), por desde sempre me aceitar e por me ter proporcionado bons conhecimentos ao longo de estágios extracurriculares.

À SOSPET Montijo, especialmente à Dr^a Susana Apolinário, por me ter acolhido em 2016.

À Clínica Veterinária de Telheiras pelos ensinamentos no meu segundo ano de curso.

À Império Animal, especialmente à Dr^a Ana Rita Pinto, por todo o apoio proporcionado ao longo desta fase.

Às minhas colegas estagiárias, Tiffany Pereira, Cristiana Pinto e Marta Monteiro, por percorrerem este caminho de estágio a meu lado.

Aos meus pais, pela paciência, orgulho, acreditarem e caminharem a meu lado em busca de um sonho.

À minha Irmã, Joana Martins, pela cumplicidade que me proporciona incansavelmente.

Ao meu sobrinho, Dinis Val, que ainda nem tinha nascido e já me proporcionava momentos esplêndidos.

Ao meu cunhado, Nuno Val, pelo humor em tempos mais difíceis.

À minha avó, Maria Adelina, por todas as perguntas de quando terminava.

À minha grande amiga, Tatiana Vasconcelos, por toda a compreensão, apoio e carinho recíproco não só nesta fase mas em toda a vida.

Às minhas amigas de infância, Sofia Belanciano, Rita Marques, Daniela Catarino e Carmen Dias, pela cumplicidade e pela paciência em tempos de ausência.

À minha grande amiga e companheira de curso, Rita Bruno, por todo o apoio em todos os aspetos possíveis e imagináveis.

Às minhas colegas e melhor grupo, Rita Bruno, Carolina Dias e Joana Oliveira, por todo o companheirismo, sem vocês não tinha sido a mesma coisa.

Aos meus outros colegas dos quais não posso deixar de referir, Nuno Santos, Maria Abecasis, Susie Marques, Beatriz Taborda, Ana Rita Silva, Luiza Pazini, Carlos Costa, João Dias, Francisco Franco, Diogo Melo e Diogo Paulino por todo o companheirismo.

Aos meus patudos, por estarem sempre presentes em todas as ocasiões.

À minha *homie*, Sandra Fernandes, por todo o apoio e momentos de descontração durante o início de todo o este processo.

À Mónica Correia por todas as conversas e companheirismo.

A todos os cães e respetivos tutores do presente estudo, por participarem.

RESUMO

A dermatite atópica canina (DAC) é uma patologia alérgica multifactorial, podendo ser mediada por imunoglobulinas de classe E, na maioria dos casos, dirigidas contras antígenos ambientais. Toda esta hipersensibilidade por parte do sistema imunológico aos alérgenos gera um quadro inflamatório cutâneo e pruriginoso, resultando num incómodo crónico constante para o animal e o seu tutor. Actualmente, a DAC tem uma elevada incidência na população canina, estimando-se que cerca de 3 a 15% desta população esteja afetada, representando cerca de 3 a 58% de todos os casos de patologia cutânea. Tendo esta doença uma necessidade de controlo constante e dada a diversidade de terapêuticas existentes no manejo da dermatite atópica canina, surge a necessidade de encontrar, para estes animais, novos meios de tratamento, mais eficazes e seguros.

A presente dissertação teve como objetivo principal quantificar os níveis séricos de IL-31 em cães com DA sob terapêutica com lokivetmab, um anticorpo monoclonal anti-IL-31, com nome comercial Cytopoint®. Foi, ainda, intenção determinar se o quadro clínico e o prurido se correlacionariam com os níveis de IL-31 apresentados, assim como a resposta ao tratamento. De uma forma global, pretendeu-se analisar de que forma os níveis séricos de IL-31 variavam com a administração de lokivetmab.

Os níveis séricos da IL-31 em cães tratados mensalmente com lokivetmab, foram quantificados ao longo de três meses consecutivos, através do método de ELISA competitivo. O quadro clínico e o prurido dos animais foram, igualmente, avaliados e correlacionados com os níveis de IL-31 e com a resposta ao tratamento.

Não foram, no presente estudo, encontradas tendências nos valores de IL-31 dos animais com dermatite atópica canina estudados. Foi, contudo, possível constatar que existe, de uma forma geral, uma evolução positiva entre os níveis de IL-31 e o quadro clínico.

Palavras-chave: dermatite atópica canina, IL-31, Cytopoint®, lokivetmab, ELISA.

ABSTRACT

Canine atopic dermatitis (CAD) is a multifactorial allergic disease that may be mediated by immunoglobulins E, mainly directed against environmental antigens. All this hypersensitivity from immune system to allergens, generates an itchy and inflammatory skin condition, resulting in constant chronic discomfort for the patient and his owner. Nowadays CAD has a high incidence in the dog population and it is estimated that 3 to 15% of this population is affected by this condition, representing 3 to 58% of all cases of skin pathology. This disease is in constant need for control and given the diversity of existing therapies for the management of canine atopic dermatitis, there is a need to find new, more effective and safe treatments for these patients.

The main goal of the present dissertation was to quantify the IL-31 serum levels in dogs with AD under therapeutics with lokivetmab, a monoclonal antibody anti-IL-31, with the commercial name Cytopoint®. It was also intended to determine if the clinical condition and itching could be correlated with the IL-31 levels presented, as well as the response to treatment. Overall, it was intended to analyze in what way the levels of IL-31 vary with the administration of lokivetmab.

Serum IL-31 levels in dogs treated monthly with lokivetmab were quantified over three consecutive months by competitive ELISA. The clinical condition and pruritus of the animals were also evaluated and correlated with interleukin-31 levels and response to treatment.

In the present study, no trends were found in the IL-31 values of the canine atopic dermatitis animals. On this patients, however, it was possible to verify a positive evolution between IL-31 levels and the clinical condition.

Keywords: canine atopic dermatitis, IL-31, Cytopoint®, lokivetmab, ELISA.

LISTA DE ABREVIATURAS

ASIT – Imunoterapia alérgico-específica, do inglês *Allergen-Specific Immunotherapy*

BID – Duas vezes ao dia, da locução latina *Bis In Die*

DA – Dermatite atópica

DAPP – Dermatite alérgica à picada da pulga

DAC – Dermatite atópica canina

CAD – Dermatite atópica canina, do inglês *Canine Atopic Dermatitis*

CADESI-4/-3 – Index da extensão e severidade da dermatite atópica canina, do inglês *Canine Atopic Dermatitis Extent & Severity Index*

CADLI – Index de lesões da dermatite atópica canina, do inglês *Canine Atopic Dermatitis Lesion Index*

COSCAD'18 – Conjunto de resultados para aplicação em ensaios clínicos terapêuticos em dermatite atópica canina, do inglês *Core Outcome Set on Canine Atopic Dermatitis*

EFA's – Ácidos gordos essenciais, do inglês *Essencial Fatty Acids*

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática, do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*

EOD – A cada outro dia, do inglês *Every Other Day*

et al. – E outros, da locução latina *et alli*

fceRI – Recetor IgE de alta afinidade, do inglês *High-Affinity IgE Receptor*

FMV – Faculdade de Medicina Veterinária

g – Aceleração gravitacional (unidade de força centrífuga relativa)

HVB – Hospital Veterinário de Berna

HVP – Hospital Veterinário de Portimão

ICADA – Comité Internacional para as Doenças Alérgicas em Animais, do inglês *International Committee on Allergic Diseases of Animals*

IgE – Imunoglobulina E

ILIT – Imunoterapia intralinfática, do inglês *Intralymphatic Immunotherapy*

IL-31 – Interleucina 31

JAK – Janus kinase, do inglês, *Janus Kinase*

LACH - Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia

mAB – Anticorpo monoclonal, do inglês *Monoclonal Antibody*

MHC II – Complexo de Maior Histocompatibilidade II, do inglês *Major Histocompatibility Complex*

OVH - Ovariohisterectomia

pVAS – Escala Visual Analógica de Prurido, do inglês *Pruritus Visual Analog Scale*

RAA – Reação Adversa ao Alimento

SC – Subcutâneo

SCIT – Imunoterapia subcutânea, do inglês *Subcutaneous Immunotherapy*

SID – Uma vez ao dia, da locução latina *Semel In Die*

SLIT – Imunoterapia sublingual, do inglês *Sublingual Immunotherapy*

STAT – Transdutor de sinal e activador de transcrição, do inglês *Signal Transducer and Activator of Transcription*

TCR – Recetor das células T, do inglês *T-Cell Receptor*

TEWL – Taxa de Terda de Água Transepidérmica, do inglês *Transepidermal Water Loss*

Th2 – Células T auxiliares, do inglês *T Helper Cells*

Treg – Células T reguladoras

ULHT– Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

EUA – Estados Unidos da América

® - Marca registada

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE TABELAS	12
ÍNDICE DE FIGURAS	13
DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR.....	14
ESTUDO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-31 EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA E SOB TRATAMENTO COM CYTOPOINT®	19
1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1 Dermatite Atópica Canina.....	19
1.1.1 A pele.....	19
1.1.2 Definição de dermatite atópica canina.....	21
1.1.3 Epidemiologia da DAC.....	21
1.2 Patogénese da DAC.....	23
1.2.1 O complexo sistema imunológico do cão atópico	24
1.2.2 Influência ambiental	27
1.2.3 Genética	29
1.2.4 Defeito da barreira epidérmica	30
1.3 Diagnóstico.....	31
1.3.1 História, anamnese, resenha, sinais clínicos, sazonalidade	31
1.3.2 Manifestações dermatológicas e não dermatológicas	33
1.3.3 Diagnósticos diferenciais	35
1.3.4 Dieta de eliminação	36
1.3.5 Testes alérgicos.....	37
1.3.6 Histopatologia.....	39
1.4 Tratamento	39
1.4.1 Maneio dos casos agudos.....	40
1.4.2 Maneio dos casos crónicos	45

1.4.3	Evitar a recaída – estratégias.....	49
1.5	Objectivos.....	52
2.	MATERIAL E MÉTODOS.....	53
3.	RESULTADOS	58
4.	DISCUSSÃO	68
5.	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
	ANEXOS	I
	APÊNDICES	VII

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Estimativa das consultas observadas durante o estágio curricular	16
Tabela 2. Estimativa dos casos imagiológicos acompanhados no estágio curricular.....	16
Tabela 3. Estimativa de casos internos observadas no estágio curricular	17
Tabela 4. Estimativa de outros procedimentos observados no estágio curricular	17
Tabela 5. Estimativa dos casos cirurgicos acompanhados no estágio curricular	18
Tabela 6. Adaptação dos Critérios de diagnóstico de Favrot	32
Tabela 7. Diferenças entre os testes alérgicos intradérmicos e serológicos	38
Tabela 8. Resumo dos diferentes fármacos e sua aplicatibilidade	51
Tabela 9. Valores das concentrações de IL-31 obtidas.	60
Tabela 10. Resultados obtidos da avaliação pVAS, de todos os animais em estudo.	61
Tabela 11. Resultados da avaliação CADLI, para todos os animais em estudo.....	62
Tabela 12. Resultados globais dos casos incluídos no estudo.....	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição dos casos clínicos na área de dermatologia.	15
Figura 2. Representação esquemática da pele	20
Figura 3. Representação esquemática da etiologia multifactorial da DAC.....	23
Figura 4. Esquema da resposta imunitária face aos alergénios	27
Figura 5. Representação esquemática das regiões frequentemente afetadas na DAC.....	33
Figura 6. Sinais de cronicidade num cão com DAC.....	34
Figura 7. Representação esquemática dos padrões raciais da DAC	34
Figura 8. Continuação da figura 7	35
Figura 9. Etapas de diagnóstico citológico	36
Figura 10. Microorganismos detetáveis ao microscópio	36
Figura 11. Resumo de uma situação alérgica e o limiar do prurido	40
Figura 12. Representação esquemática do funcionamento do Cytopoint®.....	43
Figura 13. Apresentações disponíveis de lokivetmab	44
Figura 14. Abordagem das terapêuticas a aplicar	50
Figura 15. <i>Kit Canine IL-31 Elisa kit, ABclonal</i>	55
Figura 16. Frequência relativa (%) de casos de estudo e controlos.....	58
Figura 17. Frequência relativa (%) de género no total dos animais em estudo.....	58
Figura 18. Distribuição dos animais em estudo em função da idade.	59
Figura 19. Distribuição dos cães em estudo em função da raça	59
Figura 20. Evolução do caso controlo 1 (C1).....	63
Figura 21. Evolução do caso controlo 2 (C2).....	64
Figura 22. Evolução do caso de estudo 1 (I1).	64
Figura 23. Evolução do caso de estudo 2 (I2).	65
Figura 24. Evolução do caso de estudo 3 (I3).	65
Figura 25. Evolução do caso de estudo 4 (I4).	66
Figura 26. Evolução do caso de estudo 5 (I5).	66
Figura 27. Evolução do caso de estudo 6 (I6).	67
Figura 28. Evolução do caso de estudo 7 (I7).	67

DESCRIÇÃO DO ESTÁGIO CURRICULAR

O Estágio Curricular da autora esteve dividido em duas partes distintas, a primeira que teve lugar no Hospital Veterinário Berna, sob orientação da Dr^a Patrícia Duarte nas várias áreas da medicina, da Dr^a Diana Ferreira na área da dermatologia. Este hospital integra uma equipa multidisciplinar com particular interesse e prática na área de oncologia, tratando-se, portanto, de um centro hospitalar de referência oncológica, no entanto, com disposição de médicos de várias especialidades, tais como, ortopedia, estomatologia, dermatologia, medicina alternativa (acupuntura), técnica imagiológica por endoscopia e outras. Para além disso, o hospital integra uma equipa interna bastante disciplinar e competente focada noutras áreas, tais como, oftalmologia, endocrinologia, medicina interna, neurologia, cardiologia, cirurgia e anestesiologia. A instituição oferece, ainda, das mais diversas modalidades imagiológicas, como a radiografia, ecografia, tomografia computadorizada e endoscopia. Oferece, ainda, de modalidades de tratamento oncológico especializado, como a quimioterapia, eletroquimioterapia e fototerapia. Dispõe, também, de serviço de urgências permanente.

O estágio teve a duração de cinco meses, de 10 de Setembro de 2018 a 1 de Fevereiro de 2019, com três horários rotativos (manhã - 08h-17h -, intermédio - 10h-19h - e tarde - 13h-21h) durante cinco dias úteis consecutivos e sábados a cada três semanas (o horário intermédio), sempre nove horas por dia com uma hora de pausa, num total de 761h de trabalho e 58h de pausa, sensivelmente. Houve, também, a oportunidade de participar em *Journal Clubs* semanais apresentados pela equipa do hospital, de diversas áreas. Durante o estágio houve a oportunidade de assistir a consultas das mais diversas áreas, com a discussão de casos clínicos reais, de participar nas passagens de casos clínicos de casos internos, assistir na cirurgia, trabalho de internamento, auxílio na área da imagiologia, processamento laboratorial, auxílio em outro tipo de procedimentos (transfusões, toracocenteses, mielografias, holteres, ECG's, necropsias, vídeo-otoscopias).

Para além disto, houveram dias dedicados exclusivamente à área da dermatologia com a Dr^a Diana Ferreira, num total de 16 dias exclusivos e 71 consultas, onde foi possível assistir e discutir os casos clínicos referenciados, aplicar e aprofundar os conhecimentos nesta área de particular interesse, realizar colheitas, citologias e proceder à sua interpretação em conjunto com a Dr^a Diana Ferreira, e ainda treinar a comunicação e aperfeiçoar as competências perante os tutores, realizando reavaliações em certos casos. Foram, também, realizados *Journal Clubs*

de dermatologia em que se discutiram ativamente vários artigos ao longo do estágio. É de salientar que alguns casos da presente dissertação tiveram origem noutras clínicas e/ou hospitais nas quais a Dr^a Diana Ferreira exerce, onde a autora pode, igualmente, realizar o respetivo acompanhamento.

A segunda parte do estágio teve lugar na Faculdade de Medicina Veterinária, no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia (LACH) da Universidade de Humanidades e Tecnologias, este foi realizado no mês de Fevereiro de 2019, constituiu na qualificação da IL-31 nas amostras recolhidas pelo método de ELISA (ensaio imuno enzimático, do inglês *Enzyme-Linked Immunoassorbent Assay*) sob orientação da Professora Doutora Margarida Alves.

Depois de todo este processo a autora continuou a assistir a consultas de dermatologia da Dr^a Diana Ferreira, maioritariamente para acompanhar os casos clínicos em estudo.

O balanço do estágio curricular foi positivo, no sentido em que houve oportunidade de adquirir novos conhecimentos, aperfeiçoar os já previamente adquiridos e crescer um pouco mais, tanto a nível profissional como pessoal ao longo deste percurso académico.

Na área da dermatologia foi possível acompanhar diversos casos clínicos dos quais estão descritos na figura 1, tendo sido maioritariamente observado casos de alergias, nomeadamente, a dermatite atópica.

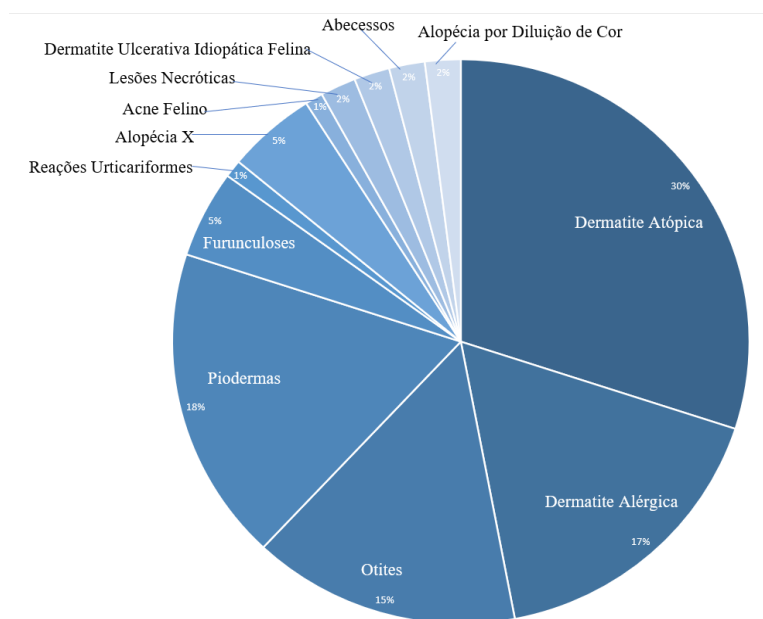


Figura 1. Distribuição dos casos clínicos na área de dermatologia.

Na área de medicina interna, os casos mais observados foram oncológicos, que é de salientar que se trata de uma referência de oncologia veterinária, seguida de casos de gastroenterologia, como se pode constatar pela tabela 1.

Tabela 1. Estimativa das consultas observadas durante o estágio curricular.

ÁREA	Total	Percentagem (%)
Oncologia	47	27,2
Gastroenterologia	27	15,6
Dermatologia	20	11,6
Medicina preventiva	18	10,4
Urgências	10	5,8
Ortopedia	10	5,8
Cardiorespiratório	9	5,2
Pré e pós operatórios	6	3,4
Nefrologia/Urologia	5	2,9
Endocrinologia	4	2,3
Estomatologia	4	2,3
Oftalmologia	4	2,3
Medicina preventiva	3	1,8
Neurologia	3	1,7
Infeto-contagiosas	2	1,1
Reprodução	1	0,6
Total	173	1

A ecografia abdominal foi a técnica imagiológica complementar de diagnóstico que a autora mais observou durante o estágio, como se pode constatar pela tabela 2.

Tabela 2. Estimativa dos casos imagiológicos acompanhados no estágio curricular.

PROCEDIMENTO	Total	Percentagem (%)
Ecografia abdominal	29	37,1
Tomografia computadorizada	25	32,0
Radiografia	15	19,2
Ecocardiografia	9	11,5
Total	78	1

Como foi possível acompanhar todos os casos clínicos, desde a consulta ao seu internamento, pode-se também observar pela tabela 3, que os casos eram maioritariamente oncológicos mais

uma vez, devido a reavaliações, recobros ou mesmo recaídas dos animais oncológicos que necessitavam de ser vigiados.

Tabela 3. Estimativa de casos internos observadas no estágio curricular.

ÁREA	Total	Percentagem (%)
Oncologia	81	29,2
Nefrologia/Urologia	29	10,4
Gastrenterologia	28	10,1
Recobros	28	10,1
Neurologia	22	7,9
Cardiologia/Pneumologia	21	7,5
Infeto-contagiosas	17	6,1
Endocrinologia	16	5,8
Ortopedia	9	3,2
Reprodução	9	3,2
Intoxicações	7	2,5
Hematologia	5	1,8
Oftalmologia	4	1,4
Estomatologia	1	0,3
Total	277	1

Na tabela 4 estão documentados outro tipo de procedimentos que a autora acompanhou durante o estágio curricular, em que a quimioterapia foi o procedimento que mais observou.

Tabela 4. Estimativa de outros procedimentos observados no estágio curricular.

PROCEDIMENTO	Total	Percentagem (%)
Quimioterapia	16	76,1
Eletroquimioterapia	3	14,2
Terapia fotodinâmica	2	9,5
Total	21	1

Como houve muita prática cirurgica no hospital, foi possível observar e/ou auxiliar nas mais diversas cirurgias, das quais como se observa pela tabela 5, teve uma predominância em mastectomias e cirurgias eletivas (castrações e ovariohisteriectomias).

Tabela 5. Estimativa dos casos cirurgicos acompanhados no estágio curricular.

ÁREA/CIRURGIA		Total	Porcentagem (%)
Tecidos Moles	Castrações OVH	15	23,4
	Nodulectomia Mastectomia	15	23,4
	Esplenectomia	5	7,8
	Oftalmológica	3	4,7
	Gastropexias	3	4,7
	Amputações	2	3,1
	Colecistectomia	1	0,01
	Ureterectomia	1	0,01
	Laparotomia exploratória	1	0,01
	Tiroidectomia	1	0,01
Endoscopia	OV laparoscópica	3	4,7
	Broncoscopia	2	3,1
	Lavagem broncoalveolar	2	3,1
	Colonoscopia	1	0,01
Estomatologia	Destartarizações e/ou Extrações dentárias	5	7,8
	Hemimaxilectomias	2	3,1
Ortopédica	TPLO e recessão da cabeça do fêmur	2	3,1
Total		64	1

ESTUDO DOS NÍVEIS SÉRICOS DE IL-31 EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA E SOB TRATAMENTO COM CYTOPOINT®

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dermatite Atópica Canina

1.1.1 A pele

Os seres vivos sofrem por parte do ambiente externo uma ameaça constante, sendo a pele não um, mas o maior órgão que compõe o organismo e, é também, o órgão que cobre e separa o meio interno do meio externo no Homem e outros animais. A pele representa, em média, dependendo do indivíduo, cerca de 12-24% do seu peso corporal (Merck & CO, 2010; Miller *et al.*, 2013). Esta confere não só o papel de proteção física contra agentes externos, como desempenha variadíssimas outras funções, que vão desde a homeostasia ao desenvolvimento de respostas imunitárias (Lloyd & Patel, 2015). Possui um pH ácido que ajuda na neutralização de agentes microbianos não residentes. No caso particular do cão, tem entre 0,5 a 5mm de espessura (Miller *et al.*, 2013).

Existem, na sua composição, várias camadas, cada uma com a seu próprio papel e constituição. Da camada mais externa para a mais interna, a pele é composta pela epiderme, derme, hipoderme e vários anexos (foliculos pilosos, glândulas) representada na figura 2a. A epiderme possui cinco estratos (basal, espinoso, granuloso, lucidum e cornéo) (figura 2b) e vários tipos celulares, sendo eles, os queratinócitos ($\pm 85\%$), células de Langerhans ($\pm 5-8\%$), melanócitos ($\pm 5\%$) e células de Merkel ($\pm 3-5\%$). A derme confere a segunda camada da pele, composta por várias fibras, células e anexos (músculos eretores do pêlo, vasos sanguíneos e linfáticos). Por fim, segue-se a hipoderme, que é a camada mais profunda da pele (Lloyd & Patel, 2015).

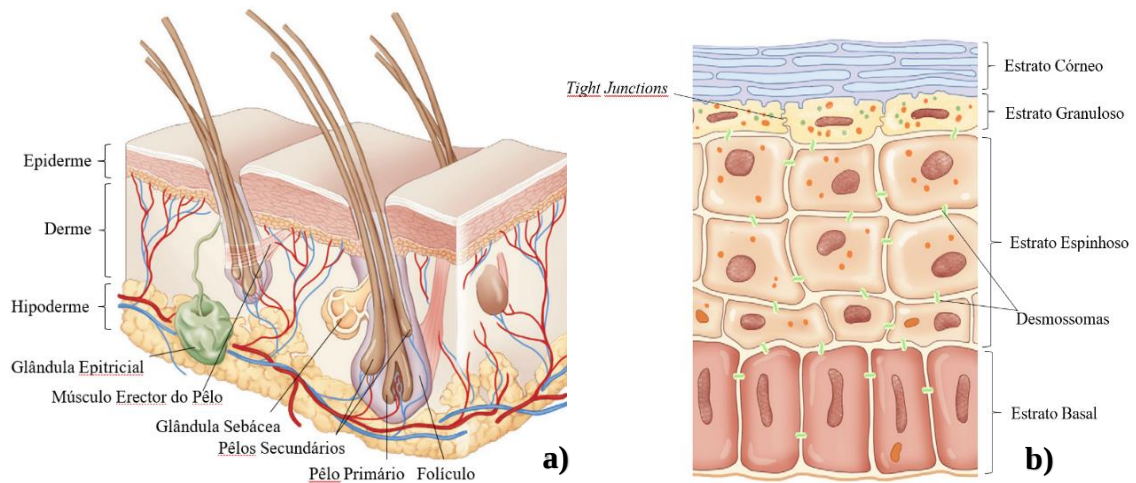


Figura 2. Representação esquemática da pele. a) Composição da pele; b) Diferenciação da epiderme (adaptado de Miller *et al.*, 2013).

É importante referir que, compondo a pele, existe um microbioma residente, constituído por uma mistura de microrganismos que ali residem em simbiose e contribuem para a manutenção de uma pele saudável (Weese, 2013).

Sendo o estrato córneo composto por vários componentes responsáveis pela integridade da barreira epidérmica, uma quebra na composição deste estrato pode resultar numa barreira epidérmica instável, e portanto, existe a possibilidade de uma falha na primeira linha de defesa contra agentes externos, permitindo a sua entrada e o desenrolar de uma inflamação (Nishifugi, 2014; Egawa & Kabashima, 2016). No entanto, ainda é incerto se esta instabilidade é uma causa ou um efeito e, portanto, a sua relação direta com o desenvolvimento da dermatite atópica canina (DAC) não é um dado adquirido (Santoro *et al.*, 2015; Pucheu-Huston *et al.*, 2015). Estudos indicam que um cão com dermatite atópica é, geralmente, um indivíduo que possui alterações na integridade da pele (Marsella *et al.*, 2011; Nishifugi, 2014). Uma barreira epidérmica instável pode potenciar uma predisposição para o desenvolvimento de um quadro alérgico. Secundariamente, podem ocorrer infeções bacterianas e sobrecrecimentos de *Malassezia*, que resultam, conjuntamente com o quadro alérgico, num agravamento do prurido e, conseqüentemente, do quadro clínico do animal, quando esta patologia não está devidamente controlada (Lloyd & Patel, 2015; Kanemaru *et al.*, 2017).

1.1.2 Definição de dermatite atópica canina

“A dermatite atópica canina é definida como uma patologia inflamatória e pruriginosa alérgica cutânea com predisposição genética e características clínicas específicas. Associada maioritariamente a anticorpos IgE contra alérgenos ambientais” (Halliwell, 2006; p.207). Ao longo dos anos a definição desta doença tem vindo a sofrer algumas alterações. Sendo, esta uma síndrome de grande complexidade, e tendo por base uma causa multifactorial, torna-se difícil a completa compreensão de todo o mecanismo que a envolve.

A dermatite atópica canina trata-se de uma hipersensibilidade de tipo I face a alérgenos ambientais (Paterson, 2008; Merck & CO, 2010; Miller *et al.*, 2013). Está descrito que, na maioria dos casos, existe associado ao quadro clínico a presença de IgE's contra alérgenos ambientais. No entanto, quando isto não se verifica, e não é possível detetar a presença de IgE's, determina-se que estes animais sofrem de *atopic-like dermatitis*. Este facto sugere que possam existir diferentes vias associadas ao desenrolar da patologia (Merck & CO, 2010; Jackson & Mueller, 2015).

De acordo com o Comité Internacional para a Doença Alérgica em Animais (ICADA, do inglês *International Committee on Allergic Diseases of Animals*), existem vários possíveis fatores responsáveis pelo desenvolvimento da dermatite atópica canina, tais como, fatores ambientais, genéticos, imunológicos, alterações na barreira cutânea e o envolvimento de múltiplos alérgenos ambientais (Miller *et al.*, 2013; Hensel *et al.*, 2015; Harvey *et al.*, 2019). Se a própria doença já é complexa, por outro lado, ainda existem fatores que levam a um exacerbar da DAC, tais como, as infeções secundárias e possíveis infestações parasitárias (Lloyd, 2014; Santoro *et al.*, 2015).

1.1.3 Epidemiologia da DAC

Nos dias de hoje muitas alterações surgiram no ambiente quotidiano que resultaram, também, numa alteração do ambiente quotidiano dos animais de companhia. Dessa mudança, surgem benefícios e consequências. Estima-se que a DAC, atualmente, afete cerca de 10-15% da população canina (Merck & CO, 2010; Moyaert *et al.*, 2017a). É de notar um grande aumento comparado com valores anteriores. De acordo com Halliwell & Schwatzman (1971) citado por Hillier & Griffin (2001) e Miller e colaboradores (2013) em 1971 estimava-se que 3,3% dos

cães sofriam da patologia. Num outro estudo nos Estados Unidos da América (EUA), de acordo com DeBoer (1989) citado por Miller e colaboradores (2013) cerca de 27% padecia ou poderia desenvolver a patologia, e um outro estudo em Inglaterra ditava que apenas 5% desenvolviam a DAC (Hill *et al.*, 2006). A taxa de prevalência da doença assenta, principalmente, na informação da região geográfica a que o cão pertence, nas tendências de determinadas raças numa dada região, nos métodos de sobrevivência e no critério de diagnóstico utilizado pelos especialistas (Hillier & Griffin, 2001; Miller *et al.*, 2013).

Estima-se que o número de casos de dermatite atópica em humanos tenha vindo a aumentar em regiões industrializadas, com 10-20% das crianças a desenvolverem a doença. Pensa-se que esta situação se possa dever, não só à excessiva higiene, nos banhos e no uso de antibacterianos que afetam diretamente a normal função da barreira epidérmica, como pela menor exposição a bactérias e/ou parasitas (Mutius, 2007). O aumento da prevalência da DAC é, também, uma realidade; no entanto, não se sabe ao certo o porquê. Extrapolam-se que esteja relacionado com as mesmas causas que nos humanos. O aumento do número de cães que passam a maior parte do tempo dentro de casa é uma veracidade, principalmente em regiões industrializadas. Deduz-se que a menor exposição às endotoxinas seja um dos motivos, aliado a banhos excessivos, que *à priori* não eram realizados, e exposição a alérgenos que não existem no meio rural (Miller *et al.*, 2013). Consta que cães que vivam ou tenham nascido em meio rural, tenham acesso ao campo, praias, bosques e que coabitem com outros cães tenham menor risco de desenvolvimento da DAC. Também cadelas lactantes que sejam alimentadas com dietas caseiras parecem estar em menor risco de ter crias com DAC. Estes fatores parecem conferir uma certa proteção ao desenvolvimento da DAC (Harvey *et al.*, 2019). De acordo com Anturaniemi *et al.* (2017), animais com mais de 50% da sua pelagem de cor branca têm maior risco de desenvolver DAC, enquanto que, Harvey *et al.* (2019) sugerem que labradores de pelagem cor de chocolate tenham maior risco de desenvolver DAC do que labradores de pelagem clara.

Não está descrito que haja predisposição para género; no entanto, vários estudos remetem para um início do quadro clínico, entre os 6 meses a 7 anos de idade, com uma média dos casos a iniciar dos 6 meses aos 3 anos de idade (Paterson, 2008; Allen *et al.*, 2010; Bizikova *et al.*, 2015a). A forte componente genética que entra em jogo, aumenta em 50% o risco de DAC (Nuttall, 2014). As raças descritas como mais frequentemente afetadas são, West Highland

White Terrier (WHWT), Labrador Retrievers, Golden Retriever, Boxer, Bulldog Francês, Pastor Alemão e Cocker Spaniel (Bizikova *et al.*, 2015a).

1.2 Patogénese da DAC

A dermatite atópica canina é uma patologia com um envolvimento multifactorial extenso, da qual vários estudos relatam algumas possíveis causas, contudo, por padecer de uma enorme complexidade, ainda há muito por desmistificar. Sabe-se que a DAC é similar à dermatite atópica humana, ambas resultantes de uma interação bastante complexa entre fatores íntros (idade, raça, sistema imunitário, genética e uma barreira epidérmica anómala) e extrínsecos (alergénios ambientais e/ou alimentares e sazonalidade) ao animal (Miller *et al.*, 2013). A figura 3 demonstra, de uma forma esquemática, a envolvimento de fatores que podem desencadear um quadro alérgico.

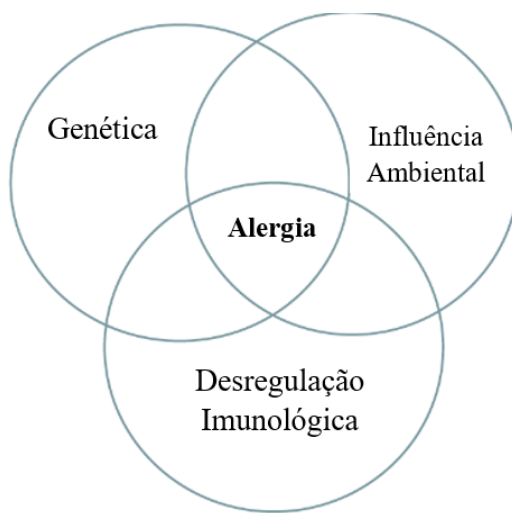


Figura 3. Representação esquemática da etiologia multifactorial da DAC (adaptado de Day, 2014).

Com o avançar do tempo foram sugeridas várias hipóteses para a sua fisiopatologia, com mais autores a salientar a importância da integridade da barreira epidérmica e outros a relevância do papel do sistema imunitário anómalo. Por serem diversos os componentes responsáveis pelos quadros clínicos, estes resultam em diferentes fenótipos, dificultado o diagnóstico de um indivíduo com DAC. Sabe-se que nem todos os cães atópicos têm IgE's alérgico-específicos detetáveis (*atopic-like*), sendo que a sua fisiopatologia não é tão bem

compreendida quanto a dos cães atópicos com detecção destas imunoglobulinas (Halliwell, 2006; Marsella, 2014).

1.2.1 O complexo sistema imunológico do cão atópico

A dermatite atópica canina, de uma forma mais simplificada, trata-se de uma hipersensibilidade do tipo I. Uma interação entre antigénios, mastócitos e a sua ligação com as IgE, culminando numa libertação de mediadores inflamatórios por parte destas células, gerando uma inflamação de carácter agudo. Esta hipersensibilidade é composta por duas fases, a fase de sensibilização e a de reexposição ao alérgénio (abaixo será descrito com mais detalhe o processo). Estes animais, por fatores diversos, montam uma resposta exagerada contra alérgénios a que são expostos, através de uma resposta executada pelas células T auxiliares (Th2) produzindo anticorpos IgE (Tizard, 2013; Day & Schultz, 2014).

A base de conhecimento sobre o que está por trás de toda esta síndrome, tem vindo a evoluir ao longo de vários anos, com a apresentação de cada vez mais estudos focados na clarificação e compreensão da DAC. Atualmente, existe uma grande evidência de que as células T e as citocinas têm um papel fulcral na patologia, enquanto que as IgE, mastócitos e seus mediadores (histamina, leucotrienos), parecem ter um papel menos relevante (Marsella, 2014).

De facto, existe uma grande tendência para que os cães atópicos em resposta aos alérgenos libertem histamina por parte dos mastócitos, não se sabendo, contudo, se existe um papel direto desta substância na DAC. O que se sabe é que a histamina potencia outros componentes, como os leucócitos, quimiocinas e, ainda, ativa células dendríticas (Brazís *et al.*, 1998; Hammerberg *et al.*, 2001; Marsella, 2014).

As células de Langerhans são células dendríticas, apresentadoras de antigénios, presentes em grandes quantidades na epiderme destes cães, e possuem um papel importante na progressão e manutenção de todo o processo inflamatório uma vez que estas expressam bastantes recetores de alta-afinidade para a IgE (FcεRI). Estas células ao apresentarem alérgenos ligados a IgE podem gerar uma hiperestimulação das Th2 gerando uma resposta inflamatória bastante eficiente (Olivry *et al.*, 1996; Bonkobara *et al.*, 2005; Marsella, 2014; Jackson *et al.*, 2015). Têm, ainda, a habilidade de reverter o efeito de supressão das células T reguladoras e modulam a função destes componentes (Ahn *et al.*, 2007).

Como referido anteriormente, é nas células T e citocinas que a evidência investe de momento. Estudos em medicina humana sugerem que existam duas fases distintas, uma fase

aguda envolvendo as Th2 (com envolvimento das TCD4+, eosinófilos e liberação de IL-4 e IL-13) e uma fase crônica provocada pelas células Th1 (com envolvimento de macrófagos com liberação de IL-3, IL-12 IL-18 e interferon gama). Em cães não é tão claro que existam estas fases distintas, mas sim uma importância direcionada para as Th2 (Miller *et al.*, 2013). Estas células tem a capacidade de libertar diversas citocinas específicas, as interleucinas (produzem a IL-4, IL-5 e a IL-13), cuja função foi sendo descoberta ao longo tempo (Tizard, 2013). Estas citocinas são proteínas que possuem capacidade de comunicação celular, sendo capazes de produzir várias respostas celulares, entre elas a ativação de várias células do sistema imunológico. Portanto uma desregulação do sistema imunológico provoca numerosas alterações indesejadas (Gonzales *et al.*, 2014).

São vários os mediadores que contribuem para o desenvolvimento do prurido, sendo os neuropéptidos, proteases, cininas e citocinas alguns exemplos (Kasutani *et al.*, 2014). A interleucina 31 (IL-31) é uma proteína pertencente à família das IL-6, composta por uma estrutura de quatro hélices (Zhang *et al.*, 2008). Esta interleucina, foi recentemente apontada como tendo uma grande importância na fisiopatologia da DAC, sendo responsável pelo prurido agudo e quadro inflamatório em cães (Gonzales *et al.*, 2013; Olivry, 2019b). Estudos descrevem a detecção desta interleucina na maioria dos soros dos cães com dermatite atópica (preferencialmente no tipo lesional) (Sonkoly *et al.*, 2006; Gonzales *et al.*, 2013; Marsella *et al.*, 2018) e a existência de uma correlação com a gravidade da patologia (Ezzat *et al.*, 2011; Marsella *et al.*, 2018). A IL-31 é uma citocina essencialmente produzida pelas células Th2 mas, também, pelos mastócitos (Dillon *et al.*, 2004; Kasutani *et al.*, 2014). O mecanismo de ação da IL-31 tem várias vias. Sabe-se que este mediador pode, de forma direta, desencadear o prurido via fibras nervosas; no entanto, há quem defenda que a IL-31 possa ter um efeito pruriginoso de forma indireta, regulando certas substâncias pruriginosas. A utilização da via dos queratinócitos, com consequente liberação de mediadores secundários tem sido descrita. Para além disso, pode ainda, via neuroreceptores, reduzir certos estímulos. Sabe-se hoje, também, que a IL-31 é capaz de ativar as JAK/STAT (Dillon *et al.*, 2004; Gonzales *et al.*, 2013; Hawro *et al.*, 2013). O seu recetor está presente em diferentes pontos, tais como, no ramo dorsal do gânglio dos neurónios sensitivos, fibras aferentes da medula espinhal na derme e alguns tipos celulares (queratinócitos epidérmicos, eosinófilos, mastócitos, monócitos e macrófagos ativados), sendo estes recetores, um heterodímero com subunidade alfa e o recetor da oncostatina M (Dillon *et al.*, 2004; Bando *et al.*, 2006; Sonkoly *et al.*, 2006). Resumindo, a IL-31 após ser produzida e libertada, é capaz de se ligar aos seus recetores, acionando e

enviando sinais ao cérebro, via fibras nervosas, produzindo a sensação de prurido, e ativando adicionalmente muitas outras vias e células que atuam, igualmente, em todo o quadro clínico (Gonzales *et al.*, 2013; Gonzales *et al.*, 2014).

As Janus Kinase (JAK) são uma família de enzimas que possuem um papel relevante na ação de diversas citocinas, sendo várias as citocinas que possuem a capacidade de as ativar, quando estas se ligam aos recetores (Schindler & Plumlee, 2008; Gonzales *et al.*, 2014). Estas, quando ativas, geram um estado de degradação do recetor conjugado, proporcionando zonas de ligação para proteínas de sinalização tais como as transdutoras de sinal e ativadoras de transcrição (STAT, do inglês *signal transducer and activator of transcription*). As STAT, após a sua ligação, são transformadas em resíduos de tirosina pelas JAK. Permitem, também, que as citocinas transmitam sinais no núcleo celular para gerar respostas biológicas (Schindler & Plumlee, 2008; Harrison, 2012; Gonzales *et al.*, 2014). Nesta patologia alérgica as citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-6) e as que atuam nas respostas alérgicas (IL-4 e IL-13) são citocinas que usam as vias de JAK-STAT (Ong & Leung, 2006; Brandt & Sivaprasad, 2011; Gonzales *et al.*, 2014).

O sistema imune numa situação normal tem a capacidade de neutralizar uma resposta gerada pelas células Th2, através de certos componentes, tais como, CD4+, CD25, Tregs e IL-10. As células Treg (células T reguladoras ou células T supressoras), são células capazes de modular e equilibrar o sistema imunitário mantendo uma certa tolerância a antígenos próprios, evitando a doença autoimune. Animais com esta condição alérgica têm, por norma, estes componentes suprimidos e, portanto, será certo dizer que a DAC é uma doença com defeito na regulação da resposta imunológica (Marsella, 2014).

Os queratinócitos têm, também, uma ação ativa no desenrolar da DAC, produzindo inúmeras citocinas e quimiocinas. Os leucotrienos, enzimas que produzem prostaglandinas, e o próprio microbioma são todos componentes ativos no desenrolar da dermatite atópica canina (Marsella, 2014).

De uma forma simplista, são várias as vias de entrada dos alérgenos (oral, respiratória, e cutânea); no entanto, independentemente de qual a via, a resposta imunitária ao alérgeno é desenvolvida rapidamente. Numa primeira fase (fase de sensibilização), após o trespassar do alérgeno pela barreira epidérmica, este é captado pelas células-apresentadoras de antígeno e apresentado às células T, através de uma interação entre moléculas presentes na superfície das células apresentadoras de antígeno, o complexo de maior histocompatibilidade II (MHC II, do

inglês *Major Histocompatibility Complex*) e os recetores presentes nas células T helper (TCR, do inglês *T-Cell Receptor*), reconhecendo o antígeno processado. Células CD4⁺ passam a células Th1 e Th2 (sendo estas as importantes contra alérgenos) que, por sua vez, dão auxílio para ativar as células B a produzir citocinas, tais como as interleucinas 4, 5, 6, 10 e 13. Este processo promove a formação de IgE antígeno-específico. As IgE ligam-se aos mastócitos pelo complemento de fixação e alta afinidade para o recetor (FcεRI, do inglês *High-Affinity IgE Receptor*) e aí permanecem ligados até uma nova exposição do mesmo alérgeno. Numa segunda fase (fase de reexposição), quando o alérgeno volta a entrar no organismo, este liga-se diretamente às moléculas de IgE alérgenos-específicos presentes nos mastócitos e enviam um sinal para que haja libertação de mediadores inflamatórios (histamina, heparina, enzimas proteolíticas, prostaglandinas e leucotrienos), gerando assim uma resposta inflamatória (Kennis, 2006; Tizard, 2013; Jackson & Mueller, 2015). A figura 4 esquematiza a resposta alérgica com consequente libertação de mediadores inflamatórios tais como a IL-31.

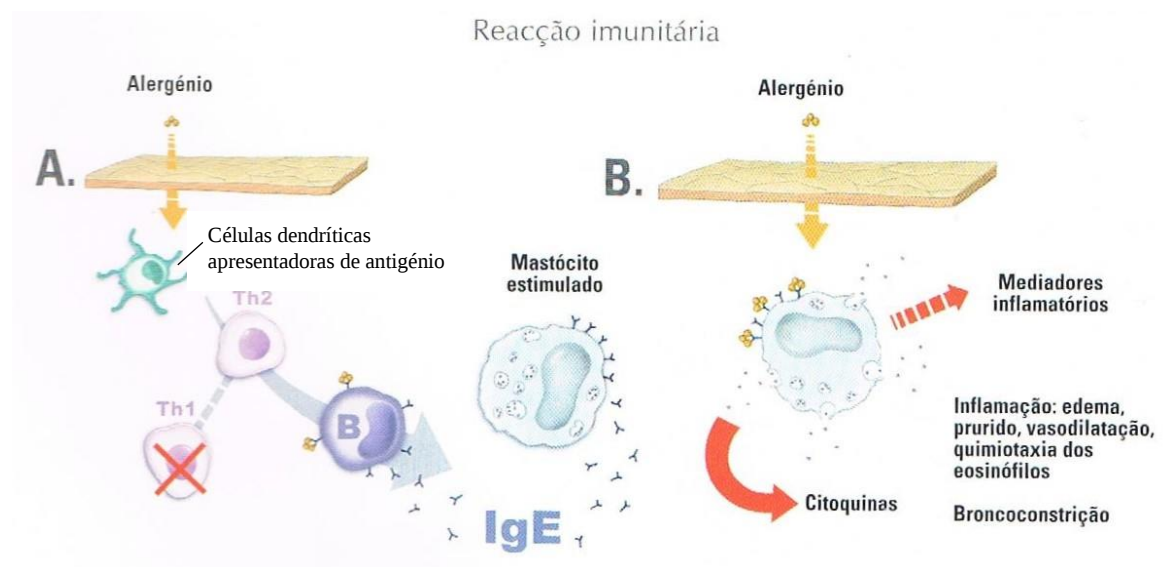


Figura 4. Esquema da resposta imunitária face aos alérgenos. A) Fase de sensibilização; B) Fase de reexposição (Adaptado de Dethioux, 2006).

1.2.2 Influência ambiental

O ambiente possui um poder relevante sobre o desenvolvimento da dermatite atópica canina. Alguns autores descrevem a existência de um menor risco de cães com mais acesso ao exterior de desenvolverem DAC (Meury *et al.*, 2011). Outro estudo remete para o aumento da DAC em cães que vivem em regiões industrializadas, com muita densidade humana, grande precipitação

pluviométricas, zonas sul e onde hajam veterinários dermatologistas (Nodtvedt *et al.*, 2006). Llooringh *et al.* (2011), referem uma proteção contra o desenvolvimento da DAC quando há exposição a endotoxinas bacterianas.

O papel dos alérgenos ambientais e alimentares já foi descrito. Embora seja praticamente impossível identificar todos os alérgenos ambientais existentes, tem-se como referência a área geográfica, para que deste modo seja possível identificar os alérgenos mais comuns em determinada região. Os alérgenos mais comuns associados à dermatite atópica são, o pó da casa, ácaros do pó da casa (*Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus*), ácaros de armazenamento (*Acarus siro* e *Tyrophagus putrescentiae*), alérgenos epidérmicos (humanos, cavalos, gatos e cães) poléns, bolores e insetos (Hill & DeBoer, 2001; Marsella *et al.*, 2011; Prélaud, 2014; Bizikova *et al.*, 2015a). Há que ter em atenção que um animal que seja alérgico a certos tipos de poléns, está, por norma, sujeito a uma sazonalidade e área geográfica. Segundo Marsella *et al.* (2006) e Paterson (2008) a exposição aos alérgenos ambientais pode ocorrer por via oral, respiratória e cutânea, parecendo ser esta última a mais relevante na DAC. Cerca de 80% dos cães com dermatite atópica, possuem IgE específicos em circulação, que têm a capacidade para reconhecer um ou mais ácaros da casa, ervas daninhas e outros tipos de alérgenos ambientais (Youn *et al.*, 2002). Os alérgenos alimentares apresentam, também, uma importância na doença pois, em certos casos, existem concomitantemente, os dois problemas. Cerca de 13 - 30% dos cães com reação adversa ao alimento (RAA) padecem concomitantemente de DAC, sendo o quadro clínico indistinguível (Miller *et al.*, 2013). Nos casos de RAA, os animais padecem de um prurido não sazonal, geralmente na face, patas, pavilhões auriculares, axilas, patas anteriores e região perianal, podendo estes sinais clínicos ser acompanhados de sinais gastrointestinais (Kennis, 2006). Estes alérgenos são glicoproteínas hidrossolúveis, sendo frequentemente encontradas na carne de bovino, frango, cordeiro, milho, trigo, leite de vaca, soja, ovos e peixe (Kennis, 2006; Roudebush, 2013; Mueller *et al.*, 2016). De acordo com Olivry *et al.*, (2007) um cão com DA pode apresentar de níveis serológicos de IgEs alérgeno-específicos de origem alimentar, sendo esses alérgenos alimentares capazes de aumentar o risco de uma recaída de dermatite atópica. Assim, evitar certos alimentos é importante no manejo da doença.

Em relação ao papel dos agentes microbianos na patogénese da DAC é algo que ainda não está completamente compreendido; no entanto, julga-se que a baixa exposição ou endotoxinas de bactérias gram negativas seja uma das razões para o desenvolvimento da doença, devido aos

novos hábitos de vida (cães *indoor*, aumento da frequência de banhos e aplicações de produtos desinfetantes) (Lloyd, 2014; Harvey *et al.*, 2019). Todavia, sabe-se que estes microrganismos residentes, em certas condições, podem ser capazes de induzir condições propícias no microbioma da epiderme, promovendo a sobrevivência microbiana indesejável, permitindo a sua proliferação e culminando numa infecção (Lloyd, 2014). A recorrência destas infeções poderá estar relacionada com a alta aderência dos estafilococos à pele destes cães (DeBoer & Marsella, 2011). A ação da levedura *Malassezia* na DAC também não está completamente esclarecida; ainda assim, foi demonstrado através da mensuração de antígenos da *Malassezia* que esta poderá induzir uma resposta de hipersensibilidade (Bond *et al.*, 2002; Oldenhoff *et al.*, 2014). As *Malassezias pachydermatis*, são microorganismo predominantes no microbioma da pele dos cães sãos (Guillot & Bond, 1999) e sabe-se que esses mesmos podem induzir e exacerbar a inflamação da pele por diversos mecanismos predispondo a sobrecolonização de outros microrganismos (Bond, 2014).

1.2.3 Genética

Com a revolução das novas tecnologias, tem surgido um maior interesse em explorar a área da genética. Antigamente, os estudos que se desenvolviam nesta área eram baseados, essencialmente, na observação da raça, hereditabilidade e a suposição, a partir de estudos realizados na medicina humana. Certos estudos relataram uma forte predisposição racial (Wilhem *et al.*, 2010), destacando algumas raças propensas à DAC, como Golden Retriever, Pastor Alemão, Cocker Spaniel, Boxer, Bulldog Francês, Dálmata, Setter Irlandês, Bullterrier, Welsh terrier, Cairn Terrier, West Highland White Terrier e Scottish Terrier. Cães sem raça definida também apresentam DAC, realçando novamente a grande complexidade da doença (Shaw *et al.*, 2004; Tizard, 2013).

Graças ao surgimento de novas técnicas, existe a possibilidade de explorar, cada vez mais, a influência genética no desenvolvimento da DAC. Existem estudos em que descobriram uma quantidade extensa de genes capazes de potenciar a DAC, influenciando toda a parte imunológica, barreira epidérmica e inflamação (Wood *et al.*, 2009; Wood *et al.*, 2010; Salzmann *et al.*, 2011; Roque *et al.*, 2012). Graças a estes estudos é possível afirmar que a dermatite atópica canina possui uma componente genética e hereditária (Paterson, 2008; Barnes, 2010; Tizard, 2013; Bizikova *et al.*, 2015a). Segundo Shaw *et al.* (2004) a

hereditabilidade influencia, em cerca de 50%, a probabilidade de um cão vir a desenvolver DAC.

O fenótipo de um indivíduo que apresente DAC nunca é igual a outro, assim como a sua resposta aos tratamentos implicados, possivelmente devido às variações individuais do genoma. Assim, os múltiplos genes descobertos podem contribuir para a fisiopatologia de uma forma bastante complexa, sendo que a sua função e expressão poderá estar dependente da relação com o ambiente, tendo a raça e a área geográfica também alguma influência (Jaeger *et al.*, 2010; Nuttall, 2014).

1.2.4 Defeito da barreira epidérmica

Como previamente descrito, a pele possui uma composição bastante completa. O estrato córneo presente na camada mais superficial da pele (epiderme) é composto por corneócitos e uma substância homogênea com função de manter os corneócitos agregados (especialmente formada por lípidos). Os queratinócitos contêm no seu interior proteínas, como a filagrina e a queratina, que conferem resistência mecânica e constituem um obstáculo à entrada de agentes estranhos no organismo. Os lípidos constituintes da substância envolvente, são compostos, fundamentalmente, por ceramidas que impedem a perda de fluídos corporais através da epiderme e têm, ainda, propriedades de sinalização celular (Uchida, 2014). São várias as teorias apresentadas para suportar alterações nestes componentes; no entanto, se são uma causa ou um efeito, é um assunto que ainda não é completamente claro (Olivry, 2011; Stahl *et al.*, 2012). Ainda assim, sabe-se que as alterações presentes, podem levar ao aumento da perda de água pela barreira epidérmica e, consequentemente, ao aumento da entrada de alérgenos percutâneos (Nishifugi, 2014). As novas metodologias permitiram tirar algumas conclusões. Com o método da mensuração da perda de água pela epiderme, foi possível observar que este aumento é diretamente proporcional ao aumento da permeabilidade cutânea (Shimada *et al.*, 2008). Sabe-se, ainda, que cães atópicos possuem mensurações maiores de perda de fluído do que cães saudáveis, levando-nos a acreditar que, realmente, existe um dano na barreira. Ainda associado à perda de fluído, as ceramidas têm um efeito inversamente proporcional ao aumento da perda de fluído (Shimada *et al.*, 2009; Nishifugi, 2014). As ceramidas são importantes na manutenção da permeabilidade cutânea e vários estudos relatam a sua diminuição em cães com dermatite atópica, levando ao aumento da permeabilidade (Marsella *et al.*, 2009; Nishifugi, 2014). A

filagrina, uma proteína intracelular dos corneócitos, está associada ao filamento que liga a queratina nas células epiteliais. Estudos com foco nesta proteína afirmam que em cães atópicos se observa um decréscimo da sua expressão (Chervet *et al.*, 2010).

Todas estas alterações são capazes de promover um aumento da entrada de alérgenos e favorecer a colonização microbiana secundária (Jackson & Mueller, 2015), aumentando a exposição aos alérgenos, sendo este um fator crítico e determinante no desenvolvimento da dermatite atópica (Paterson, 2008).

1.3 Diagnóstico

Diagnosticar um cão com DA torna-se uma tarefa desafiante para o clínico, uma vez que a patologia não apresenta sinais clínicos patognomônicos e são diversos os fatores que podem fazer variar o quadro clínico em indivíduos diferentes, havendo diversas apresentações da doença (DeBoer & Hillier, 2001). A componente genética, a extensão das lesões, o estadió da doença, a sazonalidade, a presença de infecções secundárias e, mesmo, presença de outras patologias, são alguns exemplos de fatores que fazem variar as apresentações clínicas e, por isso, o seu diagnóstico não é direto, mas sim um processo de exclusão (Hensel *et al.*, 2015).

1.3.1 História, anamnese, resenha, sinais clínicos, sazonalidade

Uma boa história clínica e anamnese é um trunfo importante para o diagnóstico desta patologia (Foster *et al.*, 2003). Alguns estudos debruçaram-se sobre as manifestações clínicas da dermatite atópica canina, na tentativa de reconhecer um método perto do eficaz e de fácil aplicação para o diagnóstico da DAC no que respeita às lesões dermatológicas. Existem vários tipos de escalas validadas, no entanto, nem todas são práticas. Surgiram, também, vários métodos de classificar as lesões de um cão com dermatite atópica. Assim, surgiram as escalas simplificadas de CADESI-3 (Index da extensão e severidade da dermatite atópica canina 3, do inglês *Canine Atopic Dermatitis Extent & Severity Index 3*), CADESI-4 (Index da extensão e severidade da dermatite atópica canina 4, do inglês *Canine Atopic Dermatitis Extent & Severity Index 4*), COSCAD`18 (Conjunto de resultados para aplicação em ensaios clínicos terapêuticos

em dermatite atópica canina 18, do inglês *Core Outcome Set on Canine Atopic Dermatitis 18*) e uma outra escala, CADLI (Index de lesões da dermatite atópica canina, do inglês *Canine Atopic Dermatitis Lesion Index*) (Plant *et al.*, 2012). Todas estas fazem a mensuração da gravidade lesional de um cão com dermatite atópica (Olivry *et al.*, 2007; Olivry *et al.*, 2014; Bizikova *et al.*, 2015b; Olivry *et al.*, 2018; Olivry, 2019a). Para além disso, é ainda possível controlar a evolução do prurido com base numa escala visual analógica – pVAS (Escala Visual Analógica de Prurido, do inglês *Pruritus Visual Analog Scale*) (Rybníček *et al.*, 2008). Surgiram, também, vários critérios com cerca de 80% de sensibilidade e especificidade (Wilhem *et al.*, 2010), que tornam a tarefa um pouco mais simples para os clínicos. Favrot (2010), desenvolveu os critérios clínicos para o diagnóstico de um cão com dermatite atópica como se apresenta na tabela 6.

Tabela 6. Adaptação dos Critérios de diagnóstico de Favrot (Olivry *et al.*, 2010a).

Critérios de Favrot, 2010	
1. Início dos sinais clínicos antes dos 3 anos de idade	5 critérios: 79% especificidade e 85% sensibilidade ≥ 6 critérios: 89% especificidade e 58% sensibilidade
2. Cães <i>indoor</i> maioritariamente	
3. Prurido responsivo aos glucocorticóides	
4. Prurido como sinal inicial	
5. Patas dianteiras afetadas	
6. Pavilhões auriculares afetados	
7. Margens dos pavilhões auriculares não afetadas	
8. Área dorso-lombar não afetada	

Para além da prevalência de idade para o desenvolvimento da DAC e a predisposição racial, existe também o fator sazonal. Como referido anteriormente, existem duas situações nas quais o quadro clínico é similar e pode induzir a erro no momento do diagnóstico. Trata-se da dermatite atópica potenciada por alérgenos ambientais e a reação adversa ao alimento. Uma forma de distinguir os dois reside na apresentação sazonal, ou seja, se um indivíduo tem crises num determinado período temporal (Primavera/Verão) e se apresenta remissão no resto do tempo, então poder-se-á afirmar que se trata de um cão com sintomatologia sazonal. Por outro lado, se um indivíduo apresentar-se instável na maioria do tempo, é provável que se trate de um cão com RAA, um animal com hipersensibilidade a ácaros da casa que, neste caso, persiste em

contacto todo o ano com o animal ou ainda DA exacerbada por alérgenos alimentares (Favrot *et al.*, 2010; Bruet *et al.*, 2012). Apesar disto, estudos descrevem que um animal pode ser sazonal num estado inicial e, com a evolução da doença possa perder essa sazonalidade (Griffin & DeBoer, 2001).

1.3.2 Manifestações dermatológicas e não dermatológicas

O sinal clínico mais comum num cão com dermatite atópica é o prurido. Trata-se de uma sensação em que o animal demonstra uma vontade de se coçar, demonstrando comportamentos de inquietação, ansiedade, de sacudir a cabeça, roçar contra objetos, esfregar no chão e em paredes, coçar diretamente com as patas o próprio corpo ou lambe (Dethioux, 2006). Este tipo de prurido é, por norma, responsivo a glucocorticóides (Favrot *et al.*, 2010; Wilhem *et al.*, 2011; Bruet *et al.*, 2012). Numa fase inicial, pode haver prurido somente ou prurido associado a lesões primárias como o eritema e pápulas (Griffin & DeBoer, 2001; Dethioux, 2006; Bensignor *et al.*, 2013a).

As regiões frequentemente afetadas são as regiões distais dos membros, face, ventre, zona inguinal, zona perineal, pavilhões auriculares e áreas de flexão como a região axilar e fossas antecubitais, como está esquematizado na figura 5 (Griffin & DeBoer, 2001; Wilhem *et al.*, 2011; Bruet *et al.*, 2012; Jackson & Muller, 2015; Hensel *et al.*, 2015).

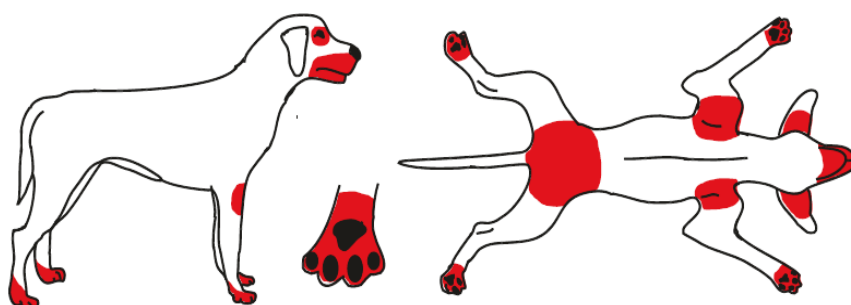


Figura 5. Representação esquemática das regiões frequentemente afetadas na DAC (Hensel *et al.*, 2015).

Associado ou não ao prurido, ocorrem lesões cutâneas descritas como primárias e/ou secundárias, tais como, eritema, máculas eritematosas, pápulas, alopecia autoinduzida, escoriações, hiperpigmentação e liquificação, sendo que as lesões secundárias podem estar mais

associadas a casos mais crônicos (figura 6) (Hensel *et al.*, 2015). Como lesões menos comuns, podem, ainda, ocorrer urticária, dermatites húmidas, hiperhidrose, fístulas interdigitais e, ainda, seborreia oleosa, havendo estudos que prevêem uma prevalência racial para cada um dos problemas (Bizikova *et al.*, 2015b).



Figura 6. Sinais de cronicidade num cão com DAC. a) Metacarpo do membro anterior direito com liquificação e hiperpigmentação. b) Regiões axilares com hiperpigmentação (original da autora).

Para além do prurido e lesões, podem haver complicações da DAC como infeções bacterianas e por *Malassezia* com 55 - 66% e 28 - 33% de probabilidade de ocorrência, respetivamente (Griffin & DeBoer, 2001; Favrot *et al.*, 2010; Wilhem *et al.*, 2010). Wilhem *et al.*, (2011) conseguiram desenvolver ilustrações de várias raças associadas a um determinado fenótipo específico, permitindo observar as diferenças entre raças (figura 7 e 8).

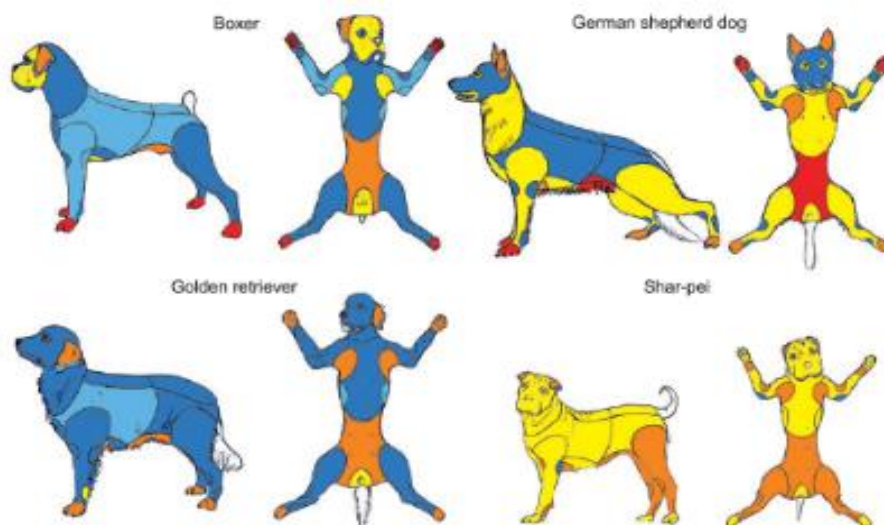


Figura 7. Representação esquemática dos padrões raciais da DAC (Wilhem *et al.*, 2011).

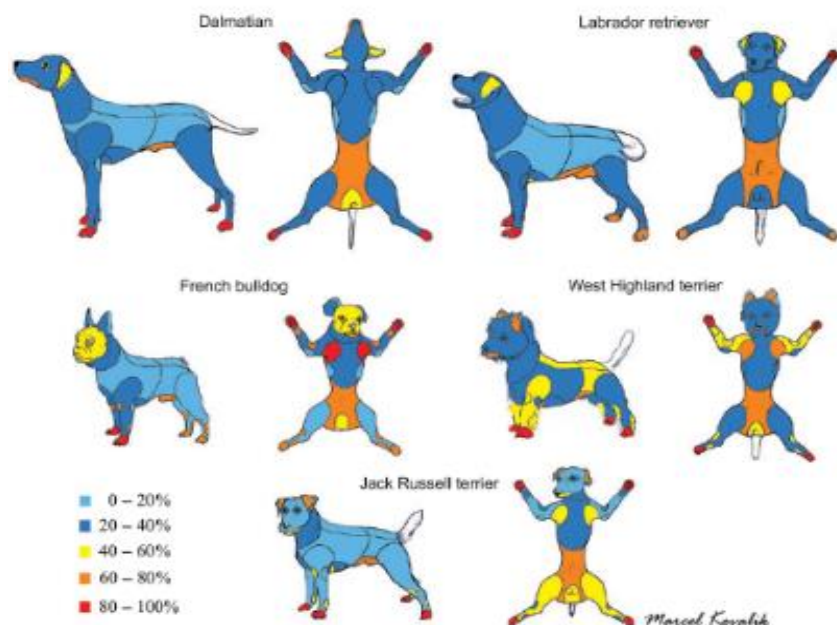


Figura 8. Continuação da figura 7.

É comum coexistir com a DAC, otite externa, assim como 50% dos casos podem desenvolver conjuntivite alérgica associada e, com menor frequência, pode ocorrer seborreia, hiperhidrose e rinite (Griffin & DeBoer, 2001; Paterson, 2008; Favrot *et al.*, 2010; Wilhem *et al.*, 2010; Martins *et al.*, 2011).

1.3.3 Diagnósticos diferenciais

São algumas as patologias que podem resultar em sinais clínicos semelhantes aos da dermatite atópica. Estas devem, portanto, ser descartadas para se chegar a um diagnóstico correto. As ectoparasitoses (sarnas – sarcóptica, otodécica –, cheyletielose, trombiculose, piolhos), agentes infecciosos (dermatite por *Malassezia* e piodermatites) e alergias (dermatite alérgica, alergia alimentar, dermatite alérgica à picada da pulga (DAPP), hipersensibilidade à picada de outros insetos e alergia por contacto) são os principais diagnósticos diferenciais a ter em mente, pois são todos problemas que resultam num quadro clínico pruriginoso, e em lesões que podem ser confundidas com dermatite atópica. No entanto, todos estes diagnósticos diferenciais podem ocorrer concomitantemente ou ser, no caso das infeções, secundárias à DAC (Dethioux, 2006; Paterson, 2008; Hensel *et al.*, 2015; Jackson & Muller, 2015). Para que sejam descartadas ou identificadas é necessário proceder-se à realização de testes, como, tricograma, raspagens, teste do pente, citologias (figuras 9 e 10) e/ou culturas.

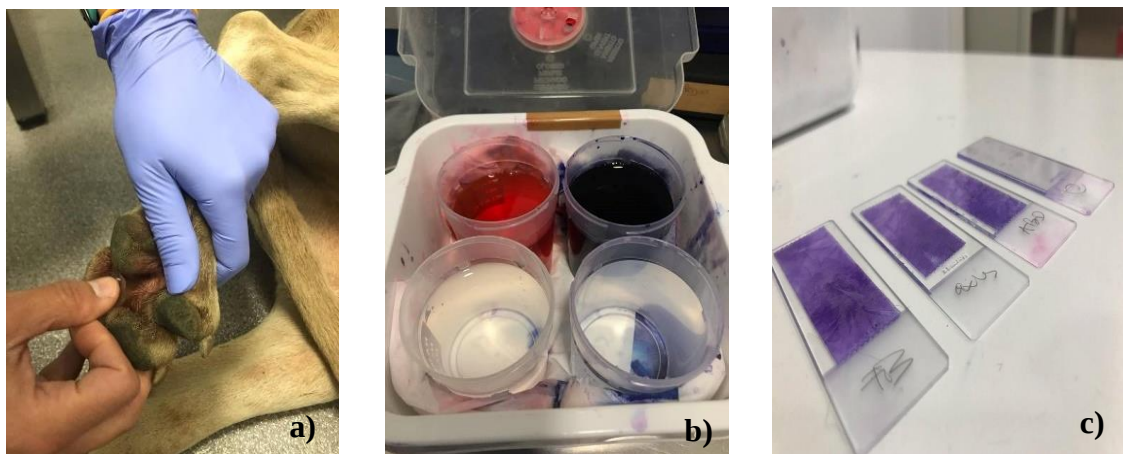


Figura 9. Etapas de diagnóstico citológico. a) Realização de uma citologia interdigital por fita-cola; b) Kit de coloração diff-quick e c) Citologias por fita-cola coradas com diff-quick (original da autora).

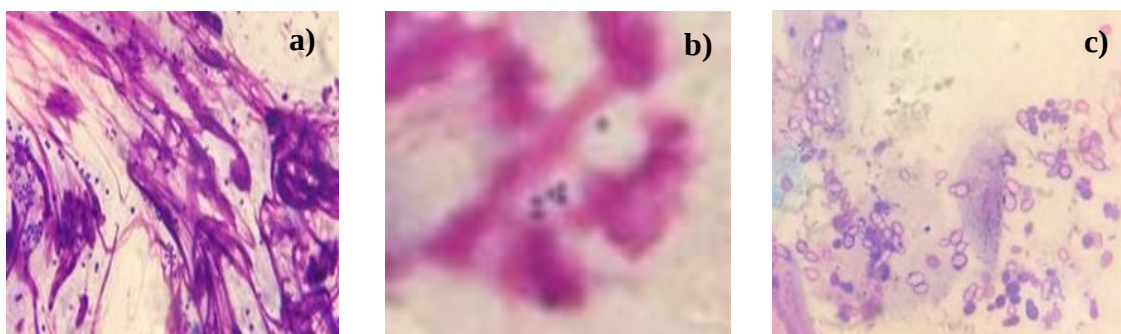


Figura 10. Microorganismos detetáveis ao microscópio. a) Citologia com degeneração neutrofílica e presença de cocos ($\times 1000$); b) Fagocitose de cocos por neutrófilos ($\times 1000$) e c) Citologia com sobrecrecimento de *Malassezias* ($\times 1000$) (original da autora).

1.3.4 Dieta de eliminação

O único teste conhecido e mais fiável para diagnosticar ou eliminar a suspeita de uma alergia alimentar é uma prova de eliminação alimentar seguida de uma provocação. Consiste, essencialmente, em restringir o animal a uma dieta específica. Numa fase inicial, é realizada uma listagem dos alimentos a que o animal possa ter sido exposto durante a sua vida. Após a elaboração da listagem é selecionada uma proteína a que o indivíduo nunca tenha estado em contacto. Opta-se por uma dieta caseira, comercial com proteína selecionada ou uma dieta hidrolizada, esta última alternativa contorna as limitações que a dieta caseira possa acarretar (*compliance*, tempo, dieta balanceada, contaminações cruzadas) e a fiabilidade questionável da listagem dada pelo tutor (Miller *et al.*, 2013; Jackson & Mueller, 2015).

A dieta hidrolizada é uma dieta na qual a proteína é reduzida a pequenos fragmentos (através de uma hidrólise enzimática) que se tornam mais digeríveis e menos alergénicos (Dethioux, 2006; Kennis, 2006). O animal terá de realizar a dieta selecionada de forma exclusiva durante um mínimo de 8 semanas, tendo esta prova de diagnóstico sensibilidade de 90% (Olivry *et al.*, 2015a,b). Após estas semanas, deve realizar-se um teste de provocação com a dieta anterior do paciente (Olivry *et al.*, 2015b). Existem três hipóteses: (1) durante a dieta de eliminação o animal melhora e, aquando da provocação tem uma recaída (as alterações podem ser notadas de minutos a horas até 2 semanas) (Kennis, 2006). Neste caso, pode-se afirmar-se que se trata de um cão com reação adversa ao alimento se na reintrodução posterior com a comida da dieta de eliminação ele voltar a melhorar; (2) o animal melhora parcialmente e pode-se estar perante um cão com as duas patologias em simultâneo (Ricci *et al.*, 2013; Olivry *et al.*, 2015a; Mueller *et al.*, 2016) ou (3) se não melhorar, pode afirmar-se que se trata de um cão com dermatite atópica induzida por alérgenos ambientais. Em casos de respostas duvidosas, deve experimentar-se uma dieta diferente da inicial. Normalmente tal sucede devido ao facto da dieta inicial não ter sido a mais apropriada (erro na listagem por parte do tutor).

1.3.5 Testes alérgicos

Os testes alérgicos são úteis após o diagnóstico confirmado, com o intuito de formular uma terapêutica de dessensibilização específica para o animal (Hensel *et al.*, 2015). A mensuração das IgE totais revela-se um pobre indicador de DAC, uma vez que há a situação de casos clínicos sem a produção de IgE *Atopic-Like* (Miller *et al.*, 2013). Os testes alérgicos permitem identificar potenciais alérgenos aos quais o animal em causa possa ser susceptível tendo, portanto, um valor essencialmente terapêutico e permitindo elaborar uma terapia alérgeno-específica para um melhor manejo do paciente atópico. Estes testes permitem o conhecimento do tipo de alérgenos que se deve evitar e, ainda, distinguir se o animal se trata de um *atopic-like* (Hensel *et al.*, 2015). Existem dois métodos distintos, ambos tendo os seus prós e contras; a tabela 7 mostra as diferenças de ambos os métodos. Depende do clínico, da tolerabilidade do animal e preferência do tutor, qual o melhor teste a aplicar. A serologia IgE alérgeno-específica acaba por ser um teste mais conveniente na medida em que existem vantagens que superam o teste alérgico intradérmico, como sejam, não ser necessária sedação, ser menos traumático/invasivo, menos trabalhoso, menos interação medicamentosa e menos subjetividade

entre clínicos (Olivry *et al.*, 2013b; Miller *et al.*, 2013) No entanto, é de ter em conta que apenas mede os níveis de IgE alérgico-específicos em circulação.

Tabela 7. Diferenças entre os testes alérgicos intradérmicos e serológicos (adaptado de Miller *et al.*, 2013).

Características	Intradérmico	<i>In vitro</i>
Sensibilidade (%)	70 - 90	70 – 100
Especificidade (%)	>90	0 – 90 (varia consoante o laboratório e equipamento)
Risco para o animal	Possível anafilaxia ou reação à sedação	Quase nula
Disponibilidade	Limitado a certas práticas: especialidades	Excelente
Custo por antígeno testado	Barato	Relativamente caro
Sobrecarga clínica	Requer algumas pessoas	Quase nula
Tempo para obter resultados	Minutos	Dias a semanas
Rapidez e facilidade em obter amostra	Horas e requer alguma prática	Minutos e fácil
Resultados influenciados por glucocorticoides	✓	-
Resultados influenciados por <u>antihistaminicos</u>	✓	Não investigado

O teste intradérmico consiste na inoculação de pequenas quantidades (cerca de 0,05ml – 0,1ml) de alérgico (sendo a sua escolha de acordo com a área geográfica em que o animal reside), por via intradérmica. Após cerca de 15-20 minutos a reação é interpretada. É um teste que, se não for realizado por um clínico com experiência, pode resultar em falsos positivos ou negativos. A concentração errada, má seleção dos alérgicos, mau manuseio dos alérgicos, técnica mal efetuada, interação medicamentosa, fatores intrínsecos (stress), cães *atopic-like* e a sazonalidade são exemplos de fatores que podem gerar resultados falso negativos. Testes contaminados, técnica mal efetuada e agentes irritantes são exemplos de fatores que podem provocar resultados falso positivos (Carlotti *et al.*, 1990; Hillier & DeBoer, 2001; Foster *et al.*, 2003; Dethioux, 2006; Bauer *et al.*, 2010; Olivry *et al.*, 2013b; Miller *et al.*, 2013).

A serologia consiste na colheita sanguínea e mensuração de IgE frente a alérgicos específicos no soro. Este processo de mensuração é feita pelo método de ELISA (Miller *et al.*, 2013).

É de considerar que estes testes alérgicos podem gerar resultados falso negativos. Cerca de 10 – 30% dos cães com DAC apresentam resultados falso negativos (Hiller & DeBoer, 2001; Olivry *et al.*, 2010a; Bethlehem *et al.*, 2012; Hardy *et al.*, 2014; Olivry *et al.*, 2015a,b).

1.3.6 Histopatologia

Os achados histopatológicos da DAC são hiperplasia da epiderme, hiperqueratose ortoqueratótica e paraqueratótica, hipergranulose, espongirose, melanose e exocitose de leucócitos. Eosinófilos são detetados em 15% dos casos, estando também presentes múltiplos mastócitos. Foi, também, descrita a presença de um infiltrado celular perivascular com presença de células T, dendríticas, eosinófilos e mastócitos hiperplásicos (Olivry & Hill, 2001). Estudos mais recentes, relativos à fase tardia da reação cutânea, descrevem um padrão que consistia numa dermatite perivascular superficial a intersticial, com presença de neutrófilos e eosinófilos, e presença de hiperplasia epidérmica irregular com linfócitos e eosinófilos, capazes de gerar microabscessos eosinofílicos e infiltração epidérmica e dérmica de células dendríticas (Bikizova *et al.*, 2015b).

A histopatologia no diagnóstico da dermatite atópica canina, é uma ferramenta pouco útil devido aos padrões pouco específicos que apresenta (Patterson, 2008).

1.4 Tratamento

Dada a complexidade da dermatite atópica canina e as diferentes apresentações clínicas que a doença pode evidenciar, é necessário realizar um estudo individualizado de cada caso com o intuito de oferecer a melhor terapêutica personalizada. A educação do tutor é o primeiro ponto a ter em consideração. Esclarecer tudo acerca da DAC e o que esta acarreta, é imprescindível. O tutor deve estar ciente de que está perante uma doença sem cura e laboriosa.

A terapêutica está sempre dependente de cada caso, da região geográfica em que o animal se encontra, da gravidade, da duração dos sinais clínicos, da idade do animal, da expectativa do tutor e das suas capacidades financeiras (Miller *et al.*, 2013).

Diferentes indivíduos possuem uma tolerabilidade ao prurido distinta. O prurido de um animal num dado momento, pode resultar de um efeito cumulativo por parte dos vários componentes envolvidos na DAC. Daí surge o conceito de limiar de prurido, que varia de indivíduo para indivíduo (Dethioux, 2006). A figura 11 demonstra o efeito cumulativo dos vários fatores que levam a que cada limiar de prurido seja diferente. *“O efeito cumulativo de diferentes alérgenos ambientais, alimentares ou parasitários leva o cão a ultrapassar o seu próprio limiar de tolerância e provoca prurido acentuado”* (Dethioux, 2006).

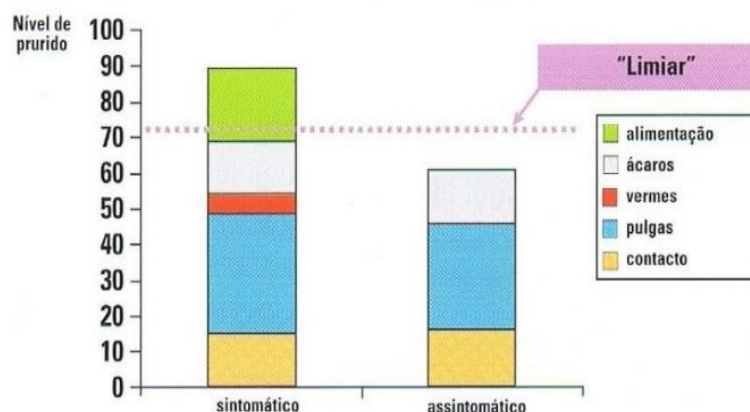


Figura 11. Resumo de uma situação alérgica e o limiar do prurido (Dethioux, 2006).

É imprescindível realizar uma terapia multimodal para cada animal. Esta terapia passa por realizar o manejo do prurido, eliminar todos os fatores que o podem agravar, fornecer uma barreira cutânea de melhor qualidade, evitar contacto com os alérgenos e modular a resposta imunitária.

1.4.1 Maneio dos casos agudos

A) Identificar e eliminar a causa

Como ponto de partida é necessário tentar identificar os potenciais causadores de uma recaída. Perceber se foi uma exposição a alérgenos ambientais, alimentares, uma infestação por pulgas ou mesmo a picada de outros insetos. Assim, é importante realizar toda a anamnese, história e exame dermatológico de modo a tirar conclusões e tentar identificar a causa. É, também, importante detetar possíveis infeções por bactérias ou *Malassezia* e controlá-las (Beco *et al.*, 2013; Hillier *et al.*, 2014; Olivry *et al.*, 2015b).

B) Potenciar a barreira epidérmica

De modo a restringir a exposição aos alérgenos, é essencial proporcionar uma melhoria da barreira epidérmica. O banho é o melhor aliado, por possuir uma ação mecânica na remoção dos alérgenos que ficam retidos no pêlo e pele do animal, proporcionando ao mesmo tempo alívio no prurido e melhoria das lesões cutâneas. Os champôs mais habituais são emulsificantes, contendo vários tipos de lípidos, açúcares complexos e agentes antissépticos que são importantes para aliviar o paciente do prurido. Existem, também, produtos contendo fitosfingosina, e

capazes de não só melhorar o prurido como as lesões presentes. É importante manter banhos com alguma frequência para o alívio do prurido no paciente (Bourdeau *et al.*, 2007; Bensignor *et al.*, 2013; Olivry *et al.*, 2015b).

C) Controlo do prurido e lesões cutâneas

I. Descrito com eficácia clínica

Glucocorticóides tópicos

São usados em casos em que o prurido é, essencialmente, localizado. São, normalmente, usados em forma de aerossóis para uma melhor uniformização na pele; no entanto, existem outras formulações, sendo a eficácia e segurança variáveis (Olivry *et al.*, 2015b). São usados apenas por curtos períodos de tempo para controlo ocasional, sendo o seu uso controlado pela duração e intensidade da recaída. Em casos que seja evidente a presença de atrofia cutânea, pelo o uso recorrente deste fármaco, é de evitar o seu uso nas mesmas regiões (Olivry *et al.*, 2010b; Lourenço *et al.*, 2016).

Glucocorticóides orais

O uso de glucocorticóides orais em alternativa aos tópicos, está, igualmente, indicado em casos agudos (devido à sua rápida ação), em que as lesões e prurido são generalizados. É contraindicado o seu uso por longos períodos de tempos, devido aos potenciais efeitos adversos inerentes; no entanto, estes estão dependentes do tipo de substância, dosagem e duração da terapêutica. A prednisolona ou metilprednisolona a uma dose de 0,5 – 1 mg/Kg SID, repartidos por uma ou duas tomas, são exemplos de glucocorticoides usados com frequência (Jackson & Mueller, 2015).

Oclacitinib

O oclacitinib é uma substância química sintética capaz de inibir as JAK (Gonzales *et al.*, 2014).

O uso de oclacitinib por curtos períodos de tempo aparenta ser seguro, melhorando rapidamente as lesões e prurido, com um pico de ação em poucas horas a uma dose de 0,4 – 0,6 mg/Kg BID. Não está recomendado o seu uso em animais com menos de 12 meses de idade, em casos de infeções concomitantes, nem em casos oncológicos pela imunossupressão inerente

a este fármaco. Este fármaco deve ser usado com precaução em simultâneo com os glucocorticóides orais pois estes podem potenciar um efeito imunossupressivo (Cosgrove *et al.*, 2013a).

Lokivetmab

Com a constante necessidade de criar novas abordagens terapêuticas para fazer face aos tratamentos que a longo prazo se tornam um risco para a saúde do animal, têm surgido vários estudos na tentativa de gerar uma terapêutica que bloqueie os efeitos pruriginosos da IL-31. Kasutani *et al.*, (2014) revelaram que o recetor alfa para a IL-31 é uma potencial alvo terapêutico capaz de bloquear o ciclo do prurido.

Em 2016 surge o primeiro tratamento direcionado especificamente contra a IL-31, o lokivetmab (Cytoint®). Trata-se de um anticorpo monoclonal (mAB) caninizado anti-IL-31, ou seja, é um anticorpo modificado para se tornar o mais possível semelhante ao do cão, para que não hajam reações imunogénicas de rejeição por parte do organismo (Hwang & Foote, 2005). Este possui na sua estrutura, regiões específicas de ligação à IL-31 o que faz com que esta se ligue ao anticorpo ao invés de o fazer ao seu recetor alfa na célula nervosa evitando, deste modo, o desencadear do ciclo do prurido (figura 12) (Michels *et al.*, 2016). Cerca de 82% dos casos que têm uma resposta favorável a este tipo de terapêutica, reduzem o prurido e as visitas ao veterinário (Souza *et al.*, 2018; Ferreira, 2019; Zoetis, 2020). E ainda, de acordo com Souza *et al.* (2018) cães de raças grandes parecem responder de uma forma mais favorável. Apesar da boa resposta pela maioria da população ao lokivetmab, os outros cerca de 18% podem não responder à primeira administração ou, ainda, deixar de responder nas administrações subsequentes. Tal pode dever-se, por exemplo, ao facto de o anticorpo caninizado a certo ponto deixar de ser menos imunogénico e haver uma rejeição pelo organismo (Chaigne & Watier, 2015). A DAC é uma doença multifacetada com muitas interações imunológicas, podendo o controlo de uma só interleucina, em certos casos, não ser suficiente para controlar todo o quadro clínico (Gonzales *et al.*, 2013; Moyaert *et al.*, 2017).

Szczepanik *et al.* (2019) descobriram uma correlação positiva entre a taxa de perda de água transepidérmica (TEWL, do inglês *transepidermal water loss*) e o tratamento com o lokivetmab. Concluíram, portanto, que em certas zonas do organismo a TEWL reduzia com o uso deste fármaco. Tal facto pode permitir obter, no futuro, uma ferramenta que possibilite avaliar a eficácia do lokivetmab em diversos casos.

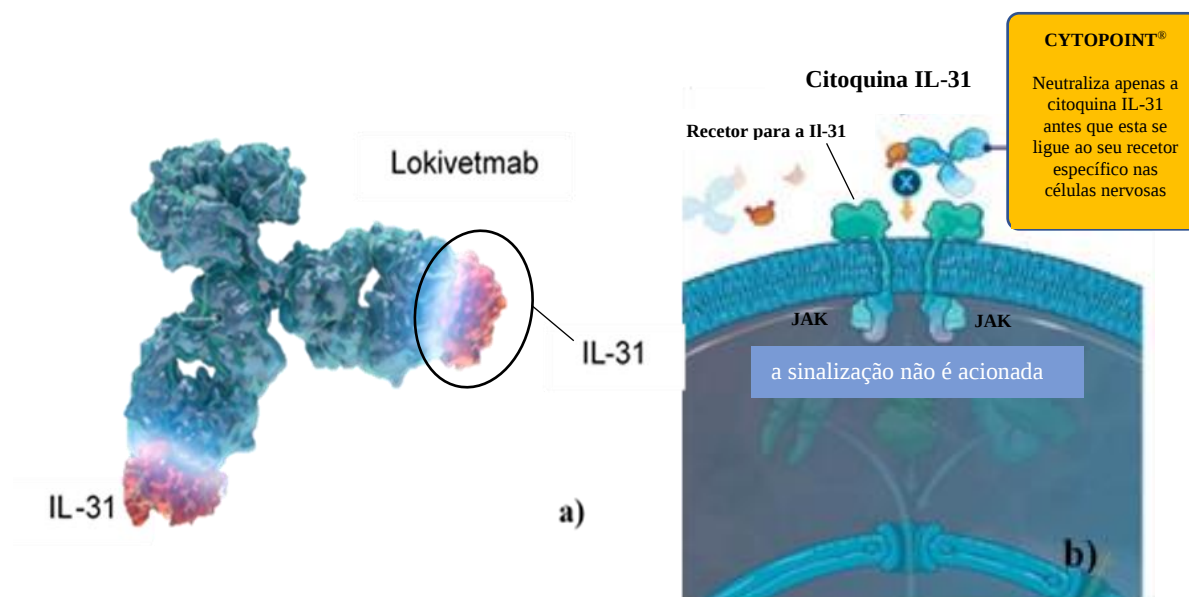


Figura 12. Representação esquemática do funcionamento do Cytopoint®. a) Esquema da IL-31 ligada ao anticorpo monoclonal (lokivetmab); b) Representação esquemática da ação do lokivetmab. Adaptado, Zoetis 2017. Disponível em: <https://www.zoetisus.com/products/dogs/cytopoint/moa.aspx>. Acesso a 26 Maio 2019.

A posologia do lokivetmab é de 1,0 - 3,3 mg/Kg via subcutânea (SC), atuando de forma bastante rápida (cerca de 24h após injeção existe uma diminuição no prurido), tendo uma durabilidade aproximada de 4 a 8 semanas, embora este intervalo de tempo possa variar de indivíduo para indivíduo (Michels *et al.*, 2016a; Zoetis, 2020). É um tratamento bastante seguro, não tendo interações medicamentosas dignas de registo, tendo efeitos adversos mínimos, sendo os mais comuns desconforto no momento da injeção e possíveis sinais gastrointestinais mínimos (vômito, diarreia) (Michels *et al.*, 2016b; Souza *et al.*, 2018). Pode ser administrado a cães com menos de ano de idade. Como se trata de um tratamento direcionado para o prurido, não tem ação direta na inflamação; no entanto, estudos ditam que o uso de lokivetmab de forma proativa, aumenta o intervalo entre crises, ou seja, mantém uma remissão por um tempo mais prolongado (Tamamoto-Mochizuki *et al.*, 2019). A figura 13 representa uma ilustração dos diferentes concentrações de lokivetmab existentes no mercado.



Figura 13. Apresentações disponíveis de lokivetmab. (Reimpressa de 2017, Veterinária Atual, “Vem aí uma nova era no tratamento da dermatite atópica canina?”, Ana Rita Costa).

II. Descrito com pouca ou nenhuma eficácia clínica (em recaídas)

Antihistamínicos

De acordo com estudos anteriores, em certos casos, pode haver algum efeito com a administração de antihistamínicos do tipo 1, com cerca de 20-30% dos casos a responder (Jackson & Mueller, 2015), sendo que o seu uso possa ser mais eficaz em casos de DAC moderada e antes da crise ocorrer, de modo a bloquear a histamina (Baumer *et al.*, 2011; Dell *et al.*, 2012; Eichenseer *et al.*, 2013; Olivry *et al.*, 2015b).

Ácidos Gordos Essenciais

Os ácidos gordos têm uma atuação mais demorada e, portanto, em casos agudos não têm qualquer benefício (Marsella *et al.*, 2013; Olivry *et al.*, 2015b).

Inibidores da Calcineurina

A calcineurina é uma proteína cuja função na dermatite alérgica é a de ativar ou estimular as células T. As formas farmacológicas disponíveis com ação inibidora da calcineurina (tacrolimus, na forma tópica - e ciclosporina, na forma oral) têm uma ação demorada pelo que em crises agudas não são úteis (Olivry *et al.*, 2015b). Em casos de atrofia cutânea, pode ser útil a substituição dos glucocorticóides tópicos pelo tacrolimus (Miller *et al.*, 2013, Jackson & Mueller, 2015; Olivry *et al.*, 2015b).

1.4.2 Maneio dos casos crónicos

A) Identificar e evitar fatores desencadeantes

I. A dieta

Uma vez que cães com reação adversa ao alimento possuem sinais clínicos semelhantes aos da dermatite atópica, como já referido, é essencial a realização de uma dieta de eliminação, sendo este o único método fiável capaz de afirmar se um cão é ou não, de facto, atópico. Assim, esta é considerada o *gold standard* no diagnóstico da RAA até aos dias de hoje (Kenny, 2006; Olivry *et al.*, 2015a; Mueller *et al.*, 2016).

É importante ter atenção ao armazenamento de qualquer que sejam as dietas secas que o paciente esteja a fazer, visto que nestas pode haver presença de ácaros de armazenamento, que poderão desencadear crises agudas. Uma opção, embora não completamente provada, seria o congelamento das dietas, evitar armazená-las em zonas húmidas e quentes e armazenar em contentores selados, evitando deste modo as possíveis contaminações (Olivry *et al.*, 2015a).

II. Controlo das infestações

Nos cães com DAC, é essencial um plano efetivo contra infestações. Se os banhos forem prescritos de forma regular, para além das formas tópicas de antiparasitário, devido à sua remoção mecânica, é essencial uma administração de antiparasitários sistémicos e orais de modo a precaver a remoção dos tópicos (Olivry *et al.*, 2015b).

III. Controlo dos ácaros da casa e controlo das infeções secundárias

Torna-se essencial evitar ou diminuir a exposição aos alérgenos a que o animal é sensível, como é o caso dos alérgenos ambientais, alimentares, infestações por pulgas ou ácaros e, mesmo, evitar a exposição a outros tipos de insetos passíveis de desencadear uma crise. Para tal, é necessário recolher uma anamnese e história de qualidade, de forma a que sejam fornecidas informações sobre a que o animal possa ser hipersensível. Os testes alérgicos podem, também, ser uma ferramenta útil na sua determinação (Olivry *et al.*, 2010a,b; Olivry *et al.*, 2015b). Em casa, a tomada de medidas como aplicação de aerossóis acaricidas como forma

preventiva de crises é um assunto, ainda, discutido (Swinnen & Vroom, 2004; Fujimura, 2011; Olivry *et al.*, 2015b).

Realizar um bom exame dermatológico é, igualmente, importante na medida em que permitirá controlar infecções por bactérias ou *Malassezia*, visto que são potenciadoras de recaídas. Fazer uma boa gestão destas infecções é um bom ponto de partida como já referido (Olivry *et al.*, 2010a; Beco *et al.*, 2013; Hillier *et al.*, 2014; Olivry *et al.*, 2015b).

IV. Identificar alergénios via serológica ou intradérmica

Como já descrito acima, estes testes, quer por via intradérmica, quer por serologia, não são tão úteis no diagnóstico de DAC uma vez que existem cães com resposta positiva que não padecem de DAC. São, assim, uma importante arma terapêutica mas não diagnóstica (Olivry *et al.*, 2015b). A sua realização apenas permite obter informação sobre os alérgenos ambientais a que o animal possa ter hipersensibilidade e, deste modo, tentar evitar o seu contacto com o animal. É, também, útil para formular uma imunoterapia alérgeno-específica (Timm *et al.*, 2018).

V. Controlo de outros possíveis fatores

É importante alertar o tutor para ter em atenção quais as situações em que o animal possa ter recaídas. Embora seja escassa a evidência para recomendação aos tutores acerca do ambiente, humidade, detergentes ou *stress* como potenciadores de recaídas é, no entanto, pertinente mencioná-las (Olivry *et al.*, 2010a; Olivry *et al.*, 2015b).

B) Promover uma barreira epidérmica adequada

I. Banhos regulares

Prescrever um banho semanal com champôs que não sejam irritantes para a pele, é recomendado pelas *guidelines*, para auxiliar na remoção mecânica dos alérgenos depositados na pele e pêlo do animal. A escolha do champô é inerente a cada caso específico; para peles seborreicas, oleosas e na presença de infecções é necessário aplicar um produto anti-seborreico

e antiséptico, enquanto que para peles muito sensíveis a aplicação de champôs emolientes pode ser útil (Olivry *et al.*, 2010b; Olivry *et al.*, 2015b).

II. Suplementar com ácidos gordos essenciais: orais e tópicos

Em casos crónicos, a toma oral ou a aplicação tópica de ácidos gordos essenciais (EFA, do inglês *essential fatty acid*), especialmente os ricos em omegas 6, pode ser benéfico, repondo os lípidos da camada superficial da pele. A sua toma por via oral de forma suplementada ou na dieta pode, também, ser benéfica (ainda que com pouco impacto clínico) na redução dos sinais clínicos. É de ter em atenção que a toma via dieta alberga maiores quantidades de EFA's do que em modo suplementação (Olivry *et al.*, 2010a; Popa *et al.*, 2011; Olivry *et al.*, 2015b).

Em relação aos EFA's de forma tópica, embora de exista pouca evidência, alguns estudos relatam uma melhoria na composição da barreira epidérmica (Piekutowska *et al.*, 2008; Popa *et al.*, 2012; Blaskovic *et al.*, 2014; Olivry *et al.*, 2015b). A toma oral pode apresentar algumas limitações em certos casos, pelo que a forma tópica pode ser uma alternativa válida, tornando a sua aplicação mais facilitada, como adjuvante de outras terapêuticas (Marsella *et al.*, 2013).

O uso destes meios adjuvantes na terapêutica permite, potencialmente, uma redução das doses terapêuticas de outros fármacos sistémicos, evitando assim os potenciais efeitos secundários inerentes ao seu uso prolongado (Olivry *et al.*, 2010b).

C) Controlo do prurido e lesões cutâneas

Glucocorticóides tópicos

Os glucocorticóides tópicos são benéficos na redução dos sinais clínicos da DAC; no entanto, o seu uso deve ser consciente devido às consequências inerentes ao seu uso excessivo (por exemplo, a atrofia cutânea). O tacrolimus é um fármaco imunomodulador inibidor da calcineurina que pode ser usado em alternativa aos glucocorticoides tópicos (Olivry *et al.*, 2010a; Olivry *et al.*, 2015b).

Imunomoduladores

Os glucocorticóides orais, a ciclosporina e o oclacitinib parecem ter efeitos benéficos no controlo de cães com DAC crónica. Dos três, a ciclosporina é o que possui um maior tempo até

ao início de ação (aproximadamente duas semanas). De modo a controlar a sintomatologia até início da sua ação, pode combinar-se com glucocorticóides e oclacitinib nas primeiras semanas de tratamento. Não é, no entanto, recomendado o uso prolongado destas combinações que pode resultar num possível efeito imunossupressor e predispor ao aparecimento de infeções oportunistas (Dip *et al.*, 2013). Na administração de glucocorticóides a longo prazo é indicada, uma monitorização via urianálise e culturas de urina para controlar possíveis infeções. Em relação à ciclosporina ou oclacitinib não existe consenso sobre a realização de análises com o intuito de monitorizar com a administração prolongada destes fármacos, mas está indicado com o aparecimento de sinais clínicos sistémicos (Olivry *et al.*, 2015b).

A posologia dos glucocorticoides orais, como a prednisolona e metilprednisolona, deve ser realizada a uma dose de 0,5 mg/Kg SID ou BID para atingir a remissão, devendo haver posteriormente uma redução gradual da dose e frequência, que resulte numa reduzida incidência de efeitos adversos nesse animal de modo a manter a remissão (Olivry *et al.*, 2003; Olivry & Bizikova, 2013; Gadeyne *et al.*, 2014).

A ciclosporina é um fármaco imunossupressor, inibidor da calcineurina. Tem um efeito benéfico no controlo da sintomatologia de cães com DA; no entanto, o seu longo tempo de início de ação não permite o seu uso em casos agudos. A sua dosagem é de 2,5 - 5mg/kg SID até cerca de 4 a 6 semanas, que é o tempo médio para melhoria dos sinais clínicos, com redução gradual por frequência ou dose. Alguns autores descrevem que a ciclosporina dada em suspensão tem melhor tolerabilidade do que a dada em cápsulas (Steffan *et al.*, 2006; Olivry & Bizikova, 2013; Little *et al.*, 2015; Navarro *et al.*, 2015).

O oclacitinib tem como dosagem 0,4 – 0,6 mg/Kg BID, durante um período de 14 dias, passando de seguida para SID, sendo este regime considerado seguro. Está contraindicado o seu uso em casos oncológicos, animais com menos de 12 meses e que tenham infeções concomitantes. Cerca de 5 a 10% dos casos aparentam desenvolver efeitos adversos, como infeções urinárias/cistites, piodermas, otites externas, emése e diarreia (Cosgrove *et al.*, 2013b; Gadeyne *et al.*, 2014; Cosgrove *et al.*, 2015; Little *et al.*, 2015).

O interferão recombinante canino, é um imunomodulador biológico que apresenta alguma eficácia no tratamento da DAC, à dose de 5.000 – 10.000 Un/Kg, 3 vezes por semana, durante 4 semanas, sendo, posteriormente reduzido para 1 vez por semana (Iwasaki & Hasegawa, 2006; Olivry *et al.*, 2010b; Yasukawa *et al.*, 2010).

Outras formas farmacológicas com pouca ou nenhuma eficácia

Como referido anteriormente, os antihistamínicos do tipo 1 são descritos como pouco ou nada eficazes; no entanto, em certos casos, podem ser benéficos, especialmente se usados antes de uma crise aguda (Bizikova *et al*, 2008; Olivry *et al.*, 2010a).

O masitinib, um inibidor da tirosino-quinase, aparenta ter benefícios no controlo da DAC; contudo, pode ter efeitos adversos graves a nível renal, pelo que o seu uso só é realizado como alternativa a animais que não estão a responder a outras opções terapêuticas de primeira linha, sendo sempre necessário fazer um controlo apertado da proteinúria (Cadot *et al.*, 2011).

Mais estudos acerca da pentoxifilina, metotrexato, vitamina E como adjuvante dos antihistamínicos, são necessários para determinar se são opções terapêuticas viáveis no controlo da DAC. Outra opção que parece ter algum efeito, ainda que mínimo, na DAC é o uso de fluoxetina oral (inibidor seletivo da recaptção de serotonina) e o laser (Olivry *et al.*, 2015b).

1.4.3 Evitar a recaída – estratégias

A) Evitar fatores desencadeantes

B) Abordagem reativa *versus* proactiva

O método reativo é usado quando se usa um fármaco, doses e frequências mais altas, de modo a atingir a remissão de forma rápida. Os fármacos mais frequentemente usados para esse controlo rápido são os glucocorticóides orais. Estes são usados a uma dose que resulte num controlo rápido do animal, reduzindo-se, posteriormente, o fármaco e substituindo-se por outros com menos probabilidade de gerar efeitos adversos (oclacitinib/ciclosporina/lokivetmab). Quando o animal está estabilizado com os fármacos de manutenção anteriormente mencionados, pode adotar-se uma abordagem proactiva. Nesta, são usados, de forma prolongada, mas apenas alguns dias por semana (por exemplo, dois dias por semana consecutivos), fármacos anti-inflamatórios (glucocorticóides), de modo a aumentar o intervalo entre recaídas (Lourenço *et al.*, 2016). Só perante uma recaída se retoma ao método reativo (figura 14a).

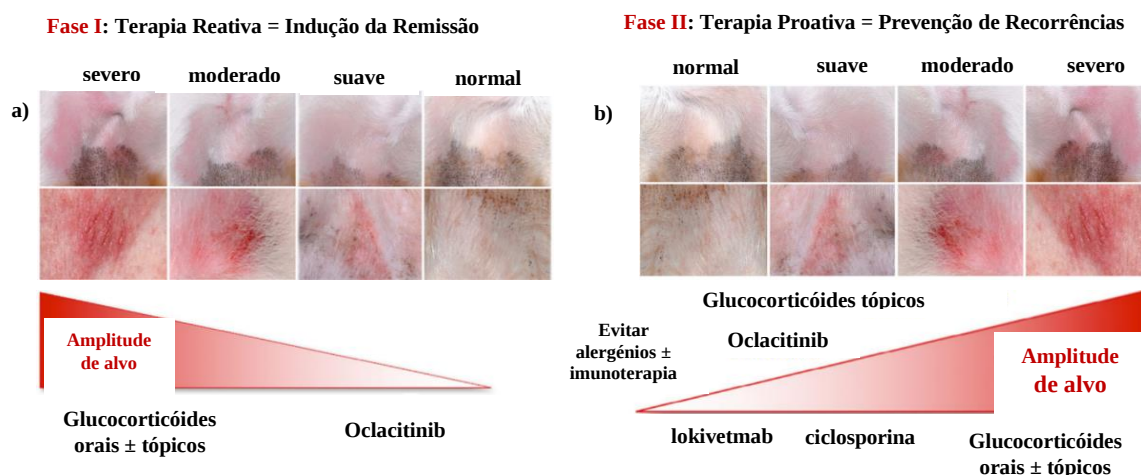


Figura 14. Abordagem das terapêuticas a aplicar. a) Terapêutica Reativa e b) Terapêutica Proativa (Adaptado de Olivry & Banovic, 2019).

Esta abordagem permite-nos ter um animal com alguma estabilidade pelo maior tempo possível (Olivry *et al.*, 2015b; Olivry & Banovic, 2019; Tamamoto-Mochizuki *et al.*, 2019).

C) Imunoterapia alérgeno-específica

A imunoterapia alérgeno-específica (ASIT, do inglês *allergen-specific immunotherapy*) é considerada o único tratamento disponível que pode alterar o curso da dermatite atópica canina, resultando na dessensibilização aos alérgenos aos quais o animal tem hipersensibilidade. A imunoterapia é considerada segura e eficaz. É necessário, inicialmente, determinar, através da utilização de testes alérgicos (intradérmicos e/ou serológicos), quais os alérgenos a que o animal é sensível. Posteriormente, de forma gradual, são administradas concentrações crescentes de extratos alérgénicos a que o animal é hipersensível (Olivry *et al.*, 2015b).

Para a realização de ASIT é necessário haver um diagnóstico confirmado de DAC. A indicação para o uso de ASIT inclui (1) quando não é possível evitar o contacto com os alérgenos; (2), quando as modalidades terapêuticas não são eficazes a controlar o quadro ou estão associadas a efeitos adversos (Loewenstein & Mueller 2009).

A administração pode ser feita via subcutânea (SCIT do inglês *Subcutaneous Immunotherapy*), sublingual (SLIT, do inglês *Sublingual Immunotherapy*) ou intralinfática (ILIT, do inglês *Intralymphatic Immunotherapy*), sendo que o protocolo de tratamento varia consoante o método de administração e animal (Loewenstein & Mueller 2009). A via subcutânea é a via padrão usada, com frequência pelos clínicos, sendo segura e eficaz (Olivry

et al., 2010b). A via sublingual consiste na aplicação de uma pulverização diária, na região sublingual (DeBoer, 2016), tendo sido demonstrado tratar-se de uma opção com eficácia. A mucosa oral possui numerosas células dendríticas capazes de apresentar os alérgenos às células T, acreditando-se ser este mecanismo alternativo à administração subcutânea. A via intralinfática consiste na inoculação mensal do extrato (uma quantidade menor que a utilização na opção subcutânea), nos linfonodos poplíteos ou submandibulares, através de ecografia, sendo esta uma opção segura e prática (Timm *et al.*, 2018).

A ASIT é uma abordagem de tratamento da DAC que pode demorar a fazer efeito e, portanto, é necessário o uso de outras modalidades para controlo do quadro até que haja efeito da imunoterapia. É aconselhado manter a terapia por um mínimo de um ano para que se possam retirar conclusões sobre a sua eficácia (Olivry *et al.*, 2010a; Miller *et al.*, 2013). Cerca de 50 - 80% dos casos tratados por 6 a 12 meses obtêm uma resposta favorável na melhoria dos sinais clínicos, com a possibilidade de redução das terapêuticas concomitantes impostas (Loewenstein & Mueller 2009; Olivry *et al.*, 2010a).

D) Lokivetmab

Como descrito acima, o lokivetmab revela ter um efeito considerável no intervalo de tempo até à remissão, ou seja, este anticorpo, para além de reduzir o prurido, é capaz de auxiliar no atraso de uma recaída, pelo que será útil o seu uso de forma proactiva nos casos em que há eficácia (Tamamoto-Mochizuki *et al.*, 2019).

A tabela 8 apresenta sumariamente, o uso dos fármacos descritos.

Tabela 8. Resumo dos diferentes fármacos e sua aplicabilidade (original da autora).

Fármacos						
	Glucocorticóides Orais	Glucocorticóides Tópicos	Oclacitinib	Lokivetmab	Ciclosporina	Tacrolimus
Prurido Focal		x				x
Prurido Generalizado	x		x	x	x	
Inflamação	x	x	x		x	x

1.5 Objectivos

Para o presente trabalho foram propostos os seguintes objetivos:

- Quantificar os níveis séricos de IL-31 em cães com DA sob terapêutica com lokivetmab, um anticorpo monoclonal anti-IL-31, com o nome comercial Cytoint[®];
- Avaliar a eventual correlação entre os níveis de IL-31, o quadro clínico e a resposta ao tratamento.

Pretendeu-se, de um modo geral, analisar de que forma os níveis séricos de IL-31 em cães com dermatite atópica, variam com a administração de lokivetmab e se traduzem na melhoria da sua condição clínica.

2. MATERIAL E MÉTODOS

A recolha de amostras para a presente investigação teve lugar, entre Setembro de 2018 e Setembro de 2019, e decorreu, essencialmente, no Hospital Veterinário Berna, em Lisboa, embora tenha havido, também, a participação de outros centros veterinários, como o Hospital Veterinário Casvet, na Parede, a Clínica do Animal, na Bobadela e o Hospital Veterinário do Porto. O processamento das respetivas amostras teve lugar no Laboratório de Análises Clínicas e Histopatologia (LACH) da Faculdade de Medicina Veterinária (FMV) da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias (ULHT).

Antes do início do estudo foram elaborados dois protocolos, um para a Comissão de Ética e Bem Estar Animal da ULHT, o qual foi aprovado, e um último protocolo para uso interno. Os tutores de todos os cães estudados deram o seu consentimento informado, para a inclusão dos animais no trabalho.

A amostra alvo foi uma população canina composta por animais que cumpriram os seguintes critérios de inclusão: i) cães de proprietários privados; ii) cães com diagnóstico de dermatite atópica confirmado; iii) cães com necessidade de controlo do prurido; iv) cães que não foram submetidos a terapêutica anti-inflamatória/imunomoduladora (como corticoterapia sistémica, oclacitinib, ciclosporina) no mês que antecedeu a primeira administração de lokivetmab; v) cães sem qualquer outra condição patológica sujeita a um controlo farmacológico que compromettesse o estudo e vi) cães que não tivessem alterado, no mês que antecedeu o estudo, tratamentos tópicos como aplicação de champôs, anti-parasitários e ASIT.

Com estes critérios obteve-se um total de dez cães, sendo três deles, controlos, que foram avaliados mas não receberam Cytopoint® (e sem grande necessidade de controlo do prurido) e os restantes sete casos de estudo, aos quais foi administrada a terapêutica.

A todos os animais incluídos no estudo foi feita recolha de 1ml sangue total, de preferência da jugular, para um tubo seco. Após retração do coágulo, as amostras foram centrifugadas a 2500 g, durante 10 minutos. O soro assim obtido foi separado para microtubos de 1,5 ml e armazenado a - 20°C, até à data do processamento.

Para todos os cães em estudo as recolhas foram realizadas em três tempos diferentes:

T0 - Primeira consulta – admissão dos candidatos.

1. Os animais foram sujeitos a uma anamnese e exame dermatológico detalhado para descrição de todas as lesões presentes (uso da escala CADLI, como consta no anexo I), avaliação do grau de prurido apresentado naquele momento (uso da escala pVAS, como consta no anexo II) e registo fotográfico, quando possível. Foram, de seguida, entregues os folhetos de apresentação do estudo a que o animal se candidatava e preenchido o termo de consentimento do tutor (apêndices I e II).
2. Recolha de sangue;
3. Administração subcutânea na região interescapular de lokivetmab (tabela de posologia no anexo III), consoante o peso corporal do paciente (10 mg, 20 mg, 30 mg, 40 mg). Os cães pertencentes ao grupo de controlo não receberam o lokivetmab.

T1 – Segunda consulta – reavaliação, 1 mês após T0.

1. Repetição do ponto 1 descrito no tempo 0, com a exceção da entrega de documentos.
2. Nova recolha de sangue;
3. Nova administração de lokivetmab.

T2 – Terceira consulta – reavaliação, 1 mês após T1.

1. Repetição do ponto 1 descrito em T1;
2. Última recolha de sangue.

O doseamento da IL-31 nas amostras de soro foi realizado com o recurso ao kit de ELISA competitiva, *Canine IL-31 ELISA* (ABclonal, USA), de acordo com as instruções do fabricante (anexo IV), a seguir descritas.

O processamento das amostras foi realizado em dois momentos distintos, uma parte a 24 Abril de 2019 e a restante a 2 de Setembro de 2019, com kits de lotes diferentes. O teste utilizado tem alta sensibilidade (± 1.0 pg/ml) e uma excelente especificidade.

Todo o processo foi realizado com material de proteção adequado. Para o processamento dos soros foi utilizado do kit, uma microplaca com um total de 96 poços com um anticorpo específico para a IL-31 incorporado no fundo de cada um destes, seis padrões com concentrações de IL-31 crescentes, uma solução de lavagem concentrada, dois substratos A e B (cromógeno), uma solução *stop* e uma solução enzimática (IL-31 conjugada com uma enzima). Na figura 15, é apresentado o kit utilizado com os seus respectivos reagentes e placa.



Figura 15. *Kit Canine IL-31 Elisa kit, ABclonal.*
(original da autora).

Para obter uma maior exactidão dos resultados, cada amostra de soro, padrões e branco, foi realizada em triplicado.

As amostras de soro congeladas foram colocadas à temperatura ambiente, para descongelarem. Os reagentes foram, também, colocados à temperatura ambiente, durante 5 a 10 minutos antes de se iniciar o procedimento experimental, a seguir descrito. Foi, ainda necessário preparar uma solução de lavagem, diluindo a solução concentrada 25 vezes em água destilada.

A execução experimental dos ensaios de ELISA foi a seguinte:

1 – Colocaram-se 100 μ L de cada amostra de soro e cada padrão em três poços previamente definidos e 100 μ L de água nos três poços pré-definidos como “branco”;

2 – Adicionaram-se 50µL da solução enzimática (IL-31 conjugada) em cada um dos poços, com exceção do “branco” e agitou-se a placa de modo a homogeneizar;

3 – Colocou-se a placa coberta com papel de alumínio numa câmara húmida e incubou-se numa estufa a 37°C, durante 1 hora;

4 – Lavaram-se os poços com a solução de lavagem previamente preparada, cerca de cinco vezes, de modo a remover a IL-31 que não se ligou ao anticorpo da placa; de seguida, removeu-se o excesso de água que ficou retida com pequenas pancadas da placa invertida sobre um papel absorvente, tendo sempre o cuidado para que os poços não se soltassem durante o processo;

5 – Adicionaram-se 50µL de substrato A a cada poço, seguindo-se uma de adição de 50µL de substrato B (tendo cuidado com a exposição deste substrato à luz pois é fotossensível); cubriu-se novamente a placa e incubou-se por mais 10-15 minutos, à temperatura ambiente, num local escurecido;

6 – Adicionaram-se 50µL de solução *stop* a cada poço, seguindo-se uma homogeneização (tendo o cuidado para adicionar a solução sempre pela mesma ordem que foram adicionados os substratos no ponto anterior); após este processo, mediu-se de imediato a absorvância a 450 nm, com o auxílio de um espectrofotómetro (Thermo Scientific, Multiskan FC®). O princípio assenta numa reação colimétrica que ocorre após adição do substrato, quanto maior a intensidade da cor, menor será a concentração de IL-31 das amostras em teste;

7 – Para obter o valor do “branco” calculou-se a média entre os respetivos triplicados. De seguida, subtraiu-se a absorvância (abs) média do “branco”, à absorvância de cada amostra e cada padrão e calcularam-se as médias dos restantes triplicados;

8 – Com o auxílio do software Exel® 2016 MSO construiu-se um gráfico com o valor da absorvância dos padrões e suas concentrações para obtenção da recta de calibração (no gráfico não se usa o padrão A que corresponde à concentração nula de IL-31). Para o cálculo do valor de “x” (abs), utilizou-se a seguinte equação: $Abs = \frac{abs\ padrão}{abs\ padrão\ 0\ (A)} \times 100$. O mesmo se aplicou às amostras: $Abs = \frac{abs\ amostra}{abs\ padrão\ 0\ (A)} \times 100$. Para obter o “y” (concentração) aplicou-se o $\log_{10}$ da concentração do padrão pré-definida pelo fabricante do kit. Após a construção da recta de calibração, procedeu-se à sua linearização (neste estudo optou-se por aplicar a regressão polinomial para uma melhor exatidão dos resultados, devido ao desvio de valores apresentado)

para obtenção da respetiva equação. Nos dois ensaios realizados obtiveram-se as seguintes equações: $y = 0,0004x^2 - 0,051x + 3,3145$ para o primeiro ensaio e $y = 0,0001x^2 - 0,028x + 3,0716$ para o segundo, com os coeficientes de correlação de $R^2 = 0,9925$ e $R^2 = 0,9919$, respetivamente. Para cada amostra a equação da recta foi resolvida em relação a “y”, após substituição do respectivo valor de absorvância anteriormente calculado;

9 – Para o cálculo da concentração final das amostras em estudo aplicou-se a potência de 10 ao valor de “y” obtido no ponto anterior.

Análise Estatística

Os resultados obtidos foram processados pelo programa informático Microsoft® Excel® 2016 MSO, tendo sido elaboradas tabelas e gráficos e posterior análise estatística de carácter descritivo.

3. RESULTADOS

3.1. Caracterização da amostra

Nesta secção serão descritos, através de gráficos, algumas características epidemiológicas (género, raça e idade) da população em estudo. Foram incluídos no estudo um total de 10 cães diagnosticados com dermatite atópica, sendo que 3 (30% – 3/10) entraram para o estudo como amostras controlo. Um dos indivíduos foi constituído controlo e, posteriormente, caso de estudo, por necessidade do animal realizar o tratamento. A figura 16 apresenta a frequência relativa de casos e controlos.

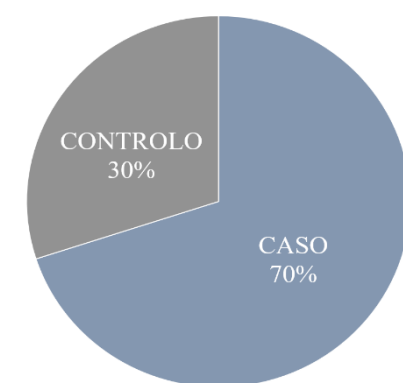


Figura 16. Frequência relativa (%) de casos de estudo e controlos.

- **Género**

Do total dos 10 cães, 70% (7/10) eram fêmeas, e 30% (3/10) machos. Dos três controlos, apenas um indivíduo era macho. Na figura 17 encontra-se discriminada a frequência relativa de géneros na amostra estudada.

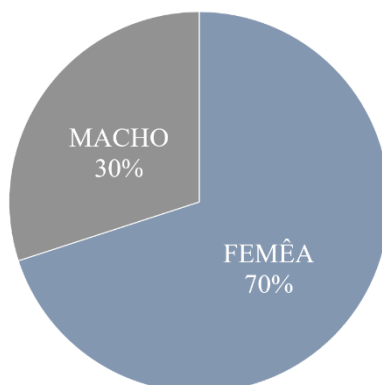


Figura 17. Frequência relativa (%) de género no total dos animais em estudo.

- **Idade**

Em termos de idade, verificou-se uma variância dos 11 meses aos 6 anos de idade, com uma predominância nos 2 anos (40% – 4/10), seguida de 3 indivíduos com 1 ano de idade (30% – 3/10), um com 11 meses (10% – 1/10), outro com 4 anos (10% – 1/10) e um com 6 anos (10% – 1/10), como apresentado na figura 18.

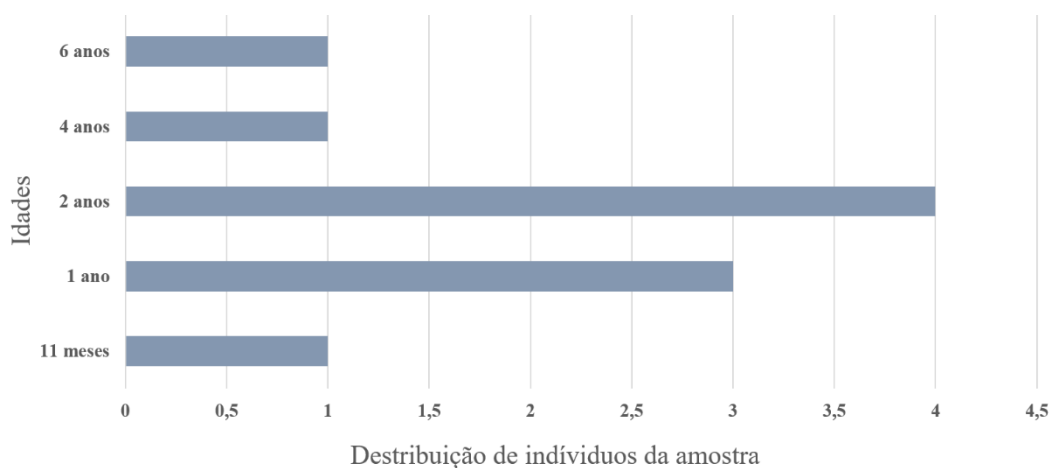


Figura 18. Distribuição dos animais em estudo em função da idade.

- **Raça**

Como mostra a figura 19, a maioria dos cães, 60% (6/10), não apresentava raça definida. Os restantes quatro indivíduos, pertenciam às raças Weimaraner, Braco Alemão, Fox Terrier e Pug.

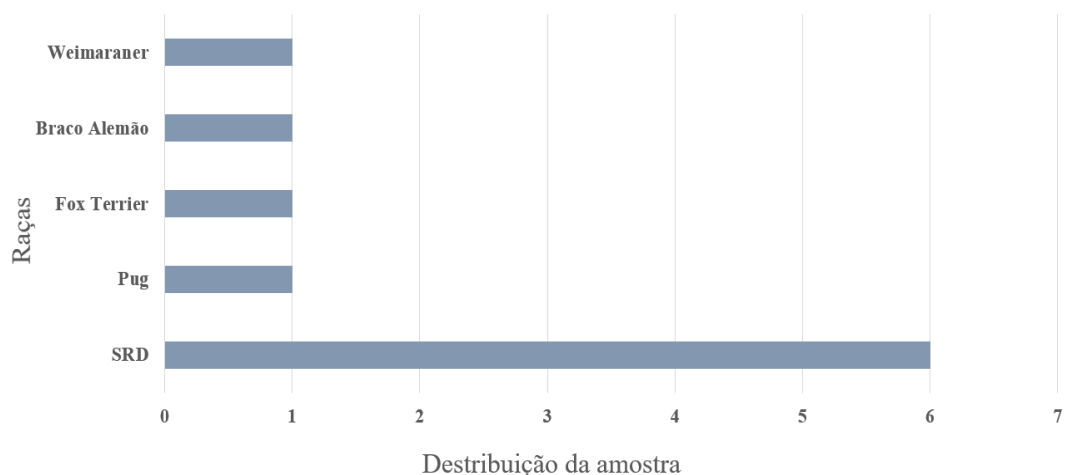


Figura 19. Distribuição dos cães em estudo em função da raça. SRD – sem raça definida.

3.2. Determinação da concentração de IL-31

Os resultados da quantificação de interleucina 31 obtidos pelo método de ELISA competitiva, variaram entre 39,9 pg/ml e 561,8 pg/ml. Em relação à média dos valores obtidos nos diferentes tempos, obteve-se no grupo controlo ao T0, uma média de 56,35 pg/ml, ao T1 uma média de 55,75 pg/ml e ao T2 de 96,5 pg/ml. Este último valor não se trata de uma média, mas apenas do resultado de um cão, visto que um dos controlos não tinha T2 por passar a constituir caso de estudo. É de notar, ainda, que se optou por não incluir nesta média um dos controlos (indivíduo 3), pelo facto de se terem obtido valores muito díspares dos restantes. A média nos casos de estudo ao T0 foi 70,3 pg/ml, ao T1 de 93,6 pg/ml e ao T2 de 81,2 pg/ml. Esta última média no tempo T2, apenas se gerou a partir de três dos indivíduos, porque dois casos não responderam ao tratamento (indivíduos 6 e 7), outro caso (indivíduo 5) não deu continuação à terapêutica, pelo que não foi feita colheita em T2 destes três cães. Porque o valor em T2 do indivíduo 4 era muito díspar dos tempos anteriores, este resultado foi, também, excluído no cálculo da média (tabela 9).

Tabela 9. Valores das concentrações de IL-31 obtidas.

CASOS	[IL-31] (pg/ml)		
	T0	T1	T2
Controlo 1*	54,8	62,3	a.c
Controlo 2	57,9	49,2	96,5
Controlo 3**	554,7	312,1	561,8
Média	56,35	55,75	96,5
Indivíduo 1	116	130,4	89,2
Indivíduo 2	57,8	124,3	84,5
Indivíduo 3	52,5	49,9	69,9
Indivíduo 4	102,6	63,0	403,5**
Indivíduo 5*	62,3	137,1	a.c
Indivíduo 6	60,7	61,6	a.c
Indivíduo 7	39,9	89,1	a.c
Média	70,3	93,6	81,2

*mesmo indivíduo. **valor excluído do cálculo da média. [IL-31] – concentração de interleucina-31. a.c – ausência de colheita

3.3. Escala de prurido – pVAS

Os valores obtidos pela aplicação da escala de prurido visual (pVAS) aos controlos, variaram entre 3 e 5 no tempo T0, de 4 a 8 no tempo T1. A mediana ao T2 neste grupo não foi possível aplicar devido apenas haver um valor (correspondente ao T2 do controlo 2), sendo por esta razão só ser possível fazer uma interpretação com base em dois tempos (T0 e T1), sendo as medianas, 4 em T0 e 6 em T1. Em relação aos casos de estudo, estes obtiveram valores de pVAS entre 3 e 10 ao T0, 1 e 10 ao T1 e 0 e 2 ao T2, com medianas de 7 em T0, 2 em T1 e 2 em T2. Na tabela 10 estão descritos os resultados da avaliação com a pVAS para cada grupo de estudo. É de salientar, novamente, que o controlo 3 e o T2 do indivíduo 4 não entraram para a estatística.

Tabela 10. Resultados obtidos da avaliação pVAS, de todos os animais em estudo.

CASOS	Avaliação da escala pVAS		
	T0	T1	T2
Controlo 1	5	8	-
Controlo 2	3	4	6
Mediana	4	6	-
Indivíduo 1	6	1	0
Indivíduo 2	7	2	6
Indivíduo 3	3	4	2
Indivíduo 4	7	2	-
Indivíduo 5	8	2	-
Indivíduo 6	10	10	-
Indivíduo 7	7	7	-
Mediana	7	2	2

3.4. Escala de lesões – CADLI

A escala CADLI pode apresentar valores que variam de 0 a 50. Para os controlos, os resultados obtidos nesta avaliação variaram entre 7 e 12 no tempo T0, 2 e 14 no tempo T1. Uma vez mais não foi possível utilizar valores de mediana ao T2 nesta escala pelo facto de haver apenas um valor. Para este grupo, a mediana obtida foi de 9,5 em T0 e 8 em T1. Em relação aos

casos de estudo, obtiveram-se valores entre 0 e 14 no tempo T0, 0 e 7 no tempo T1 e 0 e 3 no tempo T2. A mediana foi de 9 em T0, 2 em T1 e 0 em T2. Na tabela 11 estão representados, para ambos os grupos em estudo, os resultados da avaliação da escala CADLI.

Tabela 11. Resultados da avaliação CADLI, para todos os animais em estudo.

CASOS	Avaliação da escala CADLI		
	T0	T1	T2
Controlo 1	7	14	-
Controlo 2	12	2	7
Mediana	9.5	8	-
Indivíduo 1	9	1	0
Indivíduo 2	12	0	3
Indivíduo 3	3	3	0
Indivíduo 4	0	2	-
Indivíduo 5	14	5	-
Indivíduo 6	9	7	-
Indivíduo 7	1	0	-
Mediana	9	2	0

Na tabela 12 são apresentados todos os casos incluídos no presente estudo e seus respectivos valores de prurido, lesões e concentração de IL-31, nos três tempos de amostragem (T0, T1 e T2), de modo a obter-se uma visão geral do estudo.

Tabela 12. Resultados globais dos casos incluídos no estudo.

Código	Género	Raça	Idade	T0			T1			T2		
				pVAS	CADLI	[IL31] (pg/ml)	pVAS	CADLI	[IL31] (pg/ml)	pVAS	CADLI	[IL31] (pg/ml)
C 1*	macho	Fox Terrier	2 anos	5	7	54,8	8	14	62,3			a.c
C 2	femêa	Braco Alemão	1 ano	3	12	57,9	4	2	49,2	6	7	96,5
C 3	femêa	Weimaraner	4 anos	3,5	6	554,7	3	2	312,1	5	11	561,8
I 1	macho	SRD	11 meses	6	9	116	1	1	130,4	0	0	89,2
I 2	femêa	SRD	2 anos	7	12	57,8	2	0	124,3	5,5	3	84,5
I 3	femêa	SRD	6 anos	3	3	52,5	4	3	49,9	2	0	69,9
I 4	femêa	SRD	1 ano	7	0	102,6	2	2	63,0	2	0	403,5
I 5*	macho	Fox Terrier	2 anos	8	14	62,3	2	5	137,1			a.c
I 6	femêa	Pug	1 ano	10	9	60,7	10	7	61,6			a.c
I 7	femêa	SRD	2 anos	7	1	39,9	7	0	89,1			a.c

*mesmo indivíduo. C – controlo. I – indivíduo/caso de estudo. [IL-31] – concentração de interleucina 31. a.c – ausência de colheita. SRD – sem raça definida. – soro hemolisado.

3.5. Evolução das avaliações pVAS e CADLI com a concentração de IL-31 ao longo do tempo

A figura 20 representa a evolução do quadro clínico e dos níveis da interleucina 31 ao longo de dois tempos (T0 e T1) do controlo 1.

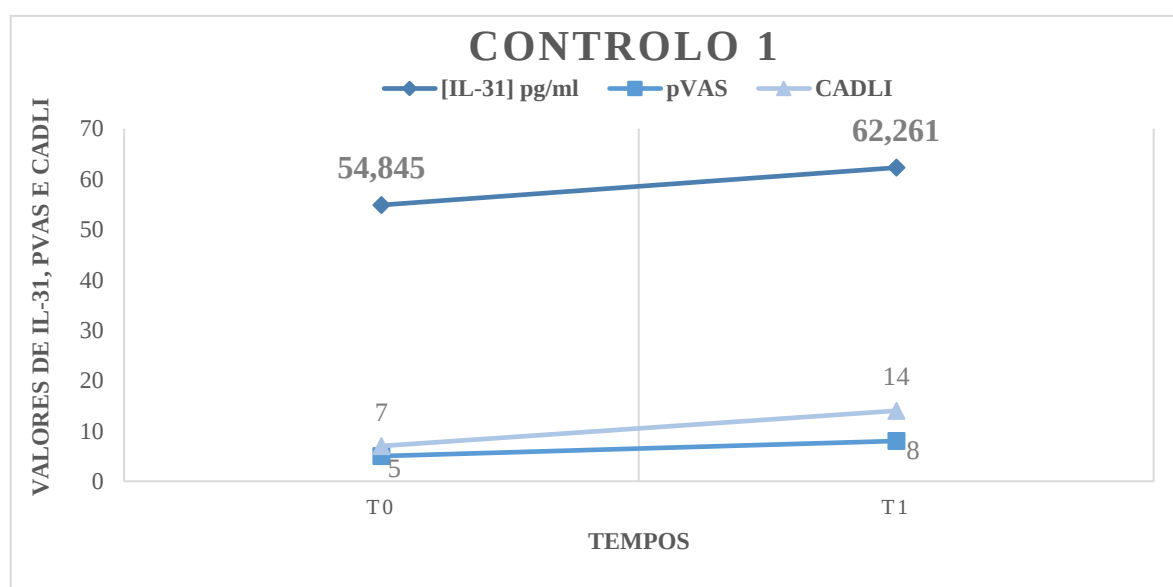


Figura 20. Evolução do caso controlo 1 (C1).

Na figura 21 está representada a evolução do controlo 2, em três tempos (T0, T1 e T2).

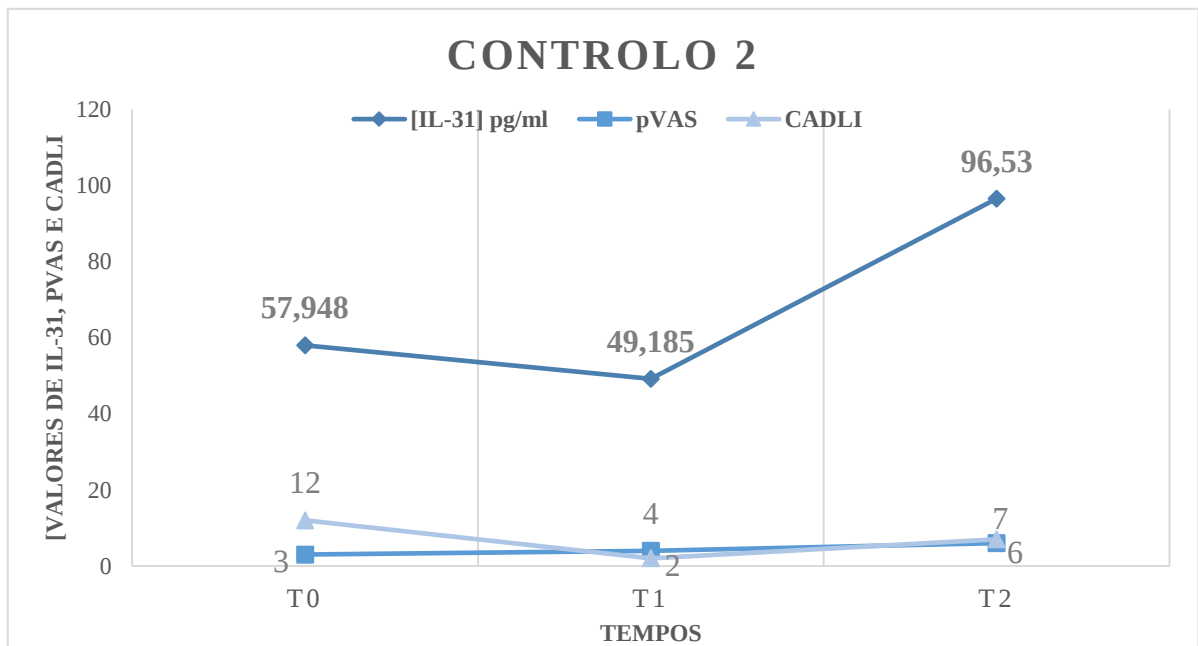


Figura 21. Evolução do caso controlo 2 (C2).

A figura 22 representa, ao longo dos três tempos (T0, T1 e T2), a evolução do caso clínico número 1.

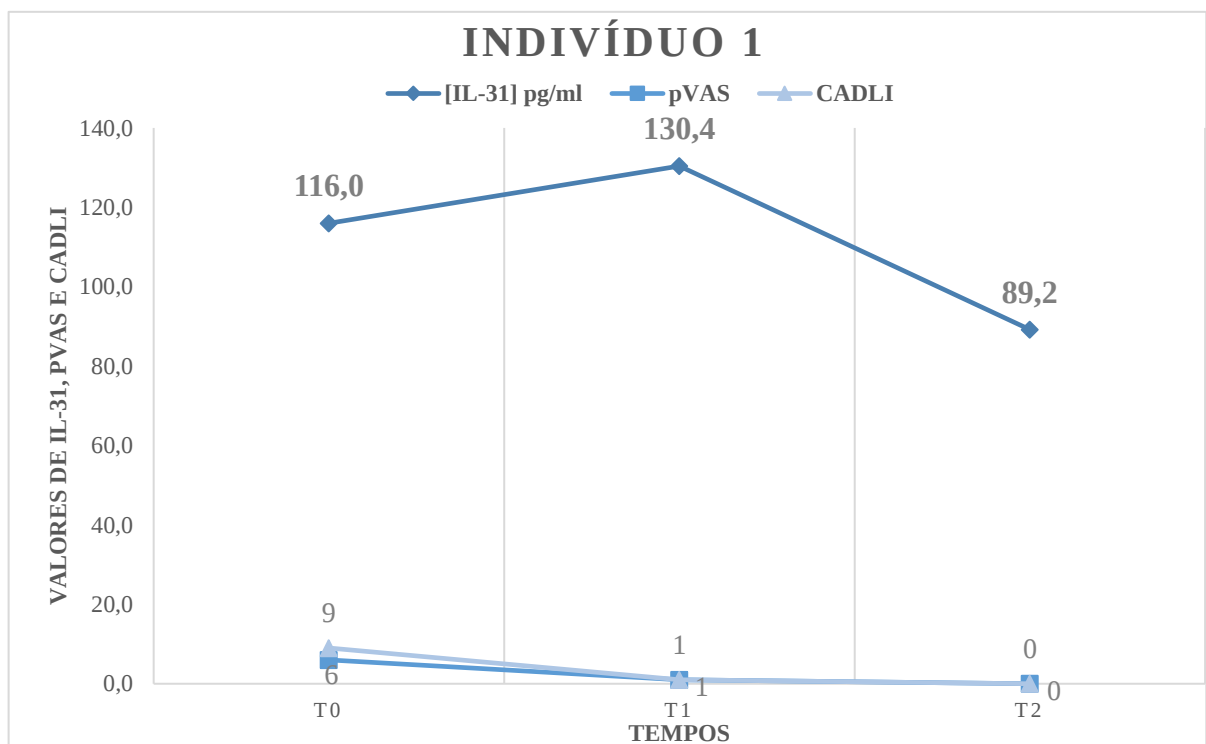


Figura 22. Evolução do caso de estudo 1 (I1).

Na figura 23 está representado o desenvolvimento do caso clínico 2, ao longo dos três tempos (T0, T1 e T2).

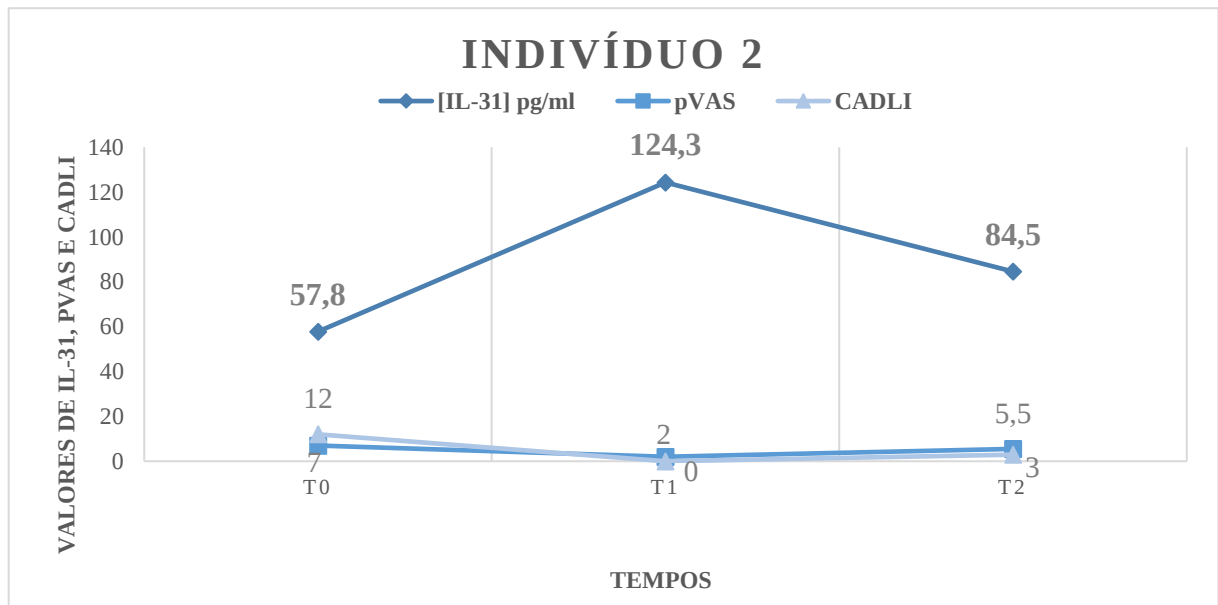


Figura 23. Evolução do caso de estudo 2 (I2).

A figura 24 representa, ao longo dos três tempos (T0, T1 e T2), a evolução do caso 3.

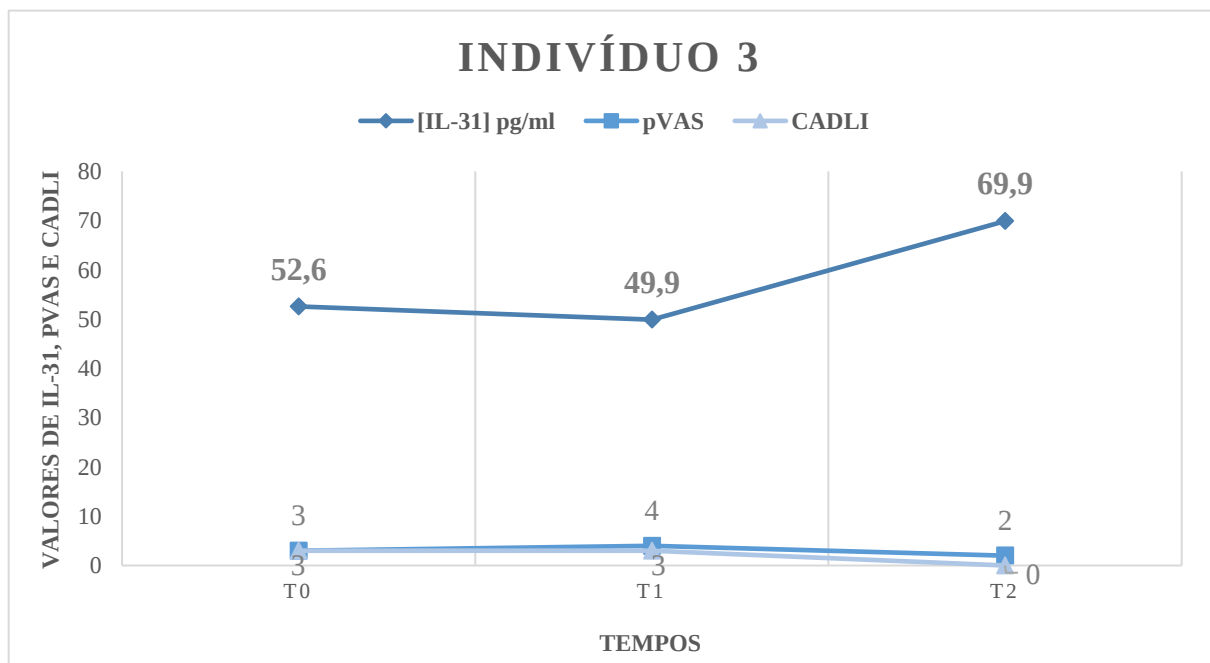


Figura 24. Evolução do caso de estudo 3 (I3).

Na figura 25 está representado o desenvolvimento do caso clínico 4, ao longo dos dois tempos (T0 e T1).

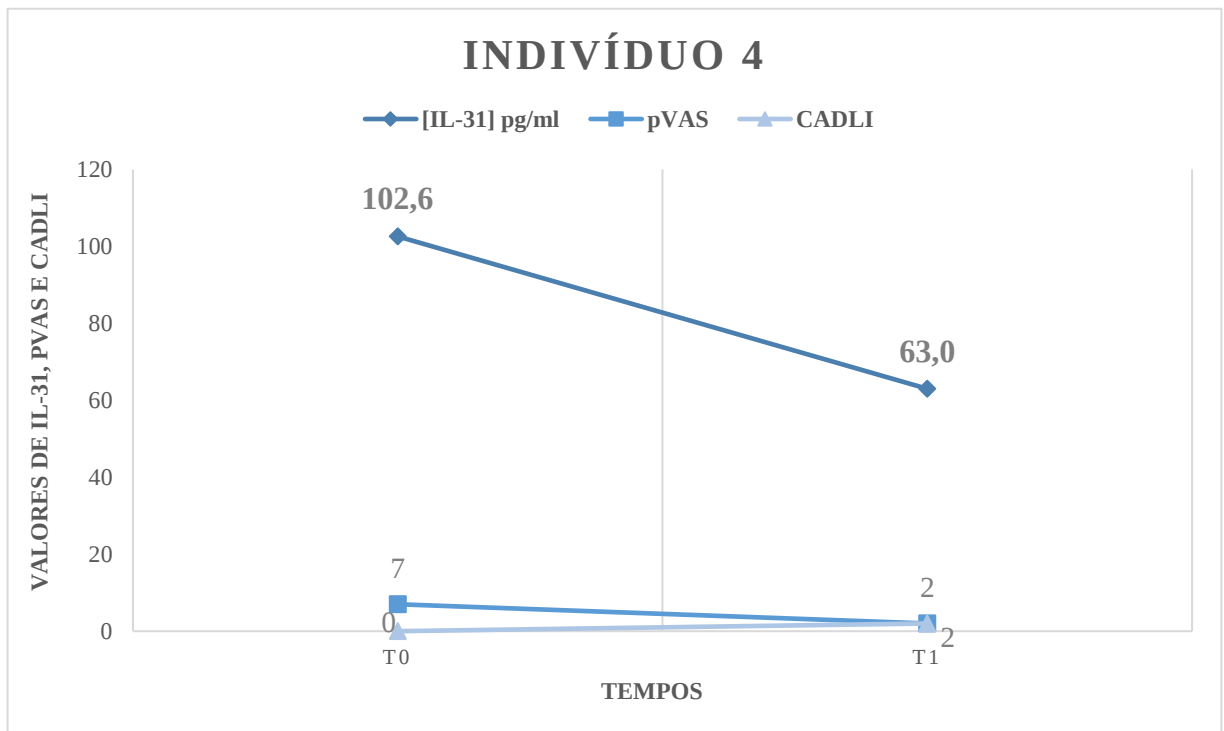


Figura 25. Evolução do caso de estudo 4 (I4).

Na figura 26 está representado o desenvolvimento do caso clínico 5, ao longo dos três tempos.

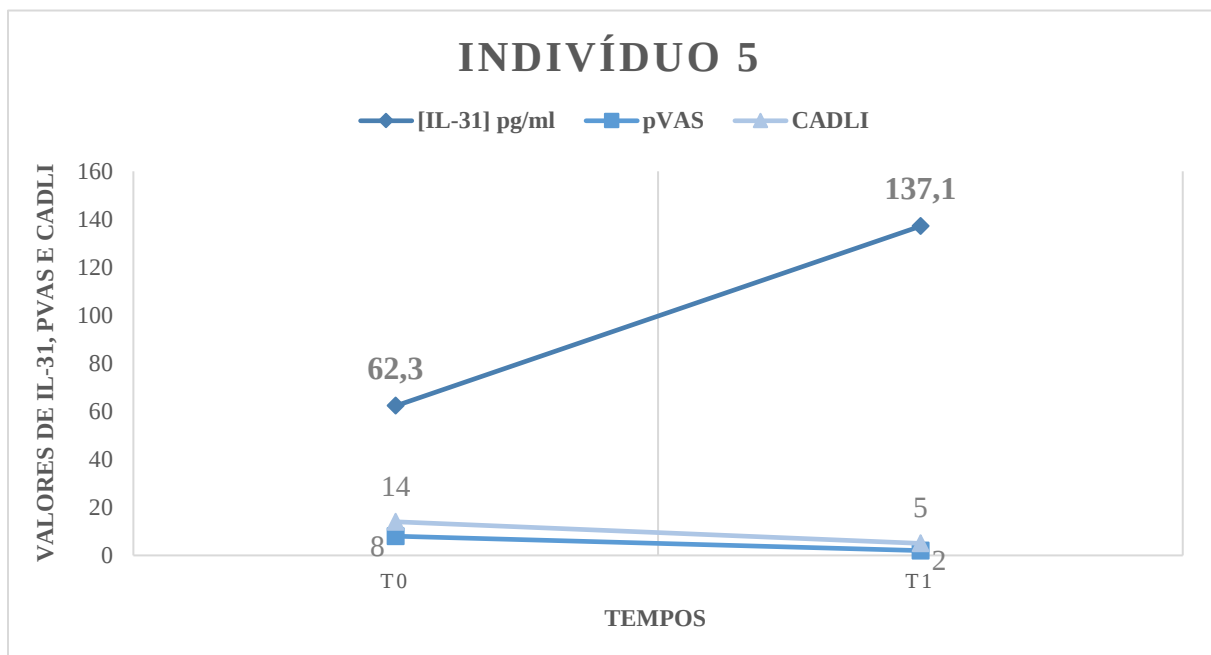


Figura 26. Evolução do caso de estudo 5 (I5).

A figura 27 representa a evolução, ao longo de dois tempos (T0 e T1), do caso clínico 6.

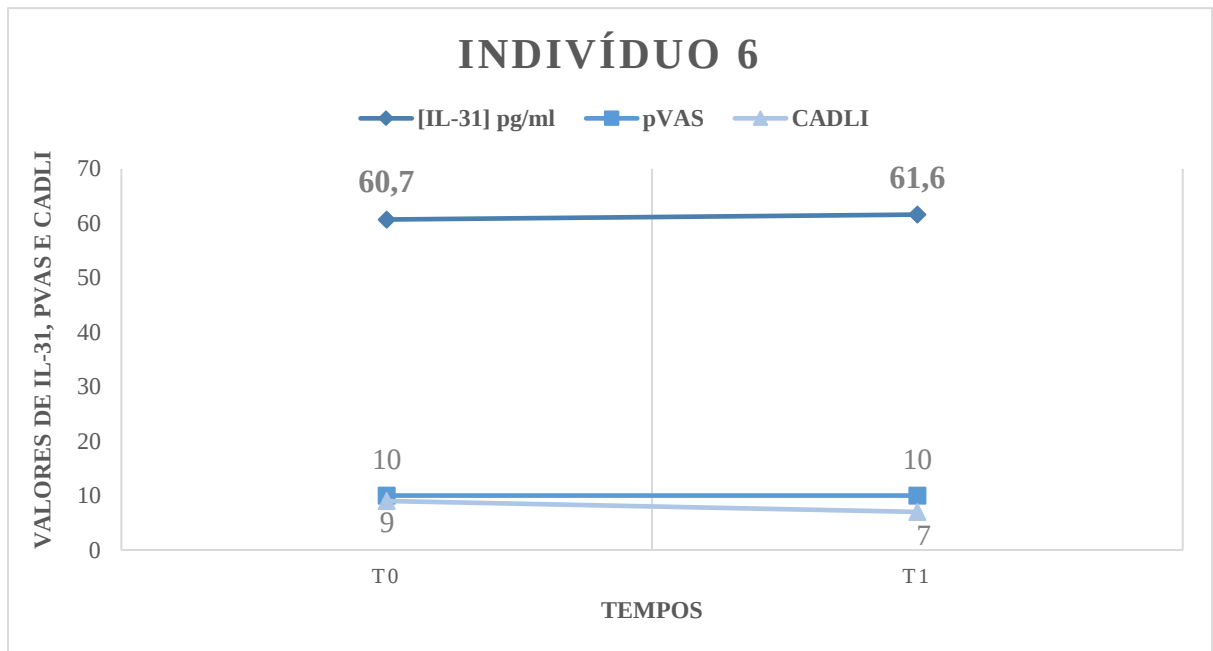


Figura 27. Evolução do caso de estudo 6 (I6).

A figura 28 representa a evolução ao longo de dois tempos (T0 e T1), do caso clínico 7.

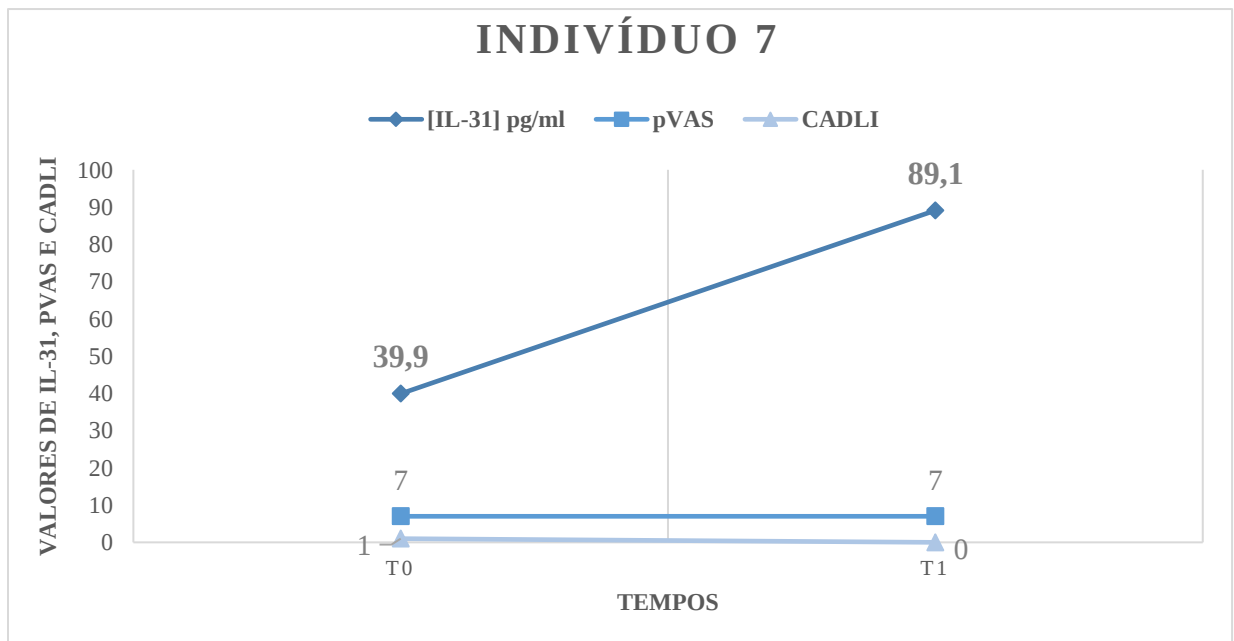


Figura 28. Evolução do caso de estudo 7 (I7).

4. DISCUSSÃO

A dermatite atópica canina é uma doença que carece, por parte do clínico e do tutor, de um diagnóstico e manejo individual minucioso, uma vez que se trata de uma doença de carácter crónico e sem cura. Perante isto, surge a constante necessidade de se desenvolverem tratamentos efizazes e seguros para estes doentes. Surge, então, o lokivetmab (Cytoint[®]), um anticorpo monoclonal canino capaz de bloquear a ação da IL-31, uma interleucina importante no desencadeamento do prurido (Gonzales *et al.*, 2013; Moyaert *et al.*, 2017). De acordo com Michels *et al.* (2016) e Moyaert *et al.* (2017), este tratamento focalizado para esta vertente da DAC é eficaz e seguro. No entanto, sabe-se que nem todos os casos são responsivos. De acordo com os mesmos autores, tal facto poderá dever-se às seguintes hipóteses: i) complexidade e componente multifatorial da doença; ii) diferentes mecanismos que a IL-31 possui aquando da ligação ao seu recetor e iii) possível ação preferencial, em certos casos, de outras interleucinas, além da IL-31, no desenvolvimento do prurido (Olivry *et al.*, 2015b).

No presente estudo, os valores de IL-31 obtidos ao longo do tratamento com lokivetmab mostraram alguma relação com a resposta ao tratamento, quando analisados os valores de média e mediana, como se pode constatar pelas tabelas 9, 10 e 11. Ainda assim, houve alguma variação entre os valores demonstrados para cada animal. Tal pode ficar a dever-se a vários fatores que serão abordados de seguida. Porque não se obtiveram valores tendenciais, apenas foi possível fazer uma análise descritiva dos resultados.

Alguns dos casos de estudo do presente trabalho não corroboram estudos recentes que demonstraram haver uma correlação positiva entre os níveis de IL-31 e fatores como a gravidade da doença; ou seja, aumentos dos níveis séricos de IL-31 estão associados a maiores graus de prurido e consequentes lesões (Marsella *et al.*, 2018). No entanto, é de salientar que estes autores usaram, apenas, cães da raça Beagle de uma colónia de cães com dermatite atópica, experimentalmente sensibilizados a ácaros do pó. No presente estudo, os animais eram de diferentes raças, provinham de regiões geográficas distintas e a exposição a antigénios não foi controlada, o que pode ter estado na origem das variações de concentração de interleucina 31. Este facto pode ser apoiado pelos resultados apresentados nas tabelas 9 (no que respeita aos indivíduos) e 12 e figuras 22, 23, 25 e 27.

Quando se faz uma análise focada nos indivíduos, verifica-se, de uma forma geral, que o grau de lesões e prurido diminui após a primeira administração de lokivetmab, como consta nas

figuras 21, 22, 24 e 25. No entanto, em alguns casos, ao contrário de uma redução da concentração de IL-31, relativamente ao valor de T0, observou-se, em T1, um aumento que não parece acompanhar o quadro clínico observado (figuras 21, 22, 25 e 27). Estes resultados podem dever-se ao momento em que foram realizadas as recolhas sanguíneas. No presente estudo, as recolhas foram realizadas às quatro semanas após a administração do lokivetmab. Este anticorpo tem um efeito terapêutico aproximadamente desse mesmo tempo, significando que, nesse momento, em teoria, a IL-31 deixando de ter a influência deste anticorpo, voltasse a aumentar os seus níveis em circulação, e assim, o animal já estivesse a passar por um agravamento do prurido e/ou um aumento de IL-31 (o que não se pode verificar que acontece neste estudo em termos IL-31) (Zoetis, 2018). Além disto, a variabilidade destes valores pode estar na origem de outros fatores, como a reduzida dimensão da população estudada, principalmente dos controlos, e a hemólise das amostras, entre outros, discutidos mais tarde.

O facto do indivíduo 4 (tabela 9) apresentar valores de interleucina muito elevados no momento T2, quando comparados com os valores anteriores, poderá dever-se ao momento da recolha da amostra que foi realizada mais tarde do que estava estipulado no estudo. Outras eventuais hipóteses que justificariam esta situação são: i) o doente poderia já estar a sofrer uma recaída; ii) pode ter ocorrido um erro de classificação da CADLI ou, mesmo, da pVAS ou iii) um erro laboratorial. Deste modo, este indivíduo não foi integrado na estatística.

É de salientar que, no presente estudo, foi possível observar as não respostas ao tratamento, pelo facto de o quadro clínico permanecer idêntico com concentrações de IL-31 a aumentarem ou permanecerem iguais ao longo do tempo, aquando da segunda recolha de sangue, como se pode verificar pelas figuras 26 e 27. Na figura 25, no entanto, pode observar-se que o indivíduo aumenta consideravelmente a concentração de IL-31, mas apresenta uma aparente melhoria do quadro clínico. Por estes motivos, são casos com apenas dois tempos (T0 e T1), pois as administrações foram suspensas. Podem existir, por vezes, certos casos em que uma melhoria significativa só é perceptível após o segundo tratamento; no entanto, por se tratar de um fármaco dispendioso e/ou existir outra terapêutica mais adequada para este tipo de casos, opta-se por não dar continuação à terapêutica (Chaigne & Watier, 2015), o que sucedeu com estes três animais.

Analisando os controlos, pode afirmar-se que, de um modo geral, embora sejam em número muito reduzido, e se tenha optado por remover o controlo 3 da análise descritiva por possuir valores muito discrepantes dos restantes controlos, são amostras com um comportamento

expectável, em que se observa um aumento de concentração de IL-31 à medida que o quadro clínico piora (figuras 19 e 20).

De um modo geral, a partir dos resultados obtidos, pode afirmar-se que houve uma resposta positiva, na medida em que os controlos obtiveram valores médios de IL-31 ao longo dos tempos, estáveis ou crescentes (tabela 9 e figuras 19 e 20); os casos de estudo, apesar da média ter aumentado em T1 relativamente a T0, foi possível observar que, no fim do estudo, esta volta a diminuir voltando a acompanhar o quadro clínico. Esta oscilação pode ter na base o facto de alguns animais não responderem de forma muito positiva ao primeiro tratamento mas, uma vez que neste estudo o quadro clínico se altera no sentido satisfatório, este aumento de IL-31 ao T1 pode estar relacionado com outro tipo de limitação, como a altura da recolha sanguínea, a qualidade da amostra ou erro laboratorial (tabela 9). O mesmo se pode afirmar em relação ao quadro clínico onde, houve um aumento de prurido no grupo dos controlos e uma redução no grupo de estudo (tabela 10), facto que pode dever-se ao controlo do prurido que estava a ser realizado, fazendo com que as lesões melhorassem ao longo do tempo. O mesmo se verificou em relação às lesões, embora fosse de esperar um agravamento, observou-se uma redução no grupo de controlo (tabela 11), relativamente à mediana. No entanto, sabendo que a escala varia de 0 a 50, tratam-se de valores de CADLI muito reduzidos. Isto porque, todos os casos incluídos no estudo são casos menos graves de DAC.

No presente trabalho, a população em estudo foi muito reduzida. Houve, também, uma discrepância na dimensão dos grupos estudados, sendo que o grupo controlo constituía, apenas, 30% da população total (figura 15). Assim, são limitadas as conclusões relativamente à comparação entre valores de IL-31 em ambos os grupos. A reduzida dimensão da população estudada, condiciona os resultados obtidos e limita qualquer inferência que se possa realizar.

De acordo com Gonzales *et al.* (2013) são detetáveis níveis de IL-31 na maioria dos cães com dermatite atópica. O presente estudo apoia esta observação, pois foi possível quantificar a IL-31 em todos os casos apresentados. A discrepância entre os valores obtidos pode dever-se às diferenças entre as populações (diferentes raças, idades, exposição não controlada aos alérgenos, etc). Isto pode, também, justificar o caso do controlo 3 apresentar valores de IL-31 muito altos em comparação com os restantes. Para efeitos de estatística não se pôde integrar este controlo pois, tendo valores muito superiores aos restantes indivíduos, faria com que os pequenos valores não fossem analisados de uma forma mais concreta. Até ao momento, não houve nenhum estudo que se debruçasse sobre os diferentes valores de IL-31 nas diferentes

raças sendo, portanto, necessários mais estudos que possam determinar diferenças nos níveis de IL-31 nas diferentes raças.

Para cada caso foi avaliado o grau de prurido (numa escala de 0 a 10) e o grau das lesões apresentadas pelos doentes a cada reavaliação (numa escala de 0 a 50). O facto de ser o próprio tutor a classificar o prurido do animal, pode constituir um viés pois é uma escala que pode tornar-se algo subjetiva para o tutor e gerar classificações que podem não ser significativas perante o quadro clínico apresentado. De acordo com Young *et al.* (2019), se se mostrar previamente à aplicação da pVAS, os valores que foram dados num momento anterior pelos tutores, aumenta a fiabilidade destes valores dados. Perante isto, numa tentativa de contornar as variações associadas ao observador seria útil administrar a escala das lesões sempre que possível pelo mesmo observador, e ainda, ensinar os tutores a descrever o prurido do seu animal (Young *et al.*, 2019). Este problema, também se pode assumir relativamente à aplicação da escala das lesões CADLI, pois a sua classificação baseia-se em imagens que podem ser subjetivas para cada observador e cada caso, uma vez que foi aplicada por dois observadores diferentes (Plant *et al.*, 2012). Os valores de CADLI obtidos variaram de 0 a 14, numa escala de 0 a 50. O facto de se terem obtido valores tão baixos pode estar relacionado com o facto de se tratarem de casos menos graves de DAC, uma vez que, nos mais graves, há uma maior tendência para se realizarem tratamentos com maior influência na inflamação. É de notar que, em alguns casos, obtiveram-se valores de CADLI em T2 baixos porque se está a controlar o prurido, não havendo tempo de ocorrência de lesões até a altura da recolha sanguínea.

Moyaert *et al.* (2017), descreveram que, na dose mínima de 1 mg/Kg de lokivetmab, era possível atingir uma eficácia adequada, com uma melhoria no prurido relativamente rápida. Em termos gerais pode-se referir que tal facto ocorreu neste estudo, uma vez que o grupo de estudo ao longo das administrações reduziu o grau de prurido em relação ao grupo de controlo (tabela 11).

Relativamente à quantificação dos níveis séricos de IL-31, a variação dos resultados obtidos pode, ainda, estar relacionada com a hemólise apresentada por algumas amostras (tabela 12). A hemólise resulta da lise celular por rompimento da membrana dos eritrócitos, e consequente libertação do seu conteúdo, nomeadamente a hemoglobina. Esta pode ocorrer, devido a um manuseamento inadequado da amostra ou a um método de recolha traumático. Uma vez que a técnica de ELISA depende de uma análise espectrofotométrica, a hemólise das amostras pode interferir com a leitura da absorvância e, consequentemente, com o valor da concentração de IL-

31 determinado. Outra limitação poderá estar relacionada com o processamento, armazenamento e manuseamento das amostras, uma vez que a colheita não foi realizada pelo mesmo indivíduo e algumas amostras podem ter sofrido oscilações de temperatura quando transportadas para o laboratório.

O kit de ELISA utilizado para a quantificação da IL-31 possui uma sensibilidade de 1,0 pg/ml. Neste estudo obtiveram-se concentrações de IL-31 entre 39,9 pg/ml e 561,8 pg/ml. Em estudos anteriores, Gonzales *et al.* (2013) obtiveram valores que variaram entre 13 pg/ml e 1000 pg/ml e Marsella *et al.* (2018) entre 8 pg/ml e 121 pg/ml. Ambos os estudos foram realizados com colônias de Beagles com dermatite atópica, ao contrário do presente trabalho.

Apesar do reduzido número de animais em estudo e das limitações já referidas, globalmente, os animais incluídos no estudo responderam ao tratamento aplicado, apresentando uma melhoria no prurido.

Até ao momento, são escassos os estudos que correlacionam os níveis séricos de IL-31 com o prurido, as consequentes lesões e a resposta à terapêutica com o lokivetmab (Cytoint[®]) em cães com DAC. Nesse sentido, o presente trabalho foi pioneiro, ao fazê-lo por um período de três meses. Pretendeu-se, assim, contribuir para o avanço do conhecimento nesta área e permitir o despoletar de estudos futuros conducentes a uma melhor clarificação da relação existente entre os níveis de prurido e a concentração serológica de IL-31 e, assim, otimizar o uso deste fármaco com grande potencial.

5. CONCLUSÃO

Com o presente trabalho pretendeu-se quantificar os níveis séricos de IL-31 em cães com dermatite atópica e avaliar a sua variação com a administração de lokivetmab e a condição clínica dos animais. Apesar das limitações que o estudo enfrentou, revelou-se uma investigação útil na medida em que foi possível observar que, de uma forma geral, cães com dermatite atópica submetidos a este tipo de terapêutica, quando responsivos, obtêm resultados satisfatórios face ao quadro clínico que apresentam (cerca de 71% de respostas positivas neste estudo à primeira injeção). Ainda, foi possível quantificar os níveis séricos de IL-31 e observar que, apesar da variabilidade dos resultados obtidos, esses oscilam de um modo proporcional à gravidade do quadro clínico apresentado pelos animais em estudo.

Em estudos futuros, seria pertinente que, não só se restringisse a população em estudo a apenas uma raça ou a um número reduzido de raças, como se obtivesse uma amostra mais representativa. Outra questão importante a considerar, prende-se com o momento de recolha da amostra sanguínea. Determinar os valores de IL-31 ao longo das quatro semanas de tratamento poderia espelhar melhor a oscilação desta interleucina em resposta ao tratamento com lokivetmab.

Sendo a dermatite atópica canina uma patologia complexa, de elevada incidência e causa de grande incómodo para o animal e o seu tutor, é importante uma maior aposta na investigação da doença.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahn, J. S., krisnadas, D. K., & Agrawal, B. (2007). Dendritic cells partially abrogate the regulatory activity of CD4⁺ CD25⁺ T cells present in the human peripheral blood. *International Immunology*, 19(3): 227-237.
- Anturaniemi, J., Uusitalo, L., & Hielm-Bjorkman, A. (2017). Environmental and phenotype-related risk factors for owner-reported allergic/atopic skin symptoms and for canine atopic dermatitis verified by veterinarian in a Finnish dog population. *PLOS ONE*, 12(6): 1-17.
- Bando, T., Morikawa, Y., & Senba, E. (2006). Complete Overlap of Interleukin-31 Receptor A and Oncostatin M Receptor B in the Adult Dorsal Root Ganglia with Distinct Developmental Expression Patterns. *Neuroscience*, 142(4): 1263-1271.
- Barnes, K. C. (2010). An update on the genetics of atopic dermatitis: Scratching the surface in 2009. *J Allergy Clinic Immunology*, 125(1): 16 - 29.
- Bauer, C. L., Hensel, P., Austel, M., & Keys, D. (2010). Determination of irritant threshold concentrations to weeds, trees and grasses through serial dilutions in intradermal testing on healthy clinically nonallergic dogs. *Veterinary Dermatology*, 21(2): 192-197.
- Baumer, W., Stahl, J., Sander, K., Petersen, L. J., Paps, J., Stark, H., & *et al.* (2011). Lack of preventing effect of systemically and topically administered histamine H1 or H4 receptor antagonists in a dog model of acute atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, 20(7): 577-581.
- Beco, L., Guaguère, E., Méndez, C. L., Noli, C., Nuttall, T., & Vroom, M. (2013). Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections (1): diagnosis based on clinical presentation, cytology and culture. *Veterinary Record*, 172(3): 72-78.
- Bensignor, E., Marignac, G., Crosaz, O., & Cavana, P. (2013a). Pruritus in dogs. *Veterinary Dermatology*, 24(2): 292-294.
- Bensignor, E., Pin, D., & Bourdeau, P. (2013b). Évaluation d'un protocole alternant shampooing et mousse dans les dermatites allergiques canines: essai multicentrique

- randomisé, contrôlé en simple insu. *Pratique médicale et chirurgicale de l'animal de compagnie*, 48(2): 49-55.
- Bethlehem, S., Bexley, J., & Mueller, R. S. (2012). Patch testing and allergen-specific serum IgE and IgG antibodies in the diagnosis of canine adverse food reactions. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 145(3-4): 582-589.
- Bizikova, P., Papich, M. G., & Olivry, T. (2008). Hydroxyzine and cetirizine pharmacokinetics and pharmacodynamics after oral and intravenous administration of hydroxyzine to healthy dogs. *Dermatology Forum in Veterinary Dermatology 2008*, 19(106): 348-357.
- Bizikova, P., Pucheu-Haston, C. M., Eisenschenk, M. N., Marsella, R., Nuttall, T., & Santoro, D. (2015a). Review: Role of genetics and the environment in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 26(2): 95.
- Bizikova, P., Santoro, D., Marsella, R., Nuttall, T., Eisenschenk, M. N., & Pucheu-Haston, C. M. (2015b). Review: Clinical and Histological manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 26(2): 79.
- Blaskovic, M., Rosenkrantz, W., Neuber, A., Sauter-Louis, C., & Mueller, R. S. (2014). The effect of a spot-on formulation containing polyunsaturated fatty acids and essential oils on dogs with atopic dermatitis. *The Veterinary Journal*, 199(1): 39 - 43.
- Bond, R. (2014). The role of fungal agents in atopic dermatitis. Em C. Noli, A. Foster, & W. Rosenkratz, *Veterinary Allergy* (pp. 58 - 64). Missouri: Wiley Blackwell.
- Bond, R., Curtis, C. F., Hendricks, A., Ferguson, E. A., & Lloyd, D. H. (2002). Intradermal test reactivity to malassezia pachydermatis in atopic dogs. *Short Communications*, 150(14): 448 - 449.
- Bonkobara, M., Miyake, F., Yagihara, H., Yamada, o., Azakami, D., Washizu, T., & *et al.* (2005). Canine Epidermal Langerhans Cells Express anfa and gama but not beta chains of high-affinity IgE receptor. *Veterinary Research Communications*, 29(6): 499-505.
- Bourdeau, P., Bruet, V., & Gremillet, C. (2007). Evaluation of phytosphingosine-containing shampoo and microemulsion spray in the clinical control of allergic dermatoses in dogs: preliminary results of a multicentre study. *Veterinary Dermatology*, 18(3): 177-178.

- Brandt, E. B., & Sivaprasad, U. (2011). Th2 Cytokines and Atopic Dermatitis. *J Clin Cell Immunology*, 2(3): 110.
- Brazís, P., Queralt, M., Mora, F., Ferrer, L., & Puigdemont, A. (1998). Comparative study of histamine release from skin mast cells dispersed from atopic, ascaris-sensitive and healthy dogs. *Veterinary immunology and immunopathology*, 66(1): 43-51.
- Cadot, P., Hensel, P., Bensignor, E., Hadjaje, C., Marignac, G., Beco, L., & *et al.* (2011). Masitinib decreases signs of canine atopic dermatitis: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled phase3trial. *Veterinary Dermatology*, 22(6): 554-564.
- Carlotti, D. N., Remy, I., & Prost, C. (1990). Food Allergy In Dogs And Cats. A Review and Report of 43 Cases. *Veterinary Dermatology*, 1(2): 55-62.
- Chaigne, B., & Watier, H. (2015). Monoclonal antibodies in excess: A simple way to avoid immunogenicity in patients? *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(3): 814-816.
- Chervet, L., Galichet, A., McLean, I., Chen, H., Suter, M. M., Roosje, P. J., & *et al.* (2010). Missing C-terminal filaggrin expresion, NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Experimental Dermatology*, 19(8): 343 .
- Cosgrove, S. B., Cleaver, D. M., King, V. L., Gilmer, A. R., Daniels, A. E., Wren, J. A., & *et al.* (2015). Long-term compassionate use of oclacitinib in dogs with atopic and allergic skin disease: safety, efficacy and quality of life. *Veterinary Dermatology*, 26(3): 171-179.
- Cosgrove, S. B., Wren, J. A., Cleaver, D. M., Martin, D. D., Walsh, K. F., Harfst, J. A., & *et al.* (2013a). Efficacy and safety of oclacitinib for the control of pruritus and associated skin lesions in dogs with canine allergic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 24(5): 479.
- Cosgrove, S. B., Wren, J. A., Cleaver, D. M., Walsh, K. F., Follis, S. I., King, V. I., & *et al.* (2013b). 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*, 24(6): 58.

- Day, M. J., & Schultz, R. D. (2014). 12: Hypersensitivity Mechanisms. Em *Veterinary Immunology: Principles and practice* (2 ed., pp. 139 - 142). New York: CRC Press.
- DeBoer, D. J. (2014). Introduction: canine atopic dermatitis as an evolving, multifactorial disease. Em C. Noli , A. Foster, & W. Rosenkrantz, *Veterinary Allergy* (1 ed., pp. 5 - 6). Madison: Wiley Blackwell.
- DeBoer, D. J. (2017). The future of immunotherapy for canine atopic dermatitis: a review. *Veterinary Dermatology*, 8(1): 25.
- DeBoer, D. J., & Marsella, R. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4): 239 - 249.
- DeBoer, J. D., & Hillier, A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 81(3-4): 271-276.
- Dell, D. L., Griffin, C. E., Thompson, L. A., & Griffies, J. D. (2012). Owner assessment of therapeutic interventions for canine atopic dermatitis: a long-term retrospective analysis. *Veterinary Dermatology*, 23(3): 291.
- Dethioux, F. (2006). A dermatite atópica canina, um desafio para o clínico. *Focus*, Ed. especial: 19.
- Dillon, S. R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S., & *et al.* (2004). Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nature Immunology*, 5(7): 752-760.
- Dip, R., Carmichael, J., Letellier, I., Strehlau, G., Roberts, E., Bensignor, E., & *et al.* (2013). Concurrent short-term use of prednisolone with cyclosporine A accelerates pruritus reduction and improvement in clinical scoring in dogs with atopic dermatitis. *BMC Veterinary Dermatology*, 9(1): 173.
- Egawa, G., & Kabashima, K. (2016). Multifactorial skin barrier deficiency and atopic dermatitis: Essential topics to prevent the atopic march. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 138(2): 350 - 358.

- Eichenseer, M., Johansen, C., & Mueller, R. S. (2013). Efficacy of dimetinden and hydroxyzine/chlorpheniramine in atopic dogs: a randomised, controlled, double-blinded trial. *Veterinary Record*, 173(17): 423.
- Ezzat, M., Hasan, Z., & Shaheen, K. (2011). Serum measurement of interleukin-31 (IL-31) in paediatric atopic dermatitis: elevated levels correlate with severity scoring. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 25(3): 334-339.
- Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W., & Picco, F. (2010). Prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*, 21(1): 23-31.
- Ferreira, D. (2019). Tratamento da dermatite atópica canina. *XV Congresso Hospital Veterinário Montenegro*, (p. 2). Santa Maria da Feira.
- Foster, A. P., Littlewood, J. D., Webb, P., Wood, J. L., Rogers, K., & Shaw, S. E. (2003). Comparison of intradermal and serum testing for allergen-specific IgE using a FcεRI-α-based assay in atopic dogs in the UK. *Veterinary immunology and immunopathology*, 93(1-2): 51-60.
- Fujimura, M. (2011). The study of canine atopic dermatitis involving the isolation of dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 14(2): 273 - 277.
- Gadeyne, C., Little, P., King, V. L., Edwards, N., Davis, K., & Stegemann, M. R. (2014). 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*, 25(6): 512-e86.
- Gonzales, A. J., Bowman, J. W., Fici, G. J., Zhang, M., Mann, D. W., & Mitton-Fry, M. (2014). Oclacitinib (APOQUEL) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 37(4): 317-324.
- Gonzales, A. J., Humphrey, W. R., Messamore, J. E., Fleck, T. J., Fici, G. J., Shelly, J. A., & *et al.* (2013). Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 24(1): 48-53.

- Griffin, C. E., & DeBoer, D. J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 81(3 - 4): 255-269.
- Guillot, J., & Bond, R. (1999). *Malassezia pachydermatis*: a review. *Medical Micology*, 37(85): 295 - 306.
- Halliwell, R. (2006). Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(3-4): 114.
- Hammerberg, B., Olivry, T., & Orton, S. M. (2001). Skin mast cell histamine release following stem cell factor and high-affinity immunoglobulin E receptor cross-linking in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 12(6): 339-346.
- Hardy, J. I., Hendricks, A., Loeffler, A., Chang, Y. M., Verheyen, K. L., Garden, O. A., & *et al.* (2014). Food-specific serum IgE and IgG reactivity in dogs with and without skin disease: lack of correlation between laboratories. *Veterinary Dermatology*, 25(5): 447-470.
- Harrison, D. A. (2012). The JAK/STAT Pathway. *Cold Spring Harb Perspect Biology*, 4(3): 1 - 3.
- Harvey, N. D., Shaw, S. C., Craigon, P. J., Blott, S. C., & England, G. C. (2019). Environmental risk factors for canine atopic dermatitis: a retrospective large-scale study in Labrador and golden retrievers. *Veterinary Dermatology*, 30(5): 396.
- Hawro, T., Saluja, K., Altrichter, S., Metz, M., & Maurer, M. (2013). Interleukin-31 does not induce immediate itch in atopic dermatitis patients and healthy controls after skin challenge. *Allergy*, 69(1): 113-117.
- Hensel, P., Santoro, D., Favrot, C., Hill, P., & Griffin, C. (2015). Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Veterinary Dermatology*, 11(196): 1 - 13.
- Hill, P. B., & DeBoer, D. J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4): 169-186.

- Hill, P. B., Lo, A., Eden, C. A., Huntley, S., Morey, V., Ramsey, S., & *et al.* (2006). Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. *Veterinary Record*, 158(16): 533-539.
- Hillier, A., & DeBoer, D. J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Veterinary immunology and immunopathology*, 81(3-4): 289-304.
- Hillier, A., & Griffin, C. E. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4): 147 - 151.
- Hillier, A., Lloyd, D. H., Weese, J. S., Blondeau, J. M., Boothe, D., Breitschwerdt, E., & *et al.* (2014). Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Veterinary Dermatology*, 25(3): 163.
- Hwang, W. Y., & Foote, J. (2005). Immunogenicity of engineered antibodies. *Methods*, 36(1): 3-10.
- Iwasaki, T., & Hasegawa, A. (2006). A randomized comparative clinical trial of recombinant canine interferon- γ (KT-100) in atopic dogs using antihistamine as control. *Veterinary Dermatology*, 17(3): 195-200.
- Jackson, H. A., & Mueller, R. S. (2015). Atopic dermatitis and adverse food reactions. In H. A. Jackson, & R. Marsella, *BSAVA Manual of Canine and Feline Dermatology* (3 ed., pp. 130 - 139). Gloucester: BSAVA.
- Jaeger, K., Linek, M., Power, H. T., Bettenay, S. V., Zabel, S., Rosychuk, R. A., & *et al.* (2010). Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Veterinary Dermatology*, 21(1): 119 - 123.
- Kanemaru, K., Nakamura, Y., Totoki, K., Fukuyama, T., Shoji, M., Kaneko, H., & *et al.* (2017). Phospholipase C regulates p38 MAPK activity and skin barrier integrity. *Cell Death and Differentiation*, 24(6): 1079-1090.
- Kasutani, K., Fujii, E., Ohyama, S., Adachi, H., Hasegawa, M., Kitamura, H., & *et al.* (2014). Anti-IL-31 receptor antibody is shown to be a potential therapeutic option for treating itch and dermatitis in mice. *British Journal of Pharmacology*, 171(22): 5049-5058.

- Kennis, R. A. (2006). Food Allergies: Update of Pathogenesis, Diagnoses, and Management. *The Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice*, 36(1):175-184.
- Little, P. R., King, V. L., Davis, K. R., Cosgrove, S. B., & Stegemann, M. R. (2015). 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*, 26(1): 23-30.
- Lloyd, D. H. (2014). The role of bacterial agents in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. Em C. Noli, A. Foster, & W. Rosenkrantz, *Veterinary Allergy* (pp. 51 - 55). Missouri: Wiley Blackwel.
- Lloyd, D. H., & Patel, A. (2015). Structure and funtion of the skin. Em H. A. Jackson, & R. Marsella, *BSAVA Manual of Canine and Feline Dermatology* (3 ed., pp. 1 - 10). Gloucester: BSAVA.
- Loewenstein, C., & Mueller, R. S. (2009). A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Veterinary Dermatology*, 20(2): 84-98.
- Looringh, F. A., Hoekstra, H., Brunekreef, B., & Willemse, T. (2011). Inverse association between endotoxin exposure and canine atopic dermatitis. *The Veterinary Journal*, 190(2): 215-219.
- Lourenço, A. M., Schmidt, V., Braz, B. S., Nóbrega, D., Nunes, T., Duarte-Correia, J. H., & *et al.* (2016). Efficacy of proactive long-term maintenance therapy of canine atopic dermatitis with 0,0584% hydrocortisone aceponate spray: a double-blind placebo controlled pilot study. *Veterinary Dermatology*, 27(2): 88-92.
- Marsella, R. (2014). The aberrant immune system in atopic dermatitis. Em C. Noli, A. Foster, & W. Rosenkrantz, *Veterinary Allergy* (pp. 16 - 21). Wiley Blackwell.
- Marsella, R., Ahrens, K., & Sanford, R. (2018). 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*, 29(1): 69-e28.
- Marsella, R., Genovese, D., Gilmer, L., Ahrens, K., Gatto, H., & Navarro, C. (2013). Investigations on the Effects of a Topical Ceramides-Containing Emulsion (Allerderm Spot on) on Clinical Signs and Skin Barrier Function in Dogs with Topic Dermatitis: a

- Double-Blinded, Randomized, Controlled Study. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 11(2): 110 - 116.
- Marsella, R., Olivry, T., & Carlotti, D. N. (2011). Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 239 - 248.
- Marsella, R., Olivry, T., Nicklin, C., & Lopez, J. (2006). Pilot investigation of a model for canine atopic dermatitis: enviromental house dust mite challenge of high-IgE-producing beagles, mite hypersensitive dogs with atopic dermatitis and normal dogs. *Veterinary Dermatology*, 17(1): 24 - 35.
- Marsella, R., Samuelson, D., & Doerr, K. (2009). Transmission electron microscopy studies in experimental model of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 21(1): 81 - 88.
- Martins, A. L., Delgado, E., Neto, I., Peleteiro, M. C., Almeida, M. M., & Correia, H. D. (2011). Allergic conjunctivitis and conjunctival provocation tests in atopic dogs. *Veterinary Opbtbalmology*, 14(4): 248-256.
- McCandless, E. E., Rugg, C. A., Fici, G. J., Messamore, J. E., Aleo, M. M., & Gonzales, A. J. (2014). Allergen-induced production of IL-31 by canine Th2 cells and identification of immune, skin, and neuronal target cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 157(1-2): 42-48.
- Merck & CO., INC. (2010). Integumentary System; Atopic Dermatitis. Em D. G. Allen, P. D. Constable, P. R. Davies, K. E. Quesenberry, P. T. Reeves, J. M. Sharma, & et al, *The Merck Veterinary Manual* (10 ed., pp. 761; 776 - 777). Washington: Cynthia M. Kahn.
- Meury, S., Molitor, V., Doherr, M. G., Roosje, P., Leeb, T., Hobi, S., & et al. (2011). Role of the environment in the development of canine atopic dermatitis in Labrador and Golden retrievers. *Veterinary Dermatology*, 22(4): 327-334.
- Michels, G. M., Ramsey, D. S., Walsh, K. F., Martinon, O. M., Mahabir, S. P., Hoevers, J. D., & et al. (2016). 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*, 27(6): 478.

- Miller, W. H., Griffin, C. E., Campbell, K. L., Muller, G., & Kirk, R. (2013). Structure and Function of the Skin; Atopic Disease. Em *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology* (7 ed., pp. 1, 9, 365 - 388;). St. Louis: Elsevier.
- Moyaert, H., Brussel, L. V., Borowski, S., Escalada, M., Mahabir, S. P., Walters, R. R., & *et al.* (2017). A blinded, randomized clinical trial evaluation the efficacy and safety of lokivetmab compared to ciclosporin in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 28(6): 593.
- Mueller, R. S., Olivry, T., & Prélaud, P. (2016). Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (2): common food allergen sources in dogs and cats. *BMC Veterinary Research*, 12(9): 2 - 6.
- Mutius, E. v. (2007). Allergies, infections and the hygiene hypothesis - The epidemiological evidence. *Immunobiology*, 212(6): 433-439.
- Navarro, C., Crastes, N., Benizeau, E., & McGahie, D. (2015). Voluntary acceptance and consumption of two oral ciclosporin formulations in dogs: two randomised, controlled studies. *Irish Veterinary Journal*, 68(1): 3.
- Nishifugi, K. (2014). Skin barrier and its role in the pathophysiology of atopic dermatitis. Em C. Noli, A. Foster, & W. Rosenkratz, *Veterinary Allergy* (pp. 42 - 50). Chichester: WileyBlackwell.
- Nodtvedt, A., Bergvall, K., Emanuelson, U., & Egenvall, A. (2006). Canine atopic dermatitis: validation of recorded diagnosis against practice records in 335 insured Swedish dogs. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 48(1): 8.
- Nuttall, T. (2013). The genomics revolution: will canine atopic dermatitis be predictable and preventable? *Veterinary Dermatology*, 24(1): 10.
- Nuttall, T. (2014). The genetics of canine atopic dermatitis. Em C. Noli, A. Foster, W. Rosenkrantz, & C. Noli (Ed.), *Veterinary Allergy* (1 ed., p. 32). Madison: Wiley Blackwell.
- Oldenhoff, W. E., Frank, G. R., & DeBoer, D. J. (2014). Comparison of the results of intradermal test reactivity and serum allergen-specific IgE measurement for *Malassezia pachydermatis* in atopic dogs. *Veterinary Dermatology*, 25(6): 507.

- Olivry, T., & Bizikova, P. (2013). A systematic review of randomized controlled trials for prevention or treatment of atopic dermatitis in dogs: 2008–2011 update. *Veterinary Dermatology*, 24(1): 97.
- Olivry, T. (2011). Is the skin barrier abnormal in dogs with atopic dermatitis? *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(1-2): 11 - 16.
- Olivry, T. (2019a). Could we use the erythema grading of the CADESI4 as a simple instrument for future short-duration clinical trials of dogs with atopic dermatitis? *Veterinary Dermatology*, 30(1): 80-81.
- Olivry, T. (2019b). Comparative Aspects of itch in companion animals and humans: part I - pathogenesis. *31st European Veterinary Dermatology Congress (ESVD-ECVD)*, (p. 31). Liverpool.
- Olivry, T., & Banovic, F. (2019). Treatment of canine atopic dermatitis: time to revise our strategy? *Veterinary Dermatology*, 30(2): 87-90.
- Olivry, T., & Hill, P. B. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVIII): histopathology of skin lesions. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4): 305-309.
- Olivry, T., Bensignor, E., Favrot, C., Griffin, C. E., Hill, P. B., Mueller, R. S., & *et al.* (2018). Development of a core outcome set for therapeutic clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis (COSCAD'18). *BMC Veterinary Research*, 14(1): 238.
- Olivry, T., DeBoer, D. J., Favrot, C., Jackson, H. A., Mueller, R. S., Nuttall, T., & *et al.* (2010a). Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 21(3): 233-248.
- Olivry, T., DeBoer, D. J., Favrot, C., Jackson, H. A., Mueller, R. S., Nuttall, T., & *et al.* (2015b). Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Disease of Animals (ICADA). *BMC Veterinary Research*, 11(210): 1-15 .
- Olivry, T., DeBoer, D. J., Prélud, P., & Bensignor, E. (2007a). International Task Force on canine atopic dermatitis: Food for thought: pondering the relationship between canine

- atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. *Veterinary Dermatology*, 18(6): 390 - 391.
- Olivry, T., Foster, A. P., Mueller, R. S., McEwan, N. A., Chesney, C., & Williams, H. C. (2010b). Interventions for atopic dermatitis in dogs: a systematic review of randomized controlled trials. *Veterinary Dermatology*, 21(1): 4-22.
- Olivry, T., Marsella, R., Iwasaki, T., & Mueller, R. (2007b). Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Journal compilation © 2007 ESVD and ACVD.*, 18(2): 78-86.
- Olivry, T., Moore, P. F., & Affolter, V. K. (1996). Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Archives of dermatological research*, 288(10): 579-585.
- Olivry, T., Mueller, R. S., & ICADA. (2003). Blackwell Publishing Ltd. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of the pharmacotherapy of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 14(3): 121 - 146.
- Olivry, T., Mueller, R. S., & Prélaud, P. (2015a). Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (1): duration of elimination diets. *BMC Veterinary Dermatology*, 11(225): 1-3.
- Olivry, T., Saridomichelakis, M., & ICADA. (2013). Evidence-based guidelines for anti-allergic drug withdrawal times before allergen-specific intradermal and IgE serological tests in dogs. *Veterinary Dermatology*, 24(2): 225.
- Olivry, T., Saridomichelakis, M., Nuttall, T., Bensignor, E., Griffin, C. E., Hill, P. B., & *et al.* (2014). 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*, 25(2): 77.
- Ong, P. Y., & Leung, D. Y. (2006). Immune Dysregulation in Atopic Dermatitis. *Allergy Asthma Proceedings*, 27(6): 384-389.
- Paterson, S. (2008). Introduction - structure and function; Allergic skin disease. In *Manual of Skin Diseases of the Dog and Cat* (2 ed., pp. 1 - 8; 174 - 177). Chichester: Blackwell.

- Piekutowska, A., Pin, D., Rème, C. A., Gatto, H., & Haftek, M. (2008). Effects of a Topically Applied Preparation of Epidermal Lipids on the Stratum Corneum Barrier of Atopic Dogs. *J. Comp. Path*, 138(4): 197 - 203.
- Plant, J. D., Gortel, K., Kovalik, M., Polissar, N. L., & Neradilek, M. B. (2012). Development and validation of the Canine Atopic Dermatitis Lesion Index, a scale for the rapid scoring of lesion severity in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 23(6): 515 - 521.
- Popa, I., Osta, B., Pin, D., Gatto, H., Haftek, M., & Portoukalian, J. (2012). The lipid alterations in the stratum corneum of dogs with atopic dermatitis are alleviated by topical application of a sphingolipid-containing emulsion. *Clinical and Experimental Dermatology*, 37(6): 665-671.
- Popa, I., Pin, D., Remoué, N., Osta, B., Callejon, S., Videmont, E., & *et al.* (2011). Analysis of epidermal lipids in normal and atopic dogs, before and after administration of an oral omega-6/omega-3 fatty acid feed supplement. A pilot study. *Veterinary research communications*, 35(8): 501 - 209.
- Prélaud, P. (2014). Allergens and environmental influence. Em C. Noli, A. Foster, & W. Rosenkrantz, *Veterinary Allergy* (pp. 24 -30). Madison: Wiley Blackwell.
- Pucheu-Haston, C. M., Eisenschenk, M. N., Bizikova, P., Marsella, R., Nuttal, T., & Santoro, D. (2015). Introduction to the review articles by ICADA on the pathogenesis of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*, 26(2): 77-78.
- Ricci, R., Vascellari, M., Boscarato, M., Palagiano, C., Andrighetto, I., Diez, M., & *et al.* (2013). Identification of undeclared sources of animal origin in canine dry foods used in dietary elimination trials. *Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97(1): 32-38.
- Roque, J. B., O'Leary, C. A., Duffy, D. L., Tanner, M. K., Gharahkhani, P., Vogelnest, L., & *et al.* (2012). Atopic dermatitis in West Highland terriers is associated with a 1.3-Mb region on CFA 17. *Immunogenetics*, 64(3): 209 - 217.
- Roudebush, P. (2013). Ingredients and foods associated with adverse reactions in dogs and cats. *Veterinary Dermatology*, 24(2): 292-294.

- Rybnicek, J., Lau-Gillard, P. J., Harvey, R., & Hill, P. B. (2008). Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Journal compilation 2008 ESVD and ACVD.*, 20(2): 115-122.
- Salzmann, C. A., Olivry, T. J., Nielsen, D. M., Paps, J. S., Harris, T. L., & Olby, N. J. (2011). Genome-wide linkage study of atopic dermatitis in West Highland White Terriers. *BMC genetics*, 12(1): 37.
- Santoro, D., Marsella, R., Pucheu-Haston, C. M., Eisenschenk, M. N., Nuttal, T., & Bizikova, P. (2015). Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host-micro-organism interaction. *Veterinary Dermatology*, 26(2): 84.
- Schindler, C., & Plumlee, C. (2008). Inteferons pen the Jak-Stat pathway. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19(4): 311-318.
- Shaw, S. C., Wood, J. L., Freeman, J., Littleman, J. D., & Hannant, D. (2004). Estimation of heritability of atopic dermatitis in Labrador and Golden Retrievers. *AJVR*, 65(7): 1014 - 1020.
- Shimada, K., Yoon, J.-S., Yoshihara, T., Iwasaki, T., & Nishifugi, K. (2009). Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 20(5-6): 541 - 546.
- Shimada, K., Yoshihara, T., Yamamoto, M., Konno, K., Momoi, Y., Nishifuji, K., & *et al.* (2008). Transepidermal Water Loss (TEWL) Reflects Skin Barrier Function of Dogs. *Internal Medicine*, 70(8): 841 - 843.
- Solomon, S. E., Farias, M. R., & Pimpão, C. T. (2012). Dermatite atópica canina: fisiopatologia e diagnóstico. *Revista Acadêmica Ciência Animal*, 10(1): 21-28.
- Sonkoly, E., Muller, A., Lauerma, A. I., Pivarcsi, A., Soto, H., & *et al.* (2006). IL-31: A new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 117(2): 411-417.
- Souza, C. P., Rosychuk, R. A., Contreras, E. T., Schissler, J. R., & Simpson, A. C. (2018). A retrospective analysis of the use of lokivetmab in the management of allergic pruritus in a referral population of 135 dogs in the western USA. *Veterinary Dermatology*, 29(6): 489.

- Stahl, J., Baumer, W., & Olivry, T. (2012). Dermatophagoides farinae house dust mite allergen challenges reduce stratum corneum ceramides in an experimental dog model of acute atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 23(6): 497.
- Steffan, J., Favrot, C., & Mueller, R. (2006). A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of cyclosporin for the treatment of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*, 17(1): 3-16.
- Swinnen, C., & Vroom, M. (2004). The clinical effect of environmental control of house dust mites in 60 house dust mite-sensitive dogs. *Veterinary Dermatology*, 15(1): 31 - 36.
- Sylvia, W., Kovalik, M., & Favrot, C. (2010). Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 22(2): 143 - 149.
- Szczepanik, M., Wilkotek, P., Golynski, M., Sitkowski, W., Taszkun, I., & Toczek, W. (2019). The influence of treatment with lokivetmab on transepidermal water loss (TEWL) in dogs with spontaneously occurring atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 30(4): 330 .
- Tamamoto-Mochizuki, C., Paps, J. S., & Olivry, T. (2019). Proactive maintenance therapy of canine atopic dermatitis with the anti-IL-31 lokivetmab. Can a monoclonal antibody blocking a single cytokine prevent allergy flares? *Veterinary Dermatology*, 30(2): 98.
- Timm, K., Mueller, R. S., & Nett-Mettler, C. (2018). Long-term effects of intralymphatic immunotherapy (ILIT) on canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 29(2): 123.
- Tizard, I. (2013). 28: Type I Hypersensitivity. Em *Veterinary Immunology* (9 ed., pp. 327 - 328). St. Louis: Elsevier.
- Uchida, Y. (2014). Ceramide signaling in mammalian epidermis. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841(3): 453 - 462.
- Weese, J. S. (2013). The canine and feline skin microbiome in health and disease. *Veterinary Dermatology*, 24(1): 137.
- Wilhem, S., Kovalik, M., & Favrot, C. (2010). Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 22(2): 143-149.

- Wood, S. H., Ke, X., Nuttall, T., McEwan, N., Ollier, W. E., & Carter, S. D. (2009). Genome-wide association analysis of canine atopic dermatitis and identification of disease related SNPs. *Immunogenetics*, 61(11-12): 765 - 772.
- Wood, S. H., Ollier, W. E., Nuttall, T., McEwan, N. A., & Carter, S. D. (2010). Despite identifying some shared gene associations with human atopic dermatitis the use of multiple dog breeds from various locations limits detection of gene associations in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 138(3): 193 - 197.
- Yasukawa, K., Saito, S., Kubo, T., Shibasaki, Y., Yamaoka, K., & *et al.* (2010). Low-dose recombinant canine interferon-c for treatment of canine atopic dermatitis: An open randomized comparative trial of two doses. *Veterinary Dermatology*, 21(1): 42-49.
- Youn, H.-Y., Kang, H.-S., Bhang, D.-H., Kim, M.-K., Hwang, C.-Y., & Han, H.-R. (2002). Allergens causing atopic diseases in canine. *Journal of Veterinary Science*, 3(4): 335 - 341.
- Young, A. J., Torres, S. M., Koch, S. N., Eisenschenk, M. N., & Rendahl, A. K. (2019). Canine Pruritus Visual Analog Scale: how does it capture owner's perception of their pet's itching level? *Veterinary Dermatology*, 30(5): 377.
- Zhang, Q., Putheti, P., Zhou, Q., Liu, Q., & Gao, W. (2008). Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. *Cytokine Growth Factor*, 19(5-6): 347-356.
- Zoetis. (15 de Maio de 2018). *Cytopoint*. Obtido de Zoetis United States: <https://www.zoetisus.com/products/dogs/cytopoint/efficacy.aspx>

ANEXOS

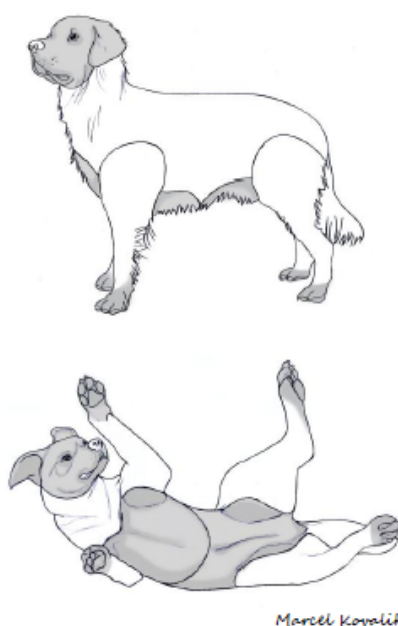
ANEXO I

– Escala de descrição das lesões – Canine Atopic Dermatitis Lesion index (CADLI)

Canine Atopic Dermatitis Lesion Index (CADLI)

Score each of the indicated body regions, integrating the severity and extent of the lesion(s) in the area.
(0 = none; 1 = mild; 2,3 = moderate; 4, 5 = severe and extensive lesions)
Consult the CADLI Guide for examples of lesion scoring.

Body region	Erythema Excoriation Erosion 0-5	Alopecia Lichenification Hyperpigmentation 0-5
Head & Pinnae		
Forefeet		
Hind Feet		
Ventral Thorax & Axillae		
Ventral Abdomen & Inguinal		
Sub-totals 0-25		
Total 0-50		



Patient: _____

Scored by: _____

Date: _____

Seconds to complete: _____

©2011 SkinVet Clinic, LLC

Drawings by Marcel Kovalik

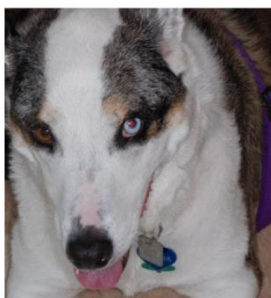
Classificação observacional pelo operador, por regiões e grupo de lesões, de acordo com um score de 0 a 5 (conforme as imagens que se seguem). No fim gera-se um total de 0 a 50.

– Guia para classificação das lesões da CADLI

0-5	0-5	0-5	0-5	0-5	0-5
Erythema - Excoriation - Erosion	0	Erythema - Excoriation - Erosion	0	Erythema - Excoriation - Erosion	1
Alopecia - Lichenification - Hyperpigmentation		Alopecia - Lichenification - Hyperpigmentation	0	Alopecia - Lichenification - Hyperpigmentation	



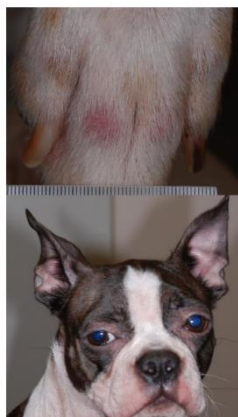
0-5	0-5
Erythema - Excoriation - Erosion	
Alopecia - Lichenification - Hyperpigmentation	1



0-5	0-5
Erythema - Excoriation - Erosion	2
Alopecia - Lichenification - Hyperpigmentation	



0-5	0-5
Erythema - Excoriation - Erosion	
Alopecia - Lichenification - Hyperpigmentation	2



0-5	0-5
Erythema - Excoriation - Erosion	3
Alopecia - Lichenification - Hyperpigmentation	



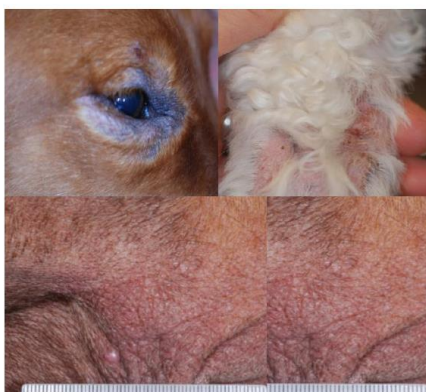
0-5	0-5
Erythema - Excoriation - Erosion	
Alopecia - Lichenification - Hyperpigmentation	3



0-5	0-5
Erythema - Excoriation - Erosion	4
Alopecia - Lichenification - Hyperpigmentation	



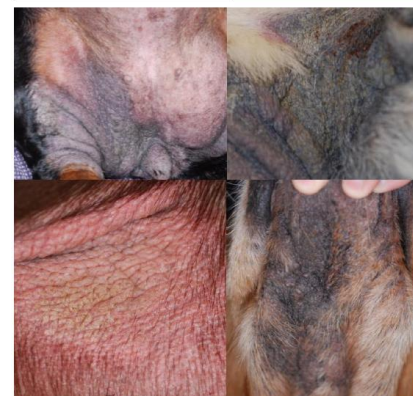
0-5	0-5
Erythema - Excoriation - Erosion	
Alopecia - Lichenification - Hyperpigmentation	4



0-5	0-5
Erythema - Excoriation - Erosion	5
Alopecia - Lichenification - Hyperpigmentation	

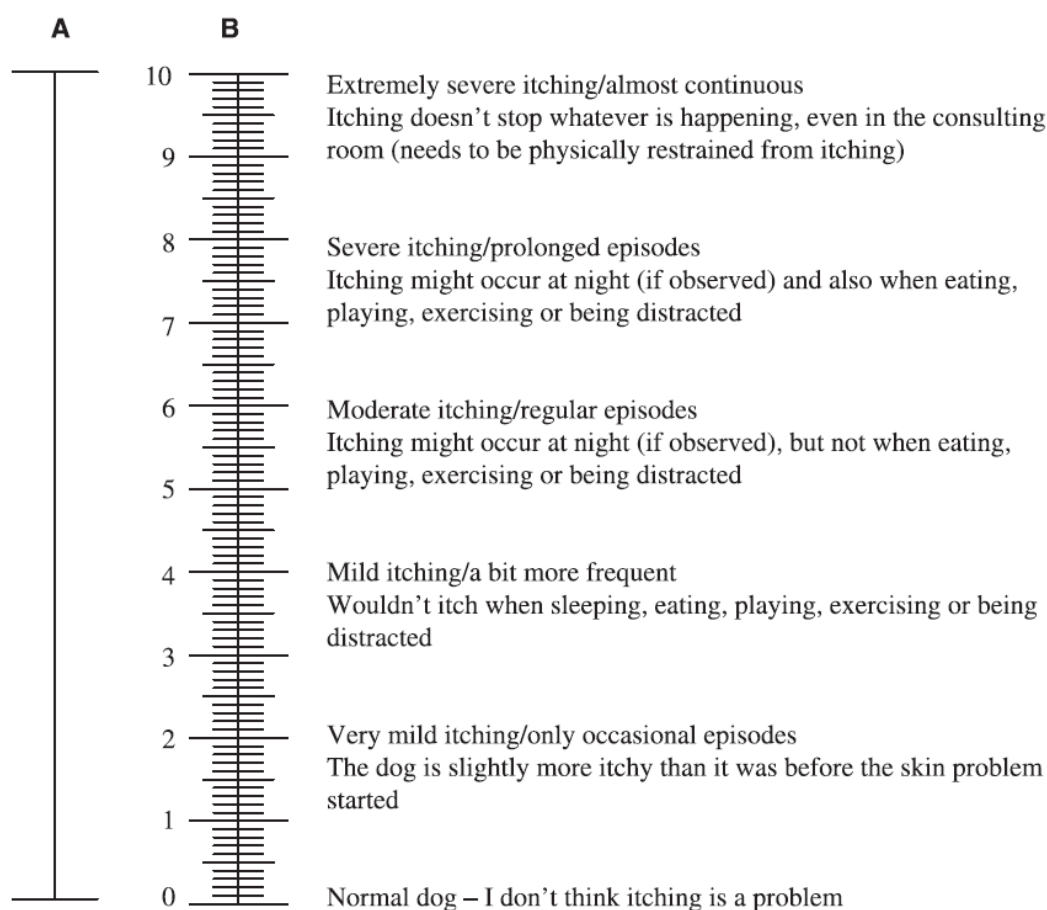


0-5	0-5
Erythema - Excoriation - Erosion	
Alopecia - Lichenification - Hyperpigmentation	5



ANEXO II

– Escala de descrição do grau do prurido – Escala Analógica Visual (pVAS)



Classificação do prurido do animal de acordo com a percepção do tutor no momento da consulta. A escala é descritiva e numérica de 0 a 10, em que 0 é nenhum prurido, e 10 prurido extremo.

ANEXO III

– Guidelines da posologia do Cytopoint®

	DOG BODY WEIGHT		VIALS NEEDED				TOTAL VIALS
	Pounds	(Kilograms)	10 mg	20 mg	30 mg	40 mg	
DOGS <5 lb (<2.3 kg) 0.09 mL/lb (0.2 mL/kg) drawn from ONE 10-mg vial.	<5	(<2.3)	<1				<1
DOGS 5-40 lb (2.3-18.1 kg) Draw full volume from ONE 1-mL vial as indicated.	5.0 - 10	(2.3 - 4.5)	1				1
	10.1 - 20	(4.6 - 9.1)		1			1
	20.1 - 30	(9.2 - 13.6)			1		1
	30.1 - 40	(13.7 - 18.1)				1	1
DOGS >40 lb (>18.1 kg) Requires full volume of TWO OR MORE 1-mL vials as indicated. Draw the entire dose (or volume) from each vial into one syringe and administer as a single injection.	40.1 - 50	(18.2 - 22.7)	1			1	2
	50.1 - 60	(22.8 - 27.2)		1		1	2
	60.1 - 70	(27.3 - 31.7)			1	1	2
	70.1 - 80	(31.8 - 36.3)				2	2
	80.1 - 90	(36.4 - 40.8)	1			2	3
	90.1 - 100	(40.9 - 45.4)		1		2	3
	100.1 - 110	(45.5 - 49.9)			1	2	3
	110.1 - 120	(50.0 - 54.4)				3	3
	120.1 - 130	(54.5 - 59.0)	1			3	4
	130.1 - 140	(59.1 - 63.5)		1		3	4
	140.1 - 150	(63.6 - 68.0)			1	3	4
	150.1 - 160	(68.1 - 72.6)				4	4
	160.1 - 170	(72.7 - 77.1)	1			4	5
	170.1 - 180	(77.2 - 81.6)		1		4	5
	180.1 - 190	(81.7 - 86.2)			1	4	5
	190.1 - 200	(86.3 - 90.7)				5	5

ANEXO IV

– Manual de instruções de acordo com o fabricante - Canine IL-31 Elisa kit (ABclonal)

Canine Interleukin 31 (IL-31) ELISA Kit



Canine Interleukin 31 (IL-31) ELISA Kit
Catalog Number: EC10041 (96 Tests)

This kit is to detect Canine Interleukin 31. Compatible sample types: serum, plasma, cell culture supernatants, tissue homogenate, body fluid
Store all reagents at 2-8°C

FOR RESEARCH USE ONLY. NOT FOR THERAPEUTIC OR DIAGNOSTIC APPLICATIONS. READ THROUGH ALL PROCEDURES BEFORE USE.

ASSAY PRINCIPLE

The IL-31 ELISA is a quantitative competitive immunoassay. The plate provided is coated with an IL-31 specific antibody. Standards and experimental samples are co-incubated in wells along with an IL-31 -HRP conjugate. IL-31 in standards and samples competes with the IL-31 -HRP conjugate for binding to the plate-bound antibody. Higher levels of IL-31 from standards or samples lead to decreased IL-31 -HRP conjugate binding and thus reduced signal. Captured IL-31 -HRP is quantitatively detected by incubation with HRP substrates (substrates A and B). Binding of the IL-31 -HRP is visualized by production of colorimetric reaction products that can be quantitatively measured by EMR absorbance at 450nm.

MATERIALS

All reagents must be stored at 2-8° C. Refer to the expiration date on the label.

	Wellplate	96 strip wells	
1	Standard A	0 pg/ml	0.5 ml
2	Standard B	50 pg/ml	0.5 ml
3	Standard C	100 pg/ml	0.5 ml
4	Standard D	250 pg/ml	0.5 ml
5	Standard E	500 pg/ml	0.5 ml
6	Standard F	1000 pg/ml	0.5 ml
7	Substrate A	1 vial	6.0 mL
8	Substrate B	1 vial	6.0 mL
9	Stop Solution	1 vial	6.0 mL
10	Enzyme Solution	1 vial	6.0 mL
11	Balance Solution	1 vial	1 mL
12	Wash Solution (25x)	1 vial	50 mL

GENERAL CONSIDERATIONS

1. Samples should be handled following standard practices to minimize degradation or denaturation. Avoid multiple freeze-thaw cycles and high temperatures. For long term storage, maintain samples at temperatures that minimize degradation or denaturation (-20C is recommended).

13. Washing can be performed using a squirt bottle and filling all wells to the top.
14. Standards and samples must be assayed at the same time. Do not mix reagents from different lots. Again, it is recommended that assays be performed at least in duplicate.
15. This kit might be not suitable for some peptides or recombinant proteins. If samples were peptides or recombinant proteins, please consult with our technical team before use.

SAFETY NOTES

1. This kit contains 3, 3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine (TMB) in Substrate B. TMB, present at levels greater than or equal to 0.1% is NOT identified as a carcinogen or potential carcinogen by OSHA. TMB may cause irritation to skin and eyes. Please wear appropriate personal protective equipment, including gloves, safety glasses, and lab coats when handling.
2. The Stop Solution provided in the kit is an acidic solution. Please wear appropriate personal protective equipment (gloves, safety glasses, lab coat) when handling this and other kit components.
3. All blood components and biological materials should be handled as potentially hazardous. Follow universal precautions as established by the Centers for Disease Control and Prevention and by the Occupational Safety and Health Administration when handling and disposing of infectious agents.
4. All waste must be disposed of in accordance with all applicable local, state, and federal regulations.

Calculation of competitive ELISA results

Original data (example)

OD	Concentration of standards
2.1515	0
1.4933	50
1.1893	100
0.8247	250
0.5132	500
0.2124	1000

Data processing

X: O.D. of other non-zero standards divided by that of Standard 0, then multiplied by 100;
Y: log(base 10 or other) of (concentration of standards)

X	Y
100	0

freeze-thaw cycles and high temperatures. For long term storage, maintain samples at temperatures that minimize degradation or denaturation (-20C is recommended).

2. Without prior knowledge of the analyte concentration, determining the amount of sample required for robust detection is difficult. Therefore, we recommend that enough sample be collected to allow for multiple dilutions to be assayed.
3. Experimental variation between wells is to be expected. We recommend assays be performed using AT LEAST two wells for every sample or standard. Readings of duplicate wells should be averaged.
4. Two blank wells containing only PBS or DI H2O should be tested to determine background.

REAGENT PREPARATION

1. Bring all kit components and samples to room temperature before use.
2. Bring Plate to room temperature before opening. Remove the desired number of well strips and immediately reseal and store at 2-8°C.
3. Dilute 40 mL of Wash Solution concentrate (25x) with 960 mL of deionized or distilled water. If crystals have formed in the concentrate warm to room temperature and mix to dissolve.

SAMPLE PREPARATION

1. Using serum or plasma directly without any dilution (neat) will often give more accurate results than any other sample type.
2. If samples are not serum or plasma, or have been diluted, 10µL of Balance Solution is required to be added into 100µL experimental samples. Balance solution is recommended for diluted serum or plasma samples.

ASSAY PROCEDURE

1. Add 100µL of sample or standards to the appropriate number of wells in the supplied wellplate. Note that wells have been pre-blocked and no additional blocking steps are required. Add 100µL of PBS (pH 7.0-7.2) or water to the blank well.
2. Add 50µL of Enzyme Solution to each well (but NOT blank well) in the supplied Plate and mix well.
3. Cover and incubate 1 hour at 37°C in a humid chamber.
4. Wash each well 5 times with 300-400µL IX Wash Solution per well. After the last wash invert the plate and blot dry by tapping on absorbent paper. Note: Hold the sides of the plate frame firmly when washing to assure that all strips remain securely in the frame. Complete

performance of the assay.

5. Add 50µL Substrate A to each well followed by addition of 50µL Substrate B. Cover and incubate 10-15 minutes at room temperature. Substrate is light sensitive. Keep out of direct sunlight or cover with foil.
6. Add 50µL of Stop Solution to each well and mix well.
7. Immediately read the optical density (O.D.) at 450 nm.
8. Subtract the mean blank value from each sample or standard value and calculate the mean for duplicate (or greater) wells.
9. Construct the standard curve using graph paper or statistical software.

Note: Blank well must NOT have Enzyme Solution.

SENSITIVITY AND SPECIFICITY

1. The sensitivity of this assay should be approximately 1.0pg/ml
2. This assay has high sensitivity and excellent specificity for the detection of IL-31. No significant cross-reactivity or interference between IL-31 and any homologous proteins assayed has been observed. Cross-reactivity with other species has not been specifically determined.

ADDITIONAL SUGGESTIONS

1. When not in use, kit components should be refrigerated (4C for short-term use, or -20C for long-term storage). All reagents should be warmed to room temperature before use.
2. Samples should be collected in pyrogen/endotoxin-free tubes.
3. When possible, avoid use of hemolyzed or lipemic sera. Centrifuge or filter samples if particulate matter is present.
4. It is recommended that all standards, controls, and samples be run at least in duplicate.
5. To insure equal incubation times, maintain a consistent order of addition from well-to-well when pipetting reagents.
6. Cover or cap all reagents when not in use.
7. Do not mix or interchange different reagent lots from various kit lots.
8. Do not use reagents after the kit expiration date.
9. Determine absorbance within 2 hours of assay completion.
10. The provided standards should be run with every assay.
11. Substrate B is light sensitive. Avoid prolonged exposure to light. Substrate B will discolor metals, so contact with metals should be avoided.
12. Incomplete washing will adversely affect the test results. All washing must be performed with care.



support the needs of academic and industry clients for custom-made proteins, antibodies and peptides. In addition, we maintain a large catalog of unique and highly sensitive ELISA kits, and ready-made proteins, peptides, antibodies, custom ChIP-seq, and cell culture products.

Custom antibody service

ABclonal not only provides antibodies for leading antibody vendors in the world market, but also partners with prestigious pharmaceutical institutions, research academics, and other scientific industries. In addition to manufacture, we dedicate to be the best validation platform in the world.

Peptide Synthesis

ABclonal has a more than a 400,000 square foot state of the art facility with peptide synthesizers, HPLCs, and mass spectrometers capable of producing over 10,000 peptides/month. We offer a comprehensive range of Peptide Synthesis Services from peptide sequence design to complex peptide modifications. We provide the highest quality peptide synthesis at the most competitive prices. All our peptides come with a complete quality control package, which includes HPLC and MS Analysis.

Custom Protein Expression and Purification

ABclonal custom recombinant protein services provide a comprehensive portfolio of protein expression systems, including bacteria, yeast, baculovirus infected insect cells, and mammalian cells. With our proprietary optimization technology, the expression level can be significantly increased. We also offer a full spectrum of protein purification methods to achieve the ideal level of protein purity. We work in partnership with our clients to ensure efficient and high quality reagent production with customized solutions, flexible production scale, and proprietary technologies. We can also provide process development and scale-up production of biologics for research purposes.

Innovative Technology

GlycoPep™: Peptide with PTM

We offer our customers a novel technology platform for development of Post-Translationally Modified (PTM) peptides for diagnostics, epitope mapping, companion drug biomarkers, and monitoring immune signatures. Our patent portfolio covers enzymes & methods for production of these glycosylated PTM-peptides and biomarkers. We can provide our customers with custom made glycosylated peptides to meet their research needs.

69.407	1.698970004100
55.277	2
38.331	2.397940009
23.953	2.698970004
9.872	3

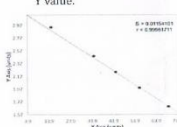
3. The standard curve is generated using some curve software (standard 0 is not used).

The formula:

Linear Fit: $y = a + bx$
Coefficient Data: 0.998
 $a = 3.22E+00$
 $b = -2.19E-02$

Calculation of results

- 1) To process the sample O.D.: O.D. of samples divided by that of Standard 0, then multiplied by 100;
- 2) To get Y value using the above formulation
- 3) To get the concentration of samples: 10 to the power of Y value.



Featured Products:

ELISA Kits (>10,000):

Species: Human, Mouse, Rat, Rabbit, Guinea Pig, Goat, Porcine, Canine, Bovine, Avian, etc.
Subcategories: Cytokine, Globulin, CD & AM, Innate Immune, Immunomodulator, Transplantation, Autoimmunity, Apoptosis, Tumor Immune, Hypersensitivity, Immunity, Infectious Disease, Hematology, Vascular, Signal Transduction, Neuroscience, Eye & Ear, Respiratory, Digestive, Urinary System, Aristogenesis, Endocrine, Metabolism, Enzyme, Kinase, Hormone, etc.

Proteins and Antibodies (>5,000):

Cytokines, Growth Factors, Chemokines, Hormones, Enzymes and Viral Antigens

Technical Services

Overview

ABclonal is a dynamic and growing provider of high quality biology research reagents, tools, and custom services. From our headquarters in the heart of the Boston Biotech Cluster we

APÊNDICES

APÊNDICE I

- Folheto informativo

Se o seu cão sofre de dermatite atópica e tiver interesse e estiver disposto a contribuir para este estudo, não hesite em falar com a médica veterinária Dr^a Diana Ferreira ou a estagiária Margarida Martins.

Obrigada!

Em caso de dúvida não hesite em entrar em contacto:

diana.ferreira@onevetgroup.pt
margaridamartins.medvet@gmail.com



afinal, o que é
DERMATITE ATÓPICA??
SINTOMAS, TRATAMENTOS E DICAS!
Apresentação de um estudo – dissertação de final de curso (a decorrer).



A dermatite atópica

Trata-se de uma reação alérgica do organismo em resposta à exposição a alérgenos do ambiente. Resulta numa inflamação da pele e comichão exuberante pelo animal.

O diagnóstico desta doença passa por descartar outras doenças que provoquem igualmente comichão no animal, como infeções (ex. por leveduras e bactérias), infestações parasitárias (ex. pulgas) e alergia alimentar. No seguinte passo pode recorrer-se à realização de testes alergológicos para tentar perceber quais os alérgenos responsáveis pela alergia.

Embora a dermatite atópica não tenha cura, é controlável, através de múltiplas opções de tratamento no sentido de conceder maior qualidade de qualidade de vida, desinflamando a pele e diminuindo a sensação de comichão.

Alcumas possibilidades de terapia incluem:

- Bom plano antiparasitário;
- Banhos regulares;
- Vacinas de alergias;
- Tratamento anti-inflamatório/antipruriginosos (diminuem a comichão).
- Dietas ricas em ácidos gordos essenciais.



Como sei se o meu animal é atópico?

- Coçar, morder, lambear, esfregar (sinais de comichão);
- Pele avermelhada;
- Falta de pelo localizada;
- Otites e infeções recorrentes.

Todos estes sinais que o animal demonstra são sinais de alerta. Deve, por isso, aconselhar-se junto do seu médico veterinário de modo a travar a evolução da doença.

Introdução ao estudo:

Com o aumento do número de cães diagnosticados com este problema de pele, impõe-se a necessidade de opções de tratamento mais eficazes e com menores riscos para o paciente. Recentemente foi colocado no mercado um novo produto antipruriginoso, chamado de "Cytoint", que consiste na administração de uma injeção mensal. O resultado tem vindo a revelar-se muito satisfatório nos animais que respondem à terapia, no entanto nem todos os cães respondem. Trata-se de um produto bastante seguro e praticamente sem efeitos secundários.

Eu sou uma aluna de medicina veterinária da ULHT, e tenho proposta como dissertação de final de curso o estudo da resposta de cães com atopia, a este medicamento com o intuito de determinar que animais poderão beneficiar eventualmente desta opção terapêutica.

Metodologia: será recolhida uma amostra de sangue antes da primeira administração de "Cytoint", ao fim do primeiro mês e após dois meses de tratamento, num total de 3 recolhas sanguíneas no hospital.



APÊNDICE II

- Termo de consentimento



Termo de consentimento

Eu, _____
_____, portador do cartão de cidadão nº _____,
aceito e autorizo o meu animal com o nome _____,
raça _____, género _____ e idade _____, a
participar no presente estudo com o título **"Comportamento da IL-
31 ao longo do tratamento com Cytopoint"**, ciente da realização da
técnica usada.

Declaro estar informado de que em qualquer momento (antes ou
durante o estudo) poderei desistir do estudo e que essa decisão
não prejudicará no acompanhamento do meu animal pelo médico
(a) veterinário (a) responsável, caso venha a ocorrer qualquer
complicação. Autorizo fotografar meu animal durante o processo e
veicular as fotos em futuras publicações do trabalho em revistas
científicas ou em aulas e palestras.

Lisboa, _____ de _____ de 2019.