



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO CEARÁ
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS
MESTRADO ACADÊMICO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

TIAGO CUNHA FERREIRA

REPERCUSSÕES CLÍNICAS DE MECANISMOS DE HIPERSENSIBILIDADE
CUTÂNEA EM CÃES

FORTALEZA – CEARÁ
2019

TIAGO CUNHA FERREIRA

REPERCUSSÕES CLÍNICAS DE MECANISMOS DE HIPERSENSIBILIDADE
CUTÂNEA EM CÃES

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro.

FORTALEZA – CEARÁ

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Universidade Estadual do Ceará

Sistema de Bibliotecas

Ferreira, Tiago Cunha.

Repercussões clínicas de mecanismos de hipersensibilidade cutânea em cães [recurso eletrônico] / Tiago Cunha Ferreira. - 2019.

1 CD-ROM: il.; 4 ¾ pol.

CD-ROM contendo o arquivo no formato PDF do trabalho acadêmico com 87 folhas, acondicionado em caixa de DVD Slim (19 x 14 cm x 7 mm).

Dissertação (mestrado acadêmico) Área de concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Orientação: Prof.^a Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro.

1. Atopia Canina. 2. Reação Adversa à Drogas. 3. Inflamação Tecidual. I. Título.

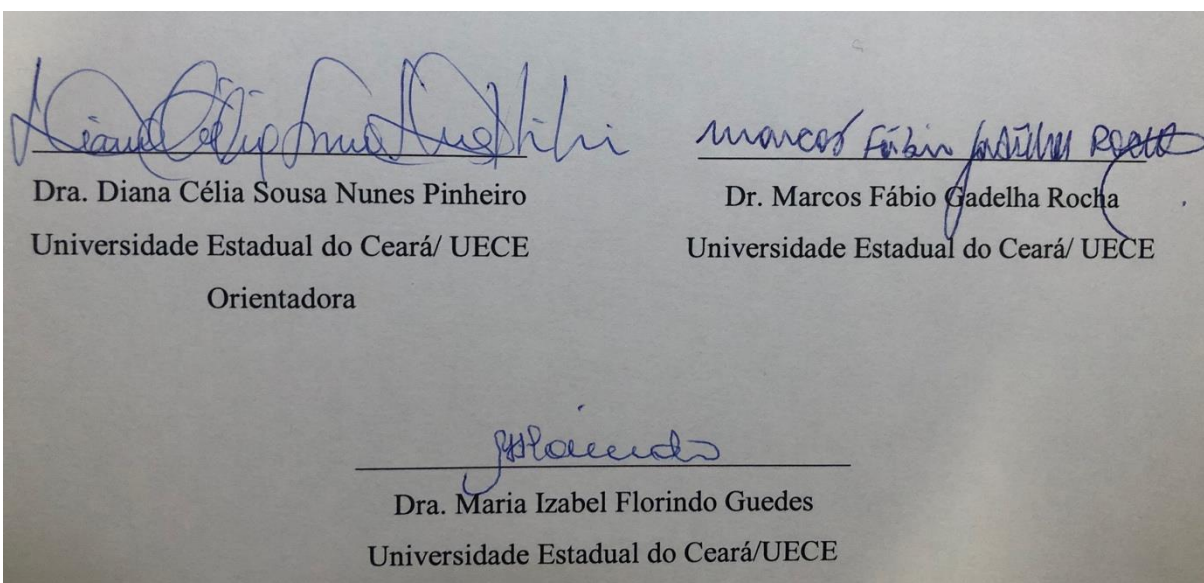
TIAGO CUNHA FERREIRA

REPERCUSSÕES CLÍNICAS DE MECANISMOS DE HIPERSENSIBILIDADE
CUTÂNEA EM CÃES

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias. Área de Concentração: Reprodução e Sanidade Animal.

Aprovada em: 09 de setembro de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro
Universidade Estadual do Ceará/ UECE
Orientadora

Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Dr. Marcos Fábio Gadelha Rocha
Universidade Estadual do Ceará/ UECE

Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Dra. Maria Izabel Florindo Guedes
Universidade Estadual do Ceará/UECE

A Deus e aos meus pais, Maria do Socorro e
Raimundo,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por estar sempre ao meu lado orientando, dando força e fortalecendo a minha fé. A ele, agradecimentos eternos por tudo que consegui em vida.

À minha orientadora Profa. Dra. Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro, por sua disponibilidade, dedicação e atenção desde a época da graduação.

Aos amigos do Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal (LIBA), pela ajuda e companheirismo durante esses meses de pós-graduação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV) da Faculdade de Veterinária (FAVET) da UECE, em especial aos professores, pelos conhecimentos e experiências compartilhados.

Aos membros da banca, por prontamente aceitarem o convite para participar desse momento tão importante para mim, e oferecerem sugestões para melhor apresentação do manuscrito.

Aos meus pais, ao meu irmão e a minha avó, por serem essas pessoas maravilhosas que Deus concedeu para estarem comigo nessa vida. Vocês são os meus pilares, amo muito vocês!

Aos meus companheiros de caminhada, em especial Dalva Rafaela, Wasley Maciel, Rodrigo Guedes e Victor Araújo, pelo ombro amigo e paciência durante todos esses anos.

Sou profundamente grato a todos vocês!

RESUMO

As reações de hipersensibilidade cutânea são definidas como mecanismos imunológicos de resposta exacerbada a antígenos endógenos ou exógenos. Essas reações estão envolvidas no desenvolvimento de diferentes enfermidades, como as Farmacodermias e a Dermatite Atópica Canina (DAC). Baseado nisso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar as repercussões clínico-laboratoriais das reações de hipersensibilidade cutânea em cães por meio das seguintes estratégias: avaliação da resposta inflamatória tecidual e sistêmica em cães com DAC e investigação de casos clínicos envolvendo mecanismos de hipersensibilidade em dermatopatias caninas. Para tanto, foram incluídos no estudo dez cães com dermatite atópica, sendo submetidos à avaliação clínica das lesões, avaliação hemato-bioquímica e avaliação histopatológica. A análise clínica baseada no grau lesional (CADESI) permitiu a divisão dos cães em dois grupos: AI (N=5), com CADESI entre 0-10, e AII (N=5), com CADESI entre 10-34. O grupo controle (N=5) foi proveniente do canil do corpo de bombeiros do Estado do Ceará, composto por animais isentos de enfermidades tegumentares e sistêmicas. Os cães atópicos apresentaram menor contagem de eosinófilos circulantes ($p<0.05$), assim como tendência a maior contagem de neutrófilos e relação neutrófilo/linfócito. O valor de albumina foi superior no grupo AI, quando comparado a AII e controle ($p<0.05$), enquanto a dosagem de malondialdeído (MDA) não diferiu entre os grupos. Observou-se na avaliação histopatológica dos grupos AI e AII, a presença de alterações epidérmicas e infiltrado inflamatório perivascular caracterizado por neutrófilos, macrófagos, linfócitos, eosinófilos e mastócitos. No que se refere a contagem celular, foi possível observar maior quantidade de mastócitos nos grupos AI e AII que no grupo controle ($p<0.05$). A partir do exposto, conclui-se que houve aumento na resposta inflamatória tecidual e sistêmica na DAC. Contudo, esse processo não foi capaz de interferir no balanço oxidativo dos cães avaliados. Relatou-se, também, neste trabalho, o desenvolvimento de pênfigo foliáceo (PF) após reação de hipersensibilidade à Mupirocina em cão. O cão apresentou urticaria, colarinhos epidérmicos difusos, lesões papulo-crostosas, eritema nasal, blefarite biocular, apatia e febre. Realizou-se exame citológico e histopatológico, sendo os achados compatíveis com PF. Após a terapia, o paciente apresentou redução do quadro lesional, contudo, observa-se recidiva das lesões quando a dose da corticoterapia é reduzida. Por fim, relatou-se um caso de otite aguda canina secundária à reação de hipersensibilidade à solução otológica. Após a instituição da terapia auricular, o cão apresentou intenso eritema auricular e secreção melicérica bilateralmente.

Realizou-se exame citológico, assim como cultura de bactérias aeróbicas, sendo evidenciado em tais exames um infiltrado inflamatório piogranulomatoso, com pouca presença de conteúdo bacteriano e fúngico, corroborando com os achados da cultura bacteriana. A nova terapia consistiu na troca de todos os compostos medicamentosos, sendo adquirida a remissão lesional no décimo dia de tratamento. Em conjunto, os trabalhos fornecem evidências de diferentes manifestações clínicas associadas às reações de hipersensibilidade em cães, sendo necessária atenção do Médico Veterinário para identificação e interpretação dos sinais associados a esta desordem imunológica.

Palavras-chave: Atopia canina. Reação adversa à droga. Inflamação tecidual.

ABSTRACT

Skin hypersensitivity reactions are defined as immunological mechanisms of exacerbated response to endogenous or exogenous antigens. These reactions are involved in the development of different diseases, such as Pharmacoderma and Canine Atopic Dermatitis (CAD). Based on this, the present study aimed to evaluate the clinical and laboratory repercussions of skin hypersensitivity reactions in dogs through the following strategies: evaluation of the tissue and systemic inflammatory response in dogs with CAD and investigation of clinical cases involving mechanisms of hypersensitivity in canine skin diseases. To this end, ten dogs with atopic dermatitis were included in the study, and were submitted to clinical evaluation of lesions, blood-biochemical evaluation and histopathological evaluation. Clinical analysis based on lesion grade (CADESI) allowed the dogs to be divided into two groups: AI (N = 5), with CADESI between 0-10, and AII (N = 5), with CADESI between 10-34. The control group (N = 5) came from the kennel of the fire department of the State of Ceara, composed of animals free from integumentary and systemic diseases. Atopic dogs had lower circulating eosinophil counts ($p < 0.05$), as well as a tendency to higher neutrophil counts and neutrophil/lymphocyte ratio. The albumin value was higher in group AI when compared to AII and control ($p < 0.05$), while malondialdehyde (MDA) dosage did not differ between groups. The histopathological evaluation of groups AI and AII showed epidermal alterations and perivascular inflammatory infiltrate characterized by neutrophils, macrophages, lymphocytes, eosinophils and mast cells. Regarding the cell count, it was possible to observe a larger number of mast cells in AI and AII groups than in the control group ($p < 0.05$). From the above, it is concluded that there was an increase in tissue and systemic inflammatory response in CAD. However, this process was not able to interfere with the oxidative balance of the dogs evaluated. The development of pemphigus foliaceus (PF) after hypersensitivity reaction to mupirocin in dogs was also reported in this study. The dog presented urticaria, diffuse epidermal collars, papulo-crusted lesions, nasal erythema, biocular blepharitis, apathy and fever. Cytological and histopathological examination was performed, and the findings were compatible with PF. After therapy, the patient presented a lesion reduction, however, there is a recurrence of lesions when the corticosteroid dose is reduced. Finally, a case of acute canine otitis secondary to the hypersensitivity reaction to the otological solution was reported. After ear therapy was instituted, the dog presented intense ear erythema and bilaterally melic secretion. Cytological examination was performed, as well as culture of aerobic bacteria, being evidenced in such exams a piogranulomatous

inflammatory infiltrate, with little presence of bacterial and fungal content, corroborating the findings of the bacterial culture. The new therapy consisted of the exchange of all drug compounds, with lesion remission being acquired on the tenth day of treatment. Taken together, the papers provide evidence of different clinical manifestations associated with hypersensitivity reactions in dogs, requiring veterinary attention to identify and interpret the signs associated with this immune disorder.

Keywords: Canine Atopy, Adverse Drug Reaction, Tissue Inflammation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estrutura da pele e células efetoras.....	20
Figura 2 - Aspectos estruturais da pele canina com (B) e sem (A) deficiência de ceramidas.....	23
Figura 3 - Mecanismos imunológicos clássicos na dermatite atópica.....	24
Figura 4 - Relação entre estresse oxidativo, defeito de barreira cutânea e inflamação dérmica na dermatite atópica.....	28

CAPÍTULO I

Figure 1 - Histopathological aspects of dogs with CAD. (A) and (D) represent the control group (H&E), which shows no visible dermal and epidermal changes. In (B) it is possible to observe the epidermal layer thickening (H&E). In (C) there is epidermal thickening, hydropic degeneration of keratinocytes, as well as neutrophilic exocytosis (H&E). (E) and (F) highlight the presence of inflammatory infiltrate in dermis of atopic dogs (H&E). In (H) and (I) it is possible to observe mast cells composing the dermal inflammatory cells of atopic dogs, while (G) represents the control group, with a reduced number of these cells (Toluidine Blue). Scale bar: 1µm. Original magnification: 400x.....	48
---	-----------

CAPÍTULO II

Figure 1 - Aspects of skin lesions before (A) and 4 days after (B) topical use of mupirocin. Treatment after cutaneous mupirocin drug reaction - 07 days (C) and 15 days (D). Author source.....	68
Figure 2 - Cytological evaluation (A) presents inflammatory infiltrate characterized by neutrophils, macrophages and acantholytic keratinocytes (arrow). Original magnification: 1000x. Scale bar: 50µm. Skin biopsy revealed subcorneal pustule, with acantholytic epithelial cells interspersed by a large number of intact neutrophils.	68

H&E, Original magnification: 100x (B) and 400x (C). Scale bar: 50µm. Author source.....

Figure 3 - Skin lesions in nasal planum (A) and eye (B). Author source..... 69

CAPÍTULO III

Figura 1 - Fotomicrografia de exame citológico auricular, demonstrando intensa presença de células leveduriformes associada a processo inflamatório. A) Células leveduriformes compatíveis com *Malassezia* spp (seta preta); B) Presença de intenso infiltrado inflamatório piogranulomatoso após reação farmacodérmica composto por células polimorfonucleadas (seta vermelha) e mononucleadas (seta amarela). Panótico rápido, microscopia óptica em amplificação de 1000x. Escala:

50µm..... 74

Figura 2 - Condição e evolução clínica do pavilhão auricular no início da reação farmacodérmica e após a troca da medicação. (A) Avaliação inicial após a farmacodermia, com presença de eritema e secreção auricular de caráter melicérico (seta amarela). (B) Reavaliação auricular após 03 dias da troca da medicação. (C) Reavaliação auricular após 07 dias da troca da medicação. (D) Reavaliação auricular após 10 dias da troca da medicação, onde observa-se ausência de eritema e secreção auricular..... 75

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Table 1 - Hematological, biochemical and clinical assessment parameters in control and atopic dogs.....	49
Table 2 - Epidermal changes in control and atopic dogs.....	50
Table 3 - Inflammatory cells composition in control and atopic dogs.....	51

CAPÍTULO II

Table 1 - Hemato-biochemical parameters in a dog with drug-triggered pemphigus foliaceus. T0 represents the hemato-biochemical parameters before treatment with corticosteroids and azathioprine. T1 represents the parameters after azathioprine and low dose of corticosteroids. T2 represents the parameters after azathioprine removal and high dose of corticosteroids.....	67
---	-----------

CAPÍTULO III

Tabela 1 - Algoritmo de Naranjo adaptado para a paciente.....	77
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Percentage
Ag	Antígeno
AGE	Ácido Graxo Essencial
AMP	Antimicrobial Peptides
CAD	Canine Atopic Dermatitis
CADESI	Canine Atopic Dermatitis Extension Index
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior
CD	Cluster of Differentiation
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
CL	Células de Langerhans
DA	Dermatite Atópica
DAC	Dermatite Atópica Canina
DHA	Docosahexaenoic Acid
dL	Deciliter
EFA	Essential Fatty Acids
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
EROS	Espécies Reativas de Oxigênio
FINEP	Financiadora de Estudos e Projetos
g	Grams
GCS-F	Granulocyte Colony Stimulating Factor
GPx	Glutathione Peroxidase
HE	Hematoxilina e Eosina
ICADA	International Committee of Allergic Diseases of Animals
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
ILC	Innate Lymphoid Cells
LB	Linfócito B
MDA	Malondialdeído
mg	Miligrams
NMF	Natural Moisturizing Factor
PF	Pênfigo Foliáceo
PON	Paraoxonase

SC	Stratum Corneum
SID	Semel in Die (uma vez ao dia)
SOD	Superóxido Dismutase
TGF	Transforming Growth Factor
TSLP	Thymic Stromal Lymphopietin
TST	Tiol Sérico Total
U	Unity
µL	Microliter

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	BARREIRA CUTÂNEA E A RESPOSTA IMUNE	19
2.2	MECANISMOS IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS ÀS DERMATOPATIAS	21
2.3	DERMATITE ATÓPICA	22
2.4	DERMATITE ATÓPICA CANINA	25
2.5	O PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA INFLAMAÇÃO CUTÂNEA	26
2.6	O PAPEL DOS LINFÓCITOS NA DERMATITE ATÓPICA CANINA	28
3	JUSTIFICATIVA	30
4	HIPÓTESE CIENTÍFICA	31
5	OBJETIVOS	32
5.1	OBJETIVO GERAL	32
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
6	CAPÍTULO 1 – CADESI-BASED ANALYSIS OF INFLAMMATORY IMMUNE RESPONSE IN CANINE ATOPIC DERMATITIS	33
7	CAPÍTULO 2 – MUPIROCIN PEMPHIGUS-LIKE DRUG REACTION IN DOG – CASE REPORT	52
8	CAPÍTULO 3 – TERAPIA OTOLÓGICA INDUZ IMUNOTOXICIDADE EM CÃO	70
9	CONCLUSÕES	80
10	PERSPECTIVAS	81
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXO	87
	ANEXO A – CERTIFICADO CEUA	88

1 INTRODUÇÃO

As dermatopatias compreendem as patologias de maior prevalência na Clínica de Pequenos Animais. Dentre elas, as dermatopatias imunomediadas apresentam uma alta incidência, gerando lesões inflamatórias que culminam com lesão tecidual (Cardoso et al., 2011). A imunopatogênese dessas doenças, como a Dermatite Atópica Canina (DAC) e as farmacodermias, envolve mecanismos de hipersensibilidade, manifestando-se clinicamente de formas distintas (TIZARD, 2014).

As reações farmacodérmicas são definidas como manifestações adversas em pele, mucosa e anexos, as quais podem estar isoladas ou associadas a outras alterações orgânicas ou sistêmicas. Tais reações também são conhecidas como reações cutâneas medicamentosas, dermatites medicamentosas ou toxidermias (LARSSON, 2002). As dermatites medicamentosas podem gerar alterações estruturais ou funcionais cutâneas através de mecanismos de hipersensibilidade (NAYAK e ACHARJYA, 2008). Os sinais dermatológicos comumente descritos envolvem dermatite esfoliativa, angioedema, eczema, urticária e dermatite vesicobolhosa em resposta a diferentes medicamentos (SILVA e ROSELINO, 2003).

Referente à DAC, seu desenvolvimento está relacionado à interação entre fatores genéticos e ambientais que promovem alterações da barreira cutânea (CORK et al., 2009). Isto facilita a penetração transepidermica de alérgenos, que entram em contato com as células imunológicas presentes na pele desencadeando uma resposta imunológica por linfócitos Th2. Estes, por sua vez, estimulam uma produção elevada de IgE, que ativam os mastócitos estimulando a liberação de mediadores, químicos culminando no processo inflamatório característico da DAC (PASPARAKIS et al., 2014).

Na DAC, o dano tecidual pode ainda ser exacerbado através da produção excessiva de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelas células inflamatórias (NIWA et al., 2003; NAKAI et al., 2009). O excesso de EROs pode levar o organismo a um desequilíbrio entre os agentes oxidantes e antioxidantes, resultando no estresse oxidativo. Este processo pode causar efeitos prejudiciais, tais como, a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas e carboidratos teciduais, agravando, desta forma, a lesão primária (JI & LI, 2016).

Os sinais clínicos observados nesta alergopatia envolvem principalmente lesões cutâneas pruriginosas, eritema, máculas, pápulas, alopecia, escoriações, hiperpigmentação, liquenificação e crostas. Podem ser identificadas também infecções secundárias bacterianas e fúngicas, agravando o quadro lesional. O diagnóstico definitivo baseia-se geralmente na anamnese, sinais clínicos e exclusão de outras dermatopatias pruriginosas (HENSEL et al., 2015). Contudo, o mesmo pode ser dificultado devido à semelhança na sintomatologia, comprometendo a conduta adotada pelo médico veterinário. Ao exame histopatológico, pode-se identificar um padrão de infiltrado perivascular composto por células mononucleadas e neutrófilos. Entretanto, tais achados não são patognomônicos da doença, podendo variar de acordo com o aspecto lesional macroscópico (GROSS et al., 2005).

Diante do exposto, este trabalho propõe avaliar as repercussões clínico-laboratoriais das reações de hipersensibilidade cutânea em cães.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BARREIRA CUTÂNEA E A RESPOSTA IMUNE

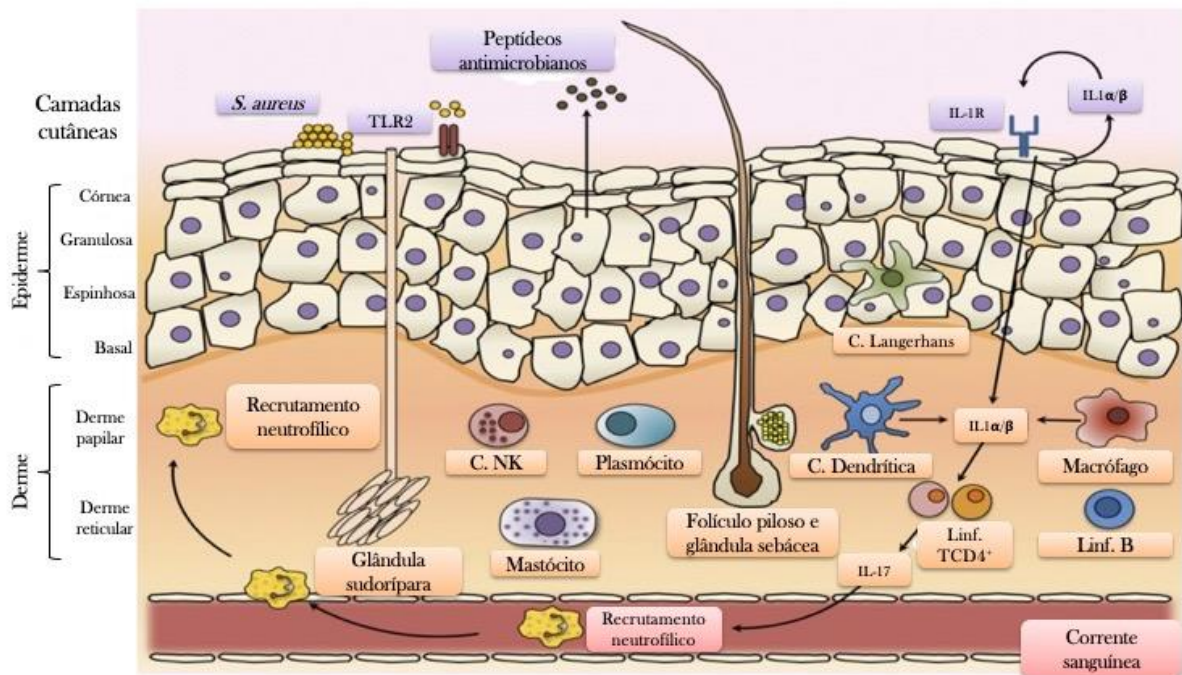
O tegumento ou pele é constituído por três camadas: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme e a derme compreendem os dois principais compartimentos da pele, uma vez que estão diretamente relacionados com a manutenção da homeostase cutânea por meio dos seus constituintes estruturais (NESTLE et al., 2009). A epiderme representa a camada mais externa da pele, compreendendo uma barreira física natural e sítio inicial da resposta imune do hospedeiro aos insultos ambientais e patogênicos (PASPARAKIS et al., 2014). Ela é formada por um epitélio estratificado, constituído por quatro camadas celulares denominadas como estrato basal ou germinativo (camada inferior da epiderme), estrato espinhoso, estrato granuloso, e estrato córneo (camada mais externa). Em cães e gatos, ainda há o estrato lúcido, presente nas regiões mais espessas da pele como coxins e plano nasal (SOUZA, 2009).

Os estratos epidérmicos são formados por células, denominadas queratinócitos, de formato e conteúdo citoplasmático variável em virtude de maturação e diferenciação a partir da região mais basal da epiderme, a fim de formar os estratos subsequentes (CORK et al., 2009). Os queratinócitos vão além de células estruturais, eles atuam também como células sentinelas da pele, assim como as células de Langerhans (CLs) presentes na epiderme, reagindo aos primeiros estímulos antigênicos. Eles produzem peptídeos antimicrobianos (AMPs), quimiocinas e citocinas que modulam a resposta imunológica por meio do recrutamento e ativação de células imunes especializadas da derme, representando, portanto, a primeira linha de defesa contra os microorganismos (NESTLE et al., 2009; PASPARAKIS et al., 2014; CHERMPRAPAI et al., 2018). O estrato córneo, em particular, é constituído por componentes lamelares oriundos da degeneração de queratinócitos, conhecidos por corneócitos. Estes estão firmemente aderidos uns aos outros através de desmossomos modificados, chamados corneodesmossomos, proporcionando resistência à tração e ao dano tecidual por agentes externos (MATSUI & AMAGAI, 2015). Além dessas células, a epiderme também é constituída por melanócitos e linfócitos T CD8⁺ (NESTLE et al., 2009; PASPARAKIS et al., 2014).

A derme é uma camada subjacente à epiderme, separada desta por uma membrana basal. Ela é formada por tecido conjuntivo denso não modelado entremeado por células,

matriz extracelular abundante composta por fibras (colágenas, elásticas e reticulares), vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas e anexos cutâneos (folículos pilosos, glândulas sudoríparas e sebáceas) (SOUZA et al., 2009). Dentre as células residentes e/ou migratórias pela derme, estão células do sistema imune, como células dendríticas (CDs), linfócitos T CD4+ (subpopulações Th1, Th2 e Th17), células NKT, macrófagos, mastócitos e fibroblastos (PASPARAKIS et al., 2014). As CDs dérmicas são ativadas pelas células sentinelas da epiderme e as demais células da derme, via sinalização por citocinas próinflamatórias, promovendo a ativação e diferenciação dos linfócitos T CD4+ a fim de desencadear uma resposta imune para reestabelecer a homeostase cutânea (Fig.1) (LACEY et al., 2016).

Figura 1- Estrutura da pele e células efetoras



Fonte: Adaptada de Lacey et al., 2016.

Além dessas estruturas, a pele apresenta uma microbiota complexa que interage com o sistema imune cutâneo a fim de controlar a colonização por agentes patogênicos oportunistas e modular a resposta imune inata aos micróbios patogênicos. A microbiota cutânea é constituída por microorganismos comensais (tais como Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Bacteroidetes, Fusobacteria e Cianobactérias) (RODRIGUES-HOFFMAN et al., 2014), os quais interagem com células do sistema imune e queratinócitos, estimulando tais células a produzirem peptídeos antimicrobianos (AMPs) de modo a amplificar a resposta

imune inata e a aumentar a resistência à infecção pelos agentes patogênicos bacterianos, fúngicos e virais (GALLO & NAKATSUJI, 2011; CHERMPRAPAI et al., 2018).

Diante disso, vimos que a barreira cutânea é capaz de manter e estabelecer a saúde, logo um desequilíbrio na mesma pode desencadear o aparecimento de patologias, tais como a dermatite atópica. Uma vez que essa dermatopatia é o foco do nosso estudo, abordaremos adiante maiores detalhes acerca da mesma.

2.2 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS ÀS DERMATOPATIAS

Reação de Hipersensibilidade I

O sistema imunológico tem importante papel na defesa do organismo. Entretanto, sua ativação é capaz de causar lesões teciduais, culminando com doenças localizadas ou sistêmicas. As reações de hipersensibilidade do tipo I, também conhecidas como imediatas, são reações patológicas mediadas pela imunoglobulina E (IgE) aderida aos mastócitos. Tal reação é denominada atopia, e os indivíduos afetados são considerados atópicos, produzindo quantidades excessivas de IgE em resposta a antígenos ambientais ou alimentares (GALLI & TSAI, 2012).

A exposição aos antígenos, como proteínas do pólen, alimentos ou medicamentos, resulta na ativação de células Th2. As células Th2, por sua vez, produzem citocinas, como a interleucina-4 (IL-4) e a interleucina-13 (IL-13) desencadeando a síntese de IgE por linfócitos B específicos. A IL-4 também é produzida por mastócitos estimulados, os quais podem alterar o equilíbrio imunológico, induzindo a uma maior produção de células Th2 e liberação de IL-4. Os anticorpos IgE, produzidos em resposta ao alérgeno, ligam-se a receptores na membrana dos mastócitos, sensibilizando tais células (LARCHÉ et al., 2003).

Em indivíduos atópicos, os mastócitos são revestidos por IgE específicos para o antígeno ao qual o animal é alérgico. Essas células podem ser encontradas em todos os tecidos conjuntivos e sua ativação dependerá da linha do local de entrada do alérgeno. Caso um antígeno penetre no tecido e entre em contato com um mastócito sensibilizado, ocorrerá uma ligação cruzada com duas moléculas de IgE, culminando com a liberação dos mediadores mastocitários (GALLI & TSAI, 2012).

A resposta proveniente da ativação dos mastócitos envolve três etapas. A primeira, através da liberação dos conteúdos presentes em seus grânulos, aminas e proteases,

as quais causam dilatação vascular e contração da musculatura lisa, além de dano tecidual. A segunda, através da síntese e secreção de mediadores lipídicos, prostaglandinas e leucotrienos, afetando também a vasculatura e musculatura lisa (SHIMIZU, 2009). A terceira, mediante a produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias e quimiotáticas. As características clínicas e patológicas da hipersensibilidade são diversas e atribuídas aos mediadores liberados por mastócitos em quantidades e tecidos variados, sendo característica principalmente das dermatites trofoalérgica, atópica e alérgica a picada de ectoparasitas, podendo estar relacionada também à dermatite de contato (TIZARD, 2014).

Reação de Hipersensibilidade IV

A reação de hipersensibilidade do tipo IV, também conhecida como tardia, é uma resposta inflamatória de desenvolvimento lento, resultante de interações entre um antígeno, as células apresentadoras de antígenos (APC) e as células T. Tal reação pode ser mediada por linfócitos T CD4+ ou por lise celular através dos linfócitos T CD8+. As primeiras são responsáveis pela secreção de citocinas, as quais estimulam a inflamação local e ativam os macrófagos. Já as segundas são responsáveis pela lise celular direta (PENNINO et al., 2010).

Quando substâncias químicas entram em contato com a pele, ligam-se às proteínas presentes na pele, e os complexos resultantes são processados por células de Langerhans (CL) na derme. Estas migram aos linfonodos drenantes e apresentam o antígeno aos linfócitos T. As CLs secretam grandes quantidades de IL-12 e IL-18, as quais estimulam as células Th1 a produzir Interferon- γ , ativando os linfócitos CD8+. A reação mediada por tais linfócitos é pruriginosa e é característica da dermatite de contato alérgica (ALMOGREN et al., 2013).

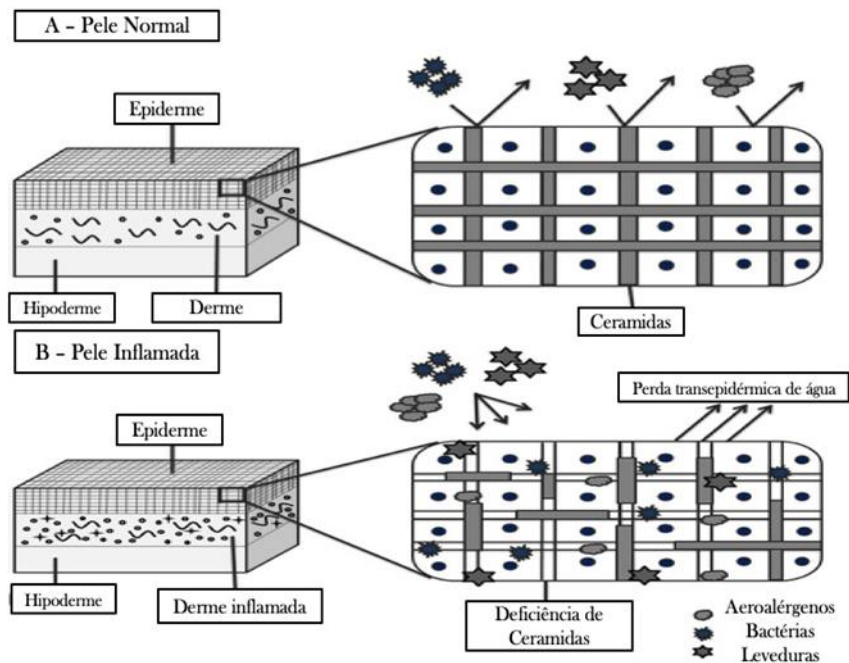
2.3 DERMATITE ATÓPICA

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica e recidivante da pele, altamente pruriginosa e eritematosa. A DA apresenta um caráter multifatorial, podendo estar associada principalmente à predisposição genética, a alterações na barreira epidérmica e/ou a desregulação imunológica (CORK et al., 2009).

Estudos têm evidenciado a importância dos defeitos da barreira epitelial na imunopatogenia da dermatite atópica. A associação entre os fatores genéticos, que correspondem a mutações em genes codificadores de componentes da barreira como a filagrina (VISSER et al., 2013), e ambientais, tais como patógenos, levam a alterações

estruturais da pele, comprometendo a homeostase da barreira cutânea. A integridade e a manutenção dessa homeostase se dão por meio da relação existente entre células epidérmicas (corneócitos unidos por junções intercelulares) (OLIVRY & DUNSTON, 2015), matriz lipídica extracelular composta por ceramidas, colesterol, ácidos graxos e ésteres de colesterol, proteínas estruturais, glicoproteínas e proteases endógenas (CORK et al., 2009). Se há distúrbios em tais componentes, ocorre maior penetração de alérgenos, bactérias e leveduras (Fig.2), induzindo e mantendo o processo inflamatório presente na doença (FERREIRA et al., 2018).

Figura 2- Aspectos estruturais da pele canina com (b) e sem (a) deficiência de ceramidas



Fonte: Adaptada de FERREIRA et al., 2018.

A doença atópica é caracterizada por respostas imunes acentuadas aos alérgenos ambientais, envolvendo elevada concentração de imunoglobulinas E (IgE). Em indivíduos atópicos, os antígenos (Ag), geralmente inócuos, desencadeiam uma reação de hipersensibilidade imediata (hipersensibilidade tipo 1), induzindo uma resposta alérgica cutânea (Fig.3). Após o contato inicial dos alérgenos com a superfície cutânea, células dendríticas e macrófagos os capturam e apresentam às células T naive (Th0), modulando a diferenciação em células Th2, que produz várias citocinas inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13). A IL-4 e a IL-10 potencializam a resposta Th2 já que estimulam a diferenciação em células Th2 e inibem a ativação de células Th1, respectivamente (WEIDINGER et al., 2018). Além disso, IL-4, IL-5 e IL-13 atuam nos linfócitos B (LB) induzindo a secreção de IgE. Uma

reduzida em número de espécies de microorganismos quando comparados a cães saudáveis, facilitando, portanto, o estabelecimento de infecções por bactérias e leveduras patogênicas (RODRIGUES-HOFFMAN et al., 2014).

2.4 DERMATITE ATÓPICA CANINA

A dermatite atópica canina (DAC) é uma das dermatopatias crônicas mais comuns em cães presente na rotina clínica veterinária (HILLIER & GRIFFIN, 2001). A maioria dos cães afetados apresentam idade inferior a três anos (FAVROT et al., 2010), e são das raças West Highland White Terrier, Labrador Retriever, Golden Retriever, Boxer, Cocker Spaniel, Shih Tzu, Bulldog Francês e Pastor Alemão (JAEGER et al., 2010). Não existem evidências de predisposições sexuais para o desenvolvimento da doença (GRIFFIN & DEBOER, 2001).

A principal manifestação clínica é o prurido, o qual precede os demais sinais clínicos. Os pontos corpóreos comumente afetados são extremidades distais e áreas de flexuras dos membros, face, ventre e orelhas (FAVROT et al., 2010). Associado ao prurido, os cães atópicos podem apresentar uma variedade de lesões, como eritema, alopecia, escoriações, hiperpigmentação e lignificação. Infecções bacterianas, mais comumente por *Staphylococcus pseudintermedius*, e fúngicas são comuns na doença (GRIFFIN & DEBOER, 2001), visto que a falha na barreira epidérmica favorece a proliferação exacerbada de microorganismos residentes no tegumento. Estas infecções resultam em uma exacerbação de lesões cutâneas com desenvolvimento de pápulas, pústulas e crostas (RODRIGUES-HOFFMAN et al., 2014).

A avaliação clínica do cão com prurido requer uma abordagem sequencial, a qual pode conduzir ao diagnóstico definitivo. Diagnósticos diferenciais, variando de ectoparasitas a neoplasias, devem ser excluídos a partir de dados da anamnese, achados clínicos e laboratoriais (HENSEL et al., 2015). O primeiro passo envolve a eliminação de pulgas e carrapatos, as quais podem estar provocando o processo alérgico (BRUET et al., 2012). Além disso, deve-se atentar para outros possíveis ectoparasitas, como alguns ácaros, os quais podem estar desencadeando o prurido (MILLER & GRIFFIN, 2013). A etapa seguinte envolve a restrição alimentar, onde deve haver a troca da fonte proteica da dieta por, no mínimo, oito semanas (RADITIC et al., 2011). Caso o prurido ainda esteja presente, mesmo após a conclusão de todas as etapas, pode-se considerar a possibilidade de dermatite atópica canina (HENSEL et al., 2015).

O exame histopatológico é considerado uma das ferramentas mais importantes na dermatologia (DUNSTAN, 1990). Em alguns casos, tal exame pode ser definitivo ou, no mínimo, auxiliar o clínico a reduzir a lista dos possíveis diagnósticos diferenciais (CONCEIÇÃO et al., 2004). Contudo, tem seu uso limitado no diagnóstico de doenças alérgicas, devido à ausência de lesões patognomônicas (CARLOTTI et al., 1990). As primeiras alterações descritas foram hiperplasia de epiderme, ortoqueratose e paraqueratose, espongiose e exocitose leucocítica. No mesmo estudo, foram ainda relatados aumento do número de mastócitos, e eosinófilos foram detectados em apenas 15% dos casos (SCOTT, 1981). As alterações em derme visualizadas em outro estudo envolviam infiltrado perivascular misto, composto de células T, dendríticas, eosinófilos e mastócitos (OLIVRY & HILL, 2001). Os estudos histopatológicos recentes de DAC geralmente avaliam uma fase tardia de reação inflamatória, caracterizada por padrão inflamatório perivascular mononuclear, além de neutrófilos e eosinófilos (FERREIRA et al., 2017).

A terapêutica da DA envolve a combinação de vários tratamentos uma vez que se trata de uma patologia de etiologia multifatorial, ainda a esclarecer completamente, e patogenia complexa. O tratamento envolve primeiramente a eliminação do agente causador da reação alérgica tais como alérgenos ambientais (especialmente ácaros domésticos e pólen), alguns compostos alimentares e picadas de pulgas e/ou insetos. Nesse contexto podem ser utilizados no controle, por exemplo, restrição dietética e antiparasitários sistêmicos orais (antipulgas) (OLIVRY et al., 2015). Então, realiza-se o controle do prurido e lesões cutâneas por meio de banho com shampoos suaves e não irritantes, e intervenções com glicocorticóides orais (TASZKUN, 2010) ou oclacitinib (GADEYNE et al., 2014; LITTLE et al., 2015). Em casos de infecções também devem ser utilizados antimicrobianos tópicos e / ou sistêmicos (antibióticos e/ou antifúngicos) (OLIVRY et al., 2015). Além disso, podem ser incluídos na terapêutica dos casos crônicos o uso de suplemento dietético, como ácidos graxos essenciais (AGEs), rico em ômega 6 (POPA et al., 2011) e vitamina E (PLEVNIK KAPUN et al., 2014), imunomoduladores como o interferon gamma recombinante canino (YASUKAWA et al., 2010) e implementação de imunoterapia específica ou inespecífica (DEBOER & MORRIS, 2012; MARSELLA et al., 2013; HOBI & MUELLER, 2014).

2.5 O PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA INFLAMAÇÃO CUTÂNEA

O estresse oxidativo é definido como a formação de substâncias oxidantes celulares as quais, de forma aguda ou crônica, excedem a capacidade antioxidante total (JI &

LI, 2016). Esse fenômeno está intimamente relacionado aos processos inflamatórios, estando envolvido com a imunopatogenia de dermatopatias alérgicas (ALMELA et al., 2018). O estresse oxidativo está descrito como fator promotor da inflamação tecidual através da regulação de fatores de transcrição que codificam citocinas pró-inflamatórias. A ativação de células inflamatórias, por sua vez, induz à produção de radicais livres, gerando um ciclo lesional que, potencialmente, contribui com a imunopatogenia da DAC (JI & LI, 2016).

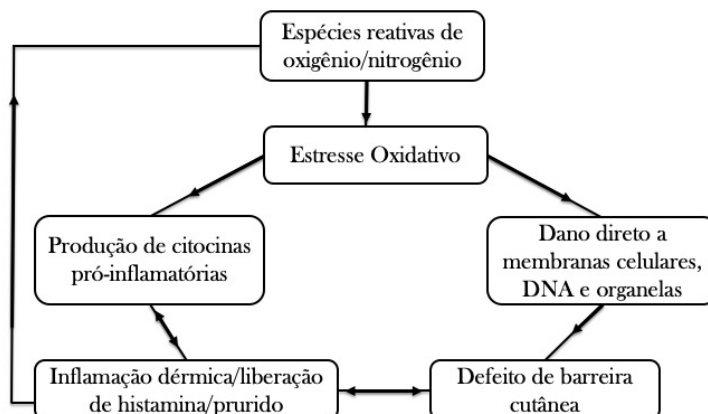
Os radicais livres denominados espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERN), são produzidos devido aos diferentes processos fisiológicos naturais do organismo, tais como a fagocitose, imunidade celular, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas, e em decorrência de disfunções biológicas ou patológicas (OLIVEIRA & SCHOFFEN, 2010). A síntese desses radicais ocorre no interior de mitocôndrias, por meio da cadeia transportadora de elétrons durante o processo de respiração celular aeróbio, e nas membranas celulares, através das enzimas NADPH oxidases presentes que promovem transferência de elétrons (BARREIROS et al., 2006; BARBOSA et al., 2010).

A produção excessiva de EROs para a eliminação de agentes patogênicos deve ser controlada pelo organismo, caso contrário leva à lesão tecidual. Dentre esses efeitos prejudiciais destaca-se o dano a biomoléculas (proteínas, lipídeos e carboidratos) presentes em estruturas importantes como o DNA, membranas celulares, dentre outras. A ação sobre a molécula de DNA pode resultar em mutação e produção de enzimas biológicas afunacionais (BARREIROS et al., 2006; BARBOSA et al., 2010). No microambiente cutâneo, tais alterações podem gerar disfunções na barreira epidérmica, as quais contribuem na manutenção do quadro inflamatório cutâneo de pacientes com dermatite atópica (Fig. 4) (JI & LI, 2016).

Referente aos fosfolipídios de membranas, a peroxidação lipídica leva ao comprometimento dos transportes celulares ou ruptura e morte celular. Esse aumento na concentração de radicais livres é controlado por meio do sistema antioxidante do organismo compreendido por antioxidantes enzimáticos, como a glutatona peroxidase (GPx), catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD), e não-enzimáticos, como bilirrubina, ácido úrico e vitaminas A, E e C (Fig. 3A) (BARREIROS et al., 2006; BARBOSA et al., 2010). Os antioxidantes atuam no controle da produção e ação dos radicais livres bem como no reparo de estruturas biológicas danificadas, sendo utilizados biomarcadores do estresse oxidativo (PLEVNIK-KAPUN et al., 2012). Além desses, parâmetros como Tiol Sérico Total (TST) e

Paraoxonase-1 (PON-1) podem ser utilizados como avaliação de desbalanço oxidativo em cães com dermatite atópica (ALMELA et al., 2018).

Figura 4- Relação entre estresse oxidativo, defeito de barreira cutânea e inflamação dérmica na dermatite atópica



Fonte: Adaptada de Ji & Li, 2016.

Em seres humanos, várias evidências revelam o envolvimento do estresse oxidativo na dermatite atópica, demonstrando uma diminuição dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, bem como aumento da peroxidação lipídica indicada pelo MDA nessa patologia (NIWA et al., 2003 ; NAKAI et al., 2009; SIVARANJANI et al., 2013). Contudo, na DAC os dados ainda são limitados, sendo relatado um aumento nos níveis de Malondialdeído (MDA) em cães com DA, estando o mesmo correlacionado de forma positiva com o grau lesional dos pacientes (PLEVNIK KAPUN et al., 2012). Em estudos recentes, foi demonstrado aumento na concentração de biomarcadores como TST e PON-1 em cães com DAC (ALMELA et al., 2018), sendo possível que tais animais se beneficiem de terapias antioxidantes para o controle da inflamação presente na atopia canina.

2.6 O PAPEL DOS LINFÓCITOS NA DERMATITE ATÓPICA CANINA

O desenvolvimento das reações de hipersensibilidade, estando a DAC entre tais patologias, envolve uma interação complexa entre ambiente, fatores genéticos e componentes celulares. Essa relação culmina na ativação de linfócitos T e B, sendo sua função dependente do microambiente e perfil de citocinas no local (PUCHEU-HASTON et al., 2015).

Na pele saudável, os linfócitos estão presentes em baixa quantidade tanto em derme quanto em epiderme, sendo o fenótipo linfocítico dependente de sua localização. Contudo, na pele de cães atópicos, há maior concentração tanto de células T CD4+ quanto

células T CD8+ (SINKE et al., 1997). Dentre as subpopulações de linfócitos T auxiliares, cita-se a participação de células Th1, Th2 e Th17 na manutenção do quadro inflamatório cutâneo presente em pacientes atópicos (WEIDINGER et al., 2018). Além de tais células, os linfócitos T regulatórios vêm sendo alvo de estudos, na tentativa de estabelecer seu papel no controle da inflamação presente na doença alérgica (LEE et al., 2014).

Os linfócitos T regulatórios são células providas de marcadores CD4+CD25+, além de expressarem o fator de transcrição Foxp3, exercendo papel anti-inflamatório nas diferentes doenças imunomediadas e autoimunes, através da secreção de fator transformador de crescimento β (TGF- β) e interleucina 10 (IL-10) (WALECKI et al., 2015; QIU et al., 2018). Tais citocinas, em conjunto, são capazes de regular a ativação e proliferação de células do sistema imune, além de estimular a síntese de colágeno e angiogênese tecidual (AKDIS, 2006).

Em cães atópicos, foi demonstrado recentemente a dinâmica sistêmica dessas células onde, em animais sensibilizados com ácido da poeira doméstica, há um aumento na subpopulação dos linfócitos T regulatórios. Entretanto, esse aumento não foi suficiente para controlar de forma eficiente a inflamação presente na doença (ROSTASHER et al., 2018), sendo necessários estudos adicionais a fim de esclarecer seu papel anti-inflamatório na DAC.

3 JUSTIFICATIVA

As reações de hipersensibilidade estão relacionadas a diversas patologias dermatológicas na clínica médica de cães. Nesse sentido, torna-se importante a discussão de casos clínicos, de modo a abordar os mecanismos imunopatogênicos de acordo com a lesão cutânea do animal. Além disso, dentre as doenças relacionadas às desordens de hipersensibilidade, destaca-se a Dermatite Atópica Canina. Tal doença possui uma imunopatogenia complexa, sendo necessários estudos a fim de auxiliar o entendimento da dinâmica celular envolvida nessa patologia.

4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

As reações de hipersensibilidade cutânea interferem na homeostase tecidual e sistêmica por meio da manutenção do estado inflamatório.

5 OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as repercussões clínico-laboratoriais das reações de hipersensibilidade cutânea em cães.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A) Avaliar a resposta imuno-inflamatória sistêmica e tecidual em cães com Dermatite Atópica.
- B) Relatar casos clínicos envolvendo mecanismos de hipersensibilidade em lesões cutâneas de cães.

**6 CAPÍTULO 1 – CADESI-BASED ANALYSIS OF INFLAMMATORY IMMUNE
RESPONSE IN CANINE ATOPIC DERMATITIS**

Artigo submetido no periódico *Veterinary Immunology and Immunopathology*

(B1 – Qualis antigo / A2 – Qualis novo)

CADESI-based analysis of inflammatory immune response in canine atopic dermatitis

Author names and affiliations.

Tiago Cunha Ferreira^a, Juliana Furtado Lima-Verde^a, José Alexandre da Silva Júnior^a, Társsila Mara Vieira Ferreira^a, Daniel de Araújo Viana^b, Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro^a

^aPrograma de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, CEP: 60.714-903, Fortaleza, Ceara, Brazil.

^bLaboratório Pathovet – Anatomia Patológica e Patologia Clínica Veterinária, Rua 24 de Maio, 1441, Benfica, CEP: 60.020-001, Fortaleza, Ceara, Brazil.

Corresponding author

Corresponding author at: Av. Dr. Silas Munguba, 1700 – Campus do Itaperi; CEP: 60.714-903, Fortaleza, Ceara, Brazil.

E-mail addresses

E-mail addresses: tiagocf.mv@hotmail.com (Ferreira, T.C.), juflimaverde@hotmail.com (Lima-Verde, J.F.), alexandre36000@gmail.com (Junior, J.A.S.), tassi_mara@hotmail.com (Ferreira, T.M.V.), viana.daniel78@gmail.com (Viana, D.A.), diana.pinheiro@uece.br (Nunes-Pinheiro, D.C.S.).

Highlights

- 1 - Tissue inflammation in atopic dogs influences systemic hemato-biochemical parameters.
- 2 - Atopic dogs with clinical signs in remission still have tissue inflammatory response.
- 3 - Atopic dogs in lesion remission or discrete lesions do not present systemic oxidative imbalance.

Abstract

Canine atopic dermatitis (CAD) is an inflammatory, pruritic and chronic disease, with a multifactorial character associated with epidermal dysfunctions and immune system dysregulation. The disease chronicity is related to oxidative imbalance which may perpetuate inflammation process. In this sense, the aim of the present study was to evaluate the integumentary and systemic inflammatory response in dogs with atopic dermatitis. CADESI-based clinical analysis allowed the dogs to be divided into three groups: AI, with CADESI between 0-10, AII, with CADESI between 10-34, and control group. Atopic dogs had lower systemic eosinophil counts ($p < 0.05$), as well as a tendency to higher neutrophil counts and neutrophil/lymphocyte ratio. The albumin value was higher in group AI when compared to AII and control ($p < 0.05$), while MDA dosage did not differ between groups. The histopathological evaluation of groups AI and AII showed epidermal alterations and perivascular inflammatory infiltrate characterized by neutrophils, macrophages, lymphocytes, eosinophils and mast cells. Regarding tissue cell count, it was possible to observe a larger number of mast cells in AI and AII groups than in control group ($p < 0.05$). Based on this, it is concluded that there was an increase in tissue and systemic inflammatory response in CAD. However, this process was not able to interfere in oxidative balance of evaluated dogs, being

necessary studies with animals with higher lesion degree, in order to provide a better understanding about immunopathogenesis of CAD.

Keywords: Sistemic Inflammation; mast cells; allergic skin disease.

Introduction

Canine atopic dermatitis (CAD) is a chronic, pruritic and inflammatory skin disease. CAD has a multifactorial etiology and may be mainly associated with genetic predisposition, changes in epidermal barrier and immune dysregulation, creating an inflammatory process that culminates with tissue injury (Cork et al., 2009; Santoro et al., 2015; Weidinger et al., 2018).

The main clinical manifestation of CAD is pruritus, which precedes other clinical signs, affecting distal extremities and flexure areas of limbs, face, womb and ears (Favrot et al., 2010). Associated with itching, atopic dogs can present a variety of lesions such as erythema, alopecia, abrasions, hyperpigmentation and lignification. Bacterial infections, most commonly by *Staphylococcus pseudointermedius*, and fungal infections are common in CAD (Griffin and DeBoer, 2001), since epidermal barrier failure favors the overgrowth of microorganisms residing in the integument. These infections result in an exacerbation of skin lesions with development of papules, pustules and collars, contributing with inflammatory process maintenance (Rodrigues-Hoffman et al., 2014).

Persistent inflammation in allergic processes is closely related to oxidative imbalance, because there is an exacerbated synthesis of oxidizing substances which, acutely or chronically, exceed the total antioxidant capacity (Ji & Li, 2016; Almela et al., 2018).

Oxidative stress is described as a promoting factor of tissue inflammation by regulating transcription factors that encode proinflammatory cytokines. The activation of inflammatory cells, in turn, induces the production of free radicals, generating a lesion process that potentially contributes to immunopathogenesis of CAD (Ji & Li, 2016). To assess tissue damage in CAD, a clinical measurement of the integumentary inflammatory process was proposed, based on the analysis of lesion patterns (Olivry et al., 2014). Thus, it was possible to divide atopic dogs according to lesion intensity, favoring the homogenization of groups to evaluate hematological, biochemical and histological parameters. In this sense, the aim of the present study was to evaluate the tissue and systemic inflammatory response according to skin lesion grade of dogs with atopic dermatitis.

Material and Methods

The experimental protocol was approved by the Committee of Ethics and Animal Experimentation (CEUA) of Universidade Estadual do Ceará under protocol number 9140016/2018. Ten dogs diagnosed with canine atopic dermatitis and five healthy dogs from Ceara Fire Department, without any clinical alteration were submitted to physical examination, hematological and biochemical analysis and biopsy followed by histopathological analysis. All the tutors signed an agreement, authorizing the animals' participation in experiment.

Evaluated Population

Fifteen dogs of different breeds from the Metropolitan Region of Fortaleza, ranging in age from 01 to 08 years, were included in the study. The dogs in experimental group (N=10)

have history and clinical signs compatible with CAD (Favrot et al., 2010), in addition to being submitted to exclusion of other pruritic dermatopathies. The control group (N=5) was consisted of dogs from Ceara Fire Department, and presented clinical and pathological evaluation within normal range for the species.

The experimental group was further clinically evaluated according to the criteria established by the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). These criteria use lesion parameters at specific anatomical sites (Canine Atopic Dermatitis Severity Index 4 - CADESI IV), allowing the classification of the disease in: CAD in remission: up to 10; Discrete CAD: between 10-34; Moderate CAD: between 35-59; Severe CAD: between 60-180 (Olivry et al., 2014).

Inflammatory Parameters

Blood samples were collected by jugular venipuncture and stored in EDTA and non-anticoagulant tubes for evaluation of systemic inflammatory parameters such as neutrophil, lymphocyte and eosinophil count, neutrophil/lymphocyte ratio, serum albumin and malondialdehyde (MDA).

Oxidative Stress

To evaluate lipid peroxidation, serum malondialdehyde (MDA) analysis was performed, where 250 μL of serum was added to 400 μL of perchloric acid (35%) and taken to water bath (37°C, 01 hour). The mixture was centrifuged (1400 g; 10 minutes) and 600 μL of the supernatant was added to 200 μL of 1.2% thiobarbituric acid. This mixture was taken to water bath (95°C, 30 minutes). After cooling, the reading was performed in a

spectrophotometer (535 nm). The results obtained were expressed as nmol/mL (Draper & Hadley, 1990).

Tissue Sampling

For histopathological analysis, skin fragments were collected a 5mm punch. Skin biopsy of control animals was also performed from the same regions. The samples were fixed in 10% buffered formalin and further processed by conventional histological techniques. Histological sections were stained with Hematoxylin and Eosin (HE) for analysis of histological changes and Toluidine Blue for mast cell evaluation. Qualitative evaluation of morphological and morphometric parameters was performed, such as epidermal and dermal structural aspects and cellular infiltrate. For mast cell infiltrate evaluation, a quantitative analysis was performed in 10 different fields. The analyzes were performed under light microscope with magnification of 200x and 400x, according to the average subjective perception of two observers.

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with the aid of PRISM 8.0 software package (Prism Software, Irvine, CA, USA). Student's t-test was used to evaluate differences in values determined between control and atopic groups. In all cases, differences were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Clinical Parameters

The clinical evaluation of dogs was based on CADESI-IV, providing lesion scores according to the following alterations: erythema, lignification and excoriation/alopecia. Subsequently, dogs with atopic dermatitis were divided into two groups: Atopy I (AI), dogs with CADESI between 0-10, and Atopy II (AII), dogs with CADESI between 10-34.

Systemic Inflammatory Parameters

The evaluation of systemic inflammation was based on parameters of leukogram, albumin and MDA (Table 1). There was a tendency to increase in neutrophil count as well as in neutrophil/lymphocyte ratio in group AII when compared to groups AI and control. The eosinophil count was higher in control group when compared to AI and AII.

Regarding biochemical evaluations (Table 1), group A1 presented higher albumin concentration than control and AII groups, while serum MDA levels did not vary between groups.

Histopathological Analysis

Epidermal alterations and dermal inflammatory infiltrate were observed in groups AI and AII, whose data are described in tables 2 and 3. Atopic animals presented acanthosis, hydropic degeneration, spongiosis, exocytosis and orthokeratosis in epidermal layer (Fig. 1B and 1C). In these dogs, the perivascular inflammatory infiltrate was characterized by neutrophils, eosinophils, lymphocytes, macrophages, and mast cells (Fig. 1E, 1F, 1H, and 1I).

Regarding to mast cells quantification, an increase of these cells was observed infiltrating the dermis of atopic dogs when compared to control group ($p < 0.05$) (Table 3). The difference between groups AI and AII, however, was not observed.

Discussion

Canine atopic dermatitis is an inflammatory skin disease that involves a complex immunopathological mechanism (Santoro et al., 2015). This disease presents clinically in different ways, requiring an individual approach according to lesion degree. In the present study, the histopathological and hemato-biochemical parameters of dogs with CAD were evaluated based on skin lesions intensity. This is the first work to describe such parameters according to CADESI. However, other studies have already been performed correlating CADESI with blood parameters and lymphocytic phenotype of dogs with atopic dermatitis (Martins et al., 2018).

In this study it was possible to evaluate the systemic and tissue leukocyte dynamics in CAD. At systemic level, there was an increase in circulating neutrophil count in group AII, as well as an increase in neutrophil/lymphocyte ratio. At tissue level, it was observed a neutrophil accumulation in perivascular inflammatory infiltrate, and sometimes the migration of these cells towards the epidermis (Fig. 1C). These data represent the maintenance of a proinflammatory state in these animals that may be related to increased tissue demand. Skin inflammation induces the production of chemotactic molecules such as CXCL1, CXCL2 and granulocyte colony stimulating factor (GCS-F), which, together with vascular adhesion molecules (Oh et al., 2019), contribute to neutrophil outflow from blood vessel toward the affected tissue (Sadik et al., 2011).

In atopic dermatitis, the skin barrier breakdown occurs due to lipoprotein changes in epidermis, which favor the penetration of environmental allergens and commensal microorganisms (Santoro et al., 2015). These antigens induce a tissue inflammatory response, with the participation of innate lymphoid cells-2 (ILC2) and Th2 cells with consequent production of proinflammatory cytokines such as IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13, culminating in IgE synthesis, mast cell degranulation and eosinophil migration to the inflammatory site (Weidinger et al., 2018). This immunological mechanism favors the mobilization of mast cells and eosinophils in groups AI and AII, which can be visualized in histological findings (Fig. 1F and 1I), with reduction of circulating eosinophils (Table 1).

Eosinophils are effector cells of innate and adaptive immunities, exerting their function by activating and releasing substances present in their cytoplasmic granules (Amber et al., 2018a). Eosinophilic migration to the inflammatory site is mediated by eotaxins, whose synthesis is induced by Th2 cytokines, such as IL-4 and IL-13 (Ahmadi et al., 2016; Sastre et al., 2018), and is further influenced by Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP), an epithelial cytokine involved in immunopathogenesis of atopic dermatitis (Wong et al., 2010). When combined, such cytokines regulate the expression of adhesion molecules, facilitating the arrival of eosinophils at the inflammatory site (Wong et al., 2010; Wilson et al., 2013). The presence of these cells favors the maintenance of inflammation in local microenvironment, cellular signaling and consequent tissue destruction (Amber et al., 2018a; Amber et al., 2018b). The persistence of the process affects the skin, resulting in thickening, hydropic degeneration and intercellular edema (Naidoo et al., 2018), parameters observed in this study (Fig. 1C).

The maintenance of the inflammatory state also induces the production of oxidizing substances, which possibly exceed the total antioxidant capacity, generating a situation of oxidative stress (Ji & Li, 2016). This imbalance can be assessed directly or indirectly by

measuring lipid peroxidation products such as malondialdehyde (MDA) and acute phase proteins such as albumin (Kann et al., 2012). Serum albumin levels differed between groups, being reduced in groups AII and control. Serum albumin is considered to have anti-inflammatory and immunomodulatory activity (Kinoshita et al., 2017). Therefore, when there is a systemic inflammatory response, there is a reduction in its concentration, favoring the lesion, as observed in AII. The lesion, however, did not exceed total antioxidant capacity, as shown by MDA values (Table 1). Lower values of systemic albumin observed in control group may be associated with dietary pattern and activity, since they were free of integumentary and systemic pathologies.

Regarding atopic animals, the division of groups based on CADESI allowed to evaluate the progression of the systemic inflammatory process according to the cutaneous lesion degree. It is noteworthy that the AI group, even in clinical remission, presented tissue inflammatory alteration, which is related to the permanence of antigenic stimulus. In this context, a combination of drug and environmental control should be performed, since this last can trigger the emergence of itching crises (Harvey et al., 2019).

When taken together, the presented data demonstrate an increase in systemic and tissue inflammatory response in dogs with atopic dermatitis. The inflammation, however, did not interfere in oxidative balance of the organism, being necessary studies involving animals with higher lesion degree to evaluate the repercussion of tissue inflammation in the return to homeostasis. Among the limitations of the study, we highlight the number of dogs, given the difficulty of meeting the inclusion criteria. However, this is the first clinical study to evaluate inflammatory parameters in CAD according to CADESI, providing relevant data for disease follow-up and monitoring.

Acknowledgements

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP).

References

Ahmadi Z., Hassanshahi G., Khorramdelazad H., Zainodini, N., Koochakzadeh, L., 2016. An overlook to the characteristics and roles played by eotaxin network in the pathophysiology of food allergies: allergic asthma and atopic dermatitis. *Inflammation* 39, 1253-1267.

Almela, R.M., Rubio, C.P., Ceron, J.J., Anson, A., Tichy, A., Mayer, U., 2018. Selected serum oxidative stress biomarkers in dogs with non-food-induced and food-induced atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 29, 229-e82.

Amber K.T., Chernyavsky A., Agnoletti A.F., Cozzani, E., Grando, S.A., 2018a. Mechanisms of pathogenic effects of eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin on human keratinocytes. *Exp. Dermatol.* 27, 1322-1327.

Amber K.T., Valdebran M., Kridin K., Grando, S.A., 2018b. The role of eosinophils in bullous pemphigoid: a developing model of eosinophil pathogenicity in mucocutaneous disease. *Front. Med.* 5, 201.

Cork, M.J., Danby, S.G., Vasilopoulos, Y., Hadgraft, J., Lane, M.E., Moustafa, M., Guy, R.H., Macgowan, A.L., Tazi-Ahnini, R., Ward, S.J., 2009. Epidermal Barrier Dysfunction in Canine Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 129, 1892-1908.

Draper, H. H., Hadley, M., 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186, 421-431.

Favrot, C.; Steffan, J.; Seewald, W.; Picco, F., 2010. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet. Dermatol.* 21, 23-31.

Griffin, C.E., DeBoer, D.J., 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 255–269.

Harvey, N.D., Shaw, S.C., Craigson, P.J., Blott, S.C., England, G.C.W., 2019. Environmental risk factors for canine atopic dermatitis: a retrospective large-scale study in Labrador and golden retrievers. doi.org/10.1111/vde.12782

Ji, H., Li, X.K., 2016. Oxidative Stress in Atopic Dermatitis. *Oxid. Med. Cell. Longevity.* 2016, 1-8.

Kann, R.K.C., Seddon, J.M., Henning, J., Meers, J., 2012. Acute phase proteins in healthy and sick cats. *Res. Vet. Sci.* 93, 649-654.

Kinoshita H., Watanabe K., Azma T., Feng, G.G., Akahori, T., Hayashi, H., Sato, M., Fujiwara, Y., Wakatsuki, A., 2017. Human serum albumin and oxidative stress in preeclamptic women and the mechanism of albumin for stress reduction. *Heliyon*. 3(8), e00369.

Martins, G.D.C., de Oliveira Melo Junior, O.A., Botoni, L.S., Nogueira, M.M., da Costa Val, A.P., Blanco, B.S., Dutra, W.O., Giunchetti, R.C., Melo, M.M., da Silveira Lemos, D., 2018. Clinical-Pathological and immunological biomarkers in dogs with atopic dermatitis. *Vet. Immun. Immunopathol*. 205, 58-64.

Meyer, D.J., Harvey, J.W., 2004. *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation & Diagnosis*, 2nd ed. Saunders, Philadelphia 351p.

Naidoo, K., Jagot, F., van den Elsen, L., Pellefigues, C., Jones, A., Luo, H., Johnston, K., Painter, G., Roediger, B., Lee, J., Weninger, W., Le Gros, G., Forbesblom, E., 2018. Eosinophils Determine Dermal Thickening and Water Loss in an MC903 Model of Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol*. 138, 2606-2616.

Oh, M.S., Hong, J.Y., Kim, M.N., Kwak, E.J., Kim, S.Y., Kim, E.G., Lee, K.E., Kim, Y.S., Jee, H.M., Kim, S.H., Sol, I.S., Park, C.O., Kim, K.W., Sohn, M.H., 2019. Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule Modulates Th2 Immune Response in Atopic Dermatitis. 11, 677-690.

Olivry, T., Saridomichelakis, M., Nuttall, T., Bensignor, E., Griffin, C.E., Hill, P.B., 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. *Vet. Dermatol.* 25, 77-e25.

Rodrigues-Hoffmann, A., Patterson, A.P., Diesel, A., Lawhon, S. D., Ly H.J., Stephenson, C.E., Mansell, J., Steiner, J. M., Dowd, S. E., Olivry, T., Suchodolski, J.S., 2014. The Skin Microbiome in Healthy and Allergic Dogs. *Plos one.* 9, e83197.

Sadik, C.D., Kim, N.D., Luster, A.D., 2011. Neutrophils cascading their way to inflammation. *Trends Immunol.* 32, 452-460.

Santoro, D., Pucheu-Haston, C.M., Eisenschenk, M.N., Marsella, R., Nuttall, T., Bizikova, P., 2015. Review: pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host-micro-organism interaction. *Vet. Dermatol.* 26, 84-e25.

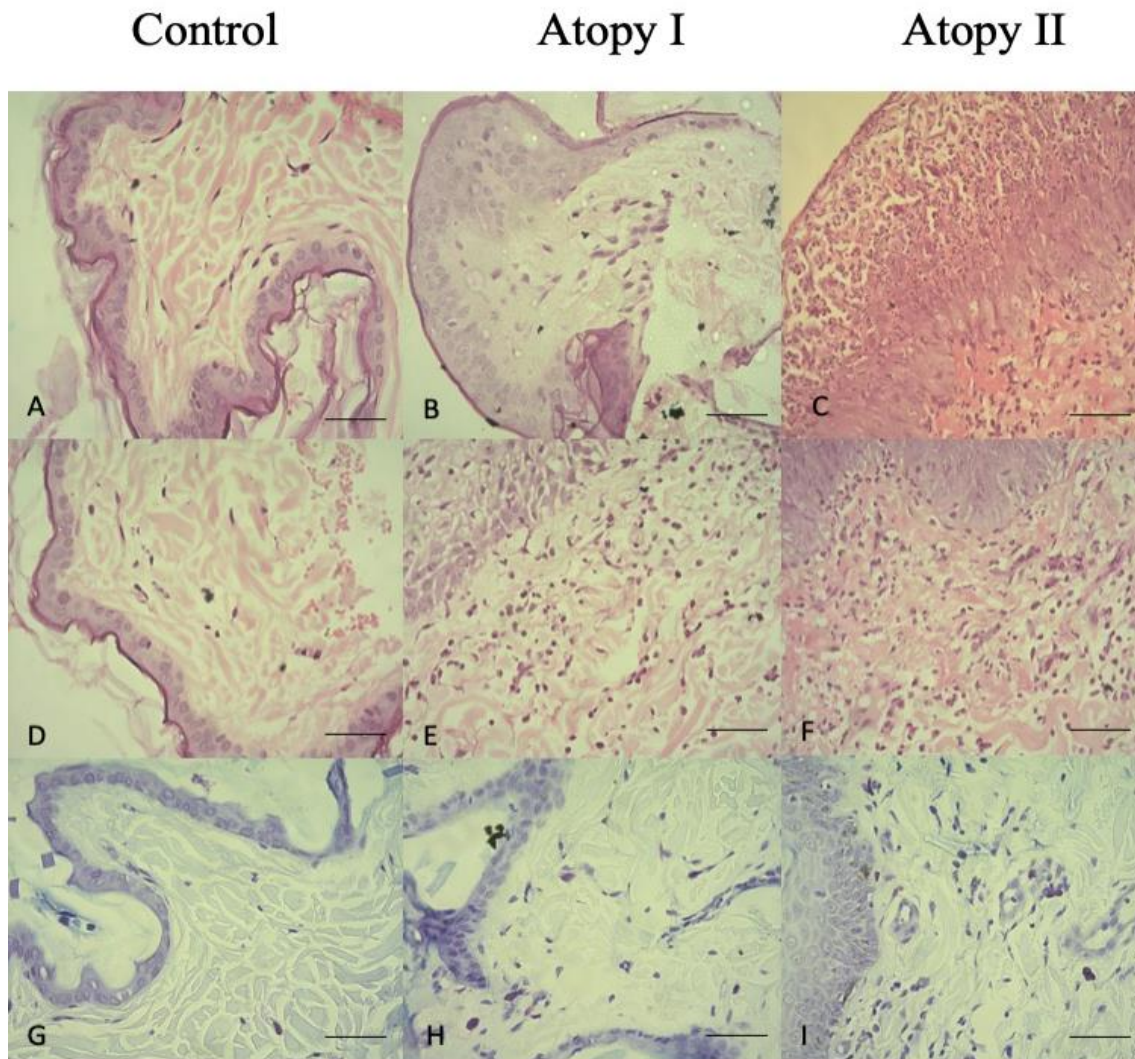
Sastre B., Rodrigo-Muñoz J.M., Garcia-Sanchez, D.A., Cañas, J.A., Del Pozo, V., 2018. Eosinophils: old players in a new game. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.* 28, 289-304.

Weidinger, S., Beck, L.A., Bieber, T., Kabashima, K., Irvine, A.D., 2018. Atopic Dermatitis. *Nat. Rev. Dis. Primers.* 4, 1-20.

Wilson, S.R., The, L., Batia L.M., Beattie K., Katibah G.E., McClain, S.P., Pellegrino, M., Estandian, D.M., Bautista, D.M., 2013. The epithelial cell- derived atopic dermatitis cytokine TSLP activates neurons to induce itch. *Cell*. 155, 285-295.

Wong C.K., Hu S., Cheung P.F.Y., Lam C.W., 2009. Thymic Stromal Lymphopoietin induces chemotactic and prosurvival effects in eosinophils: implications in allergic inflammation. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 43, 305-315.

Fig. 1. Histopathological aspects of dogs with CAD. (A) and (D) represent the control group (H&E), which shows no visible dermal and epidermal changes. In (B) it is possible to observe the epidermal layer thickening (H&E). In (C) there is epidermal thickening, hydropic degeneration of keratinocytes, as well as neutrophilic exocytosis (H&E). (E) and (F) highlight the presence of inflammatory infiltrate in dermis of atopic dogs (H&E). In (H) and (I) it is possible to observe mast cells composing the dermal inflammatory cells of atopic dogs, while (G) represents the control group, with a reduced number of these cells (Toluidine Blue). Scale bar: 1 μ m. Original magnification: 400x.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Table 1- Hematological, biochemical and clinical assessment parameters in control and atopic dogs.

Hematolo-Biochemical Parameters	Control	Atopy I	Atopy II
Neutrophils ($10^3/\mu\text{L}$)	6.88 ± 0.96	6.39 ± 0.89	7.91 ± 2.99
Lymphocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	1.88 ± 0.81	1.25 ± 0.16	1.57 ± 0.83
Neu/Lym Ratio	4.17 ± 1.6	5.18 ± 1.1	5.96 ± 3.1
Eosinophils ($10^3/\mu\text{L}$)	817.2 ± 98.4^a	216.2 ± 126.9^b	366.2 ± 216.1^b
Albumin (g/dL)	2.62 ± 0.1^a	3.54 ± 0.3^b	3.08 ± 0.3^c
Total Protein (g/dL)	7.04 ± 0.2	7.94 ± 0.4	7.12 ± 0.9
MDA (nmol/mL)	0.86 ± 0.09	0.87 ± 0.08	0.91 ± 0.15
CADESI-IV		7.6 ± 1.5^a	29.6 ± 10.8^b

Results are expressed as the mean \pm standard deviation. Different letters shows statistically significant differences ($p \leq 0.05$) among control and atopic groups.

Table 2- Epidermal changes in control and atopic dogs.

Epidermal Alterations	Control	Atopy I	Atopy II
Acanthosis	0%	40%	60%
Hydropic Degeneration	0%	40%	40%
Spongiosis	0%	40%	20%
Exocytosis	0%	0%	20%
Parakeratosis	0%	0%	0%
Orthokeratosis	0%	40%	20%

Results are expressed as percentages. Control group does not have alterations in epidermis.

Table 3- Inflammatory cells composition in control and atopic dogs.

Dermal Inflammatory Cells	Control	Atopy I	Atopy II
Neutrophils	0%	20%	60%
Eosinophils	0%	80%	60%
Lymphocytes	0%	20%	40%
Plasma Cells	0%	0%	0%
Macrophages	40%	100%	80%
Mast Cells	6.1 ± 0.89 ^a	18.4 ± 7.86 ^b	19.8 ± 11.8 ^b

Results are expressed as percentages for neutrophils, eosinophils, lymphocytes, plasma cells and macrophages. Mast cells are expressed as mean ± standard deviation. Different letters shows statistically significant differences ($p \leq 0,05$) among control and atopic groups.

**7 CAPÍTULO 2 – MUPIROCIN PEMPHIGUS-LIKE DRUG REACTION IN DOG –
CASE REPORT**

Artigo submetido e aceito no periódico Acta Scientiae Veterinariae (B1)

Mupirocin Pemphigus-Like Drug Reaction in Dog

Tiago Cunha Ferreira¹, Rodrigo Fonseca de Medeiros Guedes¹, Belise Maria Oliveira Bezerra¹ & Diana Célia Sousa Nunes-Pinheiro¹

¹Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, CE, Brazil. CORRESPONDENCE: T.C. Ferreira [tiago.cunha@uece.br - Tel.: +55 (85) 98572-9099]. Laboratório de Imunologia e Bioquímica Animal, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, UECE, Av. Dr. Silas Munguba, 1700, Campus do Itaperi, Bloco E. CEP 60914703 Fortaleza, CE, Brazil.

Background: Pharmacodermia is defined as adverse reaction in skin, mucosa and appendages, which generates morpho-functional alterations in cutaneous barrier, inducing autoimmune diseases, such as pemphigus foliaceus, which is known as the most common autoimmune skin disease in dogs. This disease involves autoantibodies against desmoglein and desmocolin molecules, being induced by the use of certain drugs. Mupirocin (pseudomonic acid A) is a broad-spectrum antibiotic with bacteriostatic activity, being effective against Gram-positive pathogens and used to control superficial bacterial folliculitis. Based on that, the aim of this study was to report a pemphigus-like lesions after topical use of mupirocin in dog.

Case: Canine, male, uncastrated, 1-year, poodle, weighing 13.8 kg. The main complaint was related to pruritus in abdominal and inguinal region, in addition of legs licking. Dermatological examination revealed melanic crusts, epidermal collars and diffuse pustules in inguinal, abdominal, perianal and thoraco-lumbar regions. The therapy was based on topical use of Mupirocin in form of 0,2% aqueous spray. After drug administration, the animal presented urticaria, diffuse epidermal collars, papulo-crusted and pustular lesions, which were more evident in abdominal and inguinal region. Nasal erythema, binocular blepharitis, apathy and fever were also observed. Cytological examination and bacterial culture were performed, revealing inflammatory and acantholytic cells and no bacterial growth. Biopsy procedure revealed subcorneal pustule with presence of epithelial acantholytic cells and neutrophils,

compatible with canine pemphigus foliaceus. The topical treatment of ocular lesions with 0.1% Tacrolimus associated with systemic treatment with high dose of prednisolone (1.2 mg kg^{-1}). The patient improved the dermatological clinical signs, however, some side effects have already become evident, such as the presence of telangiectasia, polyuria, polyphagia and polydipsia. Heterodox therapy based on the use of azathioprine (2 mg kg^{-1}) was chosen in order to reduce corticoid dose. After 3 days of therapy, blood material was collected for hepatic evaluation, detecting hepatotoxicity. From the results, azathioprine therapy was suspended, and only high-dose corticosteroid therapy (1.5 mg kg^{-1}) was maintained. The patient presented a considerable improvement in the lesion after 10 days of treatment.

Discussion: There have been reports that pharmacodermic reactions may be associated with the development of autoimmune diseases, such as pemphigus foliaceus and vulgaris. In some cases, the lesions regress after drug discontinuation. In others, the medication acts as a triggering factor, activating the genetic predisposition of patient, which develops the pathology even after therapy interruption. The drug related pemphigus-foliaceous is a well-recognized disease in humans, however this disease is limited to sporadic cases in dogs. The therapy was based in use of a high dose of prednisolone, which caused some side effects. Therefore, a heterodox therapy was chosen in order to reduce the corticoid dosage. At the first hemato-biochemical evaluation, the patient already presented significant alterations, being requested to suspend the prescribed treatment, although the owners already reported improvement of the dermatological lesions. Due to this, a higher dose of prednisolone was chosen, obtaining the best response among the therapies used since the beginning of the treatment. After clinical improvement, the gradual reduction of steroidal therapy was started in order to avoid side effects related to suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. This report provides evidences of Mupirocin as a potential triggering factor of pemphigus-like lesions in dogs.

Keywords: Cutaneous Adverse Drug Reaction, Drug Allergy, Canine Autoimmune Disease

INTRODUCTION

Pharmacodermic reactions are defined as adverse manifestations in skin, mucosa and appendages due to topical or systemic drugs, which may cause structural or functional alterations in skin, reflecting on localized or generalized lesions [6,13,22]. These reactions can also trigger the development of autoimmune diseases, such as pemphigus foliaceus (PF), in predisposed individuals, which can progress even after drug discontinuation [10].

PF is known as the most common autoimmune skin disease in dogs, involving naturally or induced autoantibodies production against desmoglein and desmocolin molecules [1,3]. Iatrogenic PF is subdivided in drug-induced, which drug discontinuance leads to disease regression, or drug-triggered, where the drug stimulates the disease natural development and progression [10,24]. PF caused by drugs is well described in humans, associated to different drugs, such as angiotensin converting enzymes inhibitors and antibiotics [21].

Mupirocin (pseudomonic acid A) is a broad-spectrum antibiotic with bacteriostatic activity, being effective against Gram-positive pathogens, specially staphylococci and streptococci [7]. In dogs, it is used to control superficial bacterial folliculitis [8], showing a low prevalence of resistance [16].

Considering the lack of reports about drug-related PF in dogs [9], the objective of the present study is to describe the occurrence of pemphigus-like lesions in consequence of a pharmacodermic reaction following a topical application of mupirocin.

CASE

Canine, male, uncastrated, 1-year, poodle, weighing 13.8 kg was treated in a private clinic in Fortaleza. The main complaint was related to pruritus in abdominal and inguinal

region, in addition of legs licking. At the general clinical examination, the following observations were made: active patient, hydrated, temperature of 38.7°C and non-palpable lymph nodes. No ectoparasites were seen. Dermatological examination revealed meliceric crusts, epidermal collars and diffuse pustules in the inguinal, abdominal, perianal and thoracolumbar regions (Figure 1A). The legs were erythematous, as were the ears. Areas of alopecia were not visualized. The hairs were clean and the skin slightly oily. Therefore, through the information collected in anamnesis and clinical examination, the use of topical therapy with mupirocin (Bactroban[®])¹ in form of 0.2% aqueous spray, BID, for 15 days.

After initiation of treatment, the patient presented lesion worsening, such as increased quantity and size of epidermal pustules and collars, besides the appearance of urticaria and papular-crusted lesions in diffuse areas of the body, being more evident in abdominal and inguinal regions (Figure 1B).

On the occasion, cytological examination and bacterial culture were performed with material from the secretion of meliceric crusts and epidermal collars. Inflammatory cells were characterized, mostly, by intact and rare degenerated neutrophils, interspersed with acantholytic cells (Figure 2A). Regarding the bacterial culture, there was no growth of any bacteria from the collected sample. From the data, it was suspected of pharmacodermia related to mupirocin, being requested the drug suspension and added immunosuppressive drugs to treatment protocol. After the exchange of the previously adopted therapy, the patient improved the clinical picture, showing remission of the lesions and pruritus (Figure 1C/1D).

However, with the gradual reduction of drug dosage, there were reappearance of diffuse pustules and crustal lesions in chest, cervical, thoracic and lumbar regions. In addition to these lesions, the appearance of nasal erythema (Figure 3A), blepharitis (Figure 3B), apathy and fever (39.9°C) were observed.

With the appearance of such lesions, it was suspected that the patient was developing drug-triggered pemphigus foliaceus. The topical treatment of ocular lesions with 0.1% tacrolimus (Protopic[®])² associated with systemic treatment with 1.2 mg kg⁻¹, SID, of prednisolone (Alcort[®])³. The patient improved the dermatological clinical picture, however, some side effects have already become evident, such as the presence of telangiectasia, polyuria, polyphagia and polydipsia. Heterodox therapy based on the use of 2 mg kg⁻¹, SID, of azathioprine (Imuran[®])⁴ was chosen in order to reduce corticoid dose. After 3 days of therapy, blood sample was collected for hepatic evaluation, detecting hepatotoxicity. The hemato-biochemical parameters are represented in Table 1.

From the results, azathioprine therapy was suspended, and a dose of 1.5 mg kg⁻¹, SID, of prednisolone was maintained. The patient presented a considerable improvement in the lesion after 10 days of treatment, with remission of lesions almost all over the body and reduction of size, frequency and amount of pustules. The side effects observed with the use of the medication in high dose involved the same previously mentioned, besides the presence of pendular abdomen and weakness in respiratory muscles, being reflected in a clinical picture of mild dyspnea.

After a new corticoid dose reduction, it was possible to perform cutaneous biopsy of an intact pustule, and this material was submitted to histopathological examination. The report revealed the presence of subcorneal pustule, with presence of acantholytic epithelial cells interspersed by a large number of intact neutrophils (Figure 2B). The microscopic aspect of the lesion, along with the clinical findings and other complementary tests, revealed a clinical picture compatible with Canine Pemphigus Foliaceus. The patient continues to follow up until the present moment where it is perceived that, with low doses of immunosuppressive therapy, there is recurrence of the lesions.

DISCUSSION

The clinical case described demonstrates the occurrence of pemphigus foliaceus due to pharmacodermic reaction after topical administration of Mupirocin. This disease is known as the most common auto-immune skin disease in dogs and involves the synthesis of antikeratinocyte autoantibodies [3,14,15]. The clinical suspicion was based on the clinical-cytological patterns coincident with the administration of the medication, where the dermatological lesions, such as urticaria and pruritus, were compatible with those previously described [19].

There have been reports that pharmacodermic reactions may be associated with the development of autoimmune diseases, such as pemphigus foliaceus and vulgaris. In some cases, the lesions regress after drug discontinuation. In others, the medication acts as a triggering factor, activating the genetic predisposition of patient, which develops the pathology even after therapy interruption [5,18]. The drug related PF is a well-recognized disease in humans [24], however this disease is limited to sporadic cases in dogs [14,20,23]. At the authors knowledge, this is the first report of Mupirocin as a PF triggering factor.

For diagnostic help regarding pharmacodermia, a clinic algorithm was used. This method is based on a questionnaire which, according to the answers, it generates a final score, in order to try to establish a causal relationship between the use of the drug and the clinical signs presented by the patient [12]. The ratio of the 10 questions analyzed provided a score of 07, which characterizes the drug administration as a probable cause of lesions. In order to acquire a larger score, which would define the cause of pharmacodermic reaction, the drug should be readministered. However, such procedure has not been performed aiming at the health integrity of patient.

Cytological evaluation and bacterial culture of the material obtained from the secretion of meliceric crusts and epidermal collars were performed. The cytology content (Figure 2A) was similar to that reported in patients with a pemphigus-like reaction to a drug [2,20]. Regarding bacterial culture, such test was requested for differential diagnosis of pyoderma. However, there was no bacterial growth, reinforcing the hypothesis of Mupirocin as causal agent of pemphigus-like lesions.

In pemphigus foliaceus, acantholysis occurs in superficial skin layers, culminating with vesico-bullous lesions that can be easily broken [4]. Such fragility present in pustules delays the diagnostic process due to absence of intact blisters that allow the correct histopathological evaluation, which would justify the late accomplishment of such complementary test. Inside the pustules it is possible to verify the presence of acantholytic cells, surrounded by neutrophils (Figure 2B/2C). This data may indicate the cell migration from dermis to epidermis induced by chemotactic molecules from complement activation, culminating with tissue damage [17]. In addition, the damage that leads to acantholytic cells formation may also be originated from complement activation and antigen-antibody interaction over keratinocytes [3].

The adopted treatment during the clinical picture of pharmacodermia was based on the use of immunomodulatory drugs administered orally and topically. After 07 days of treatment, associated with the suspension of Mupirocin, the skin already presented clinical improvement (Figure 1C). Although skin lesions regressed early in treatment, new lesions began to appear together with systemic signs such as fever and apathy. Such signals were only controlled through high doses of corticosteroids. The side effects associated with the continuous use of this pharmacological group involve tegumentary and systemic alterations [10]. Among them, the patient presented cutaneous thinning, telangectasia, polyuria, polydipsia, polyphagia and weight gain.

The use of heterodox therapies in treatment of autoimmune diseases aims at the reduction of corticosteroid doses and consequent control of adverse effects [10]. Among the alternative drugs, azathioprine was used, but it was suspended due to hepatotoxicity, so a high dose of corticosteroids was chosen. The patient followed the therapy for 10 days, with excellent post-treatment results. The side effects developed were previously mentioned, but the patient has also presented frequent dyspnea due to respiratory muscle weakness.

After clinical improvement, the gradual reduction of steroidal therapy was started in order to avoid side effects related to suppression of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. This immune-mediated disease remission was not achieved until the present moment, being possible to notice the recurrence of cutaneous lesions, although of reduced intensity, when the corticosteroid dose is reduced.

CONCLUSION

This report provides further evidences that mupirocin can cause adverse drug reaction as well as trigger the development of pemphigus-like lesions in dogs. This case also reinforces the need to understand the mechanism of topical drug-triggered PF in order to ensure appropriate diagnosis and treatment.

MANUFACTURERS

¹GlaxoSmithKline Brasil Ltda. Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

²Astellas Farma Brasil Importação e Distribuição de Medicamentos Ltda. São Paulo, SP, Brasil.

³Cepav Pharma Ltda. São Paulo, SP, Brasil.

⁴Aspen Pharma Indústria Farmacêutica Ltda. Serra, ES, Brasil.

DECLARATION OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERENCES

1 Bizikova P., Dean G.A., Hashimoto T. & Olivry T. 2012. Cloning and establishment of canine desmocollin-1 as a major autoantigen in canine pemphigus foliaceus. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 149(3-4): 197-207.

2 Bizikova P., Moriello K.A., Linder K.E. & Sauber L. 2015. Dinotefuran/pyriproxyfen/permethrin pemphigus-like drug reaction in three dogs. *Veterinary Dermatology*. 26(3): 206-208.

3 Bizikova P., Olivry T., Mamo L.B. & Dunston S.M. 2014. Serum autoantibody profiles of IgA, IgE and IgM in canine pemphigus foliaceus. *Veterinary Dermatology*. 25(5): 471-e75.

4 Balda A.C., Ikeda M.O., Larsson-Junior C.E., Michalany N.S. & Larsson C.E. 2008. Pênfigo foliáceo canino: estudo retrospectivo de 43 casos clínicos e terapia (2000-2005). *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 28(8): 387-392.

5 Brenner S., Wolf R. & Ruocco V. 1993. Drug-induced pemphigus I. A survey. *Clinical Dermatology*. 11(4): 501-505.

6 Edwards I.R. & Aronson J.K. 2000. Adverse drug reactions: definitions, diagnosis, and management. *Lancet*. 356(9237): 1255-1259.

7 Fuchs P.C., Jones R.N. & Barry A.L. 1990. Interpretive criteria for disk diffusion susceptibility testing of mupirocin, a topical antibiotic. *Journal of Clinical Microbiology*. 28(3): 608-609.

8 Hillier A., Lloyd D.H., Scott-Weese J., Blondeau J.M., Boothe D., Breitschwerdt E., Guardabassi L., Papich M.G., Rankin S., Turnidge J.D. & Sykes J.E. 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-e43.

9 Iwasaki T., Shimizu M., Obata H., Isaji M., Yanai T., Kitagawa H. & Sasaki Y. 1997. Detection of canine pemphigus foliaceus autoantigen by immunoblotting. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 59(1-2): 1-10.

10 Larsson C.E. & Lucas R. 2016. *Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária*. 1st edn. São Paulo: Interbook, 853p.

11 Meyer D.J. & Harvey J.W. 2004. *Veterinary laboratory medicine: interpretation & diagnosis*. 2nd edn. Philadelphia: Saunders, 351p.

12 Naranjo C.A., Busto U., Sellers E.M., Sandor P., Ruiz I., Roberts E.A., Janecek E., Domecg C. & Greenblatt D.J. 1981. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clinical Pharmacology*. 30(2): 239-245.

13 Nayak S. & Acharjya B. 2008. Adverse cutaneous drug reaction. *Indian Journal of Dermatology*. 53(1): 2-8.

14 Oberkirchner U., Linder K.E., Dunston S., Bizikova P. & Olivry T. 2011. Metaflumizone-amitraz (Promeris)-associated pustular acantholytic dermatitis in 22 dogs: Evidence suggests contact drug-triggered pemphigus foliaceus. *Veterinary Dermatology*. 22(5): 436-448.

- 15 Olivry T. 2006.** A review of autoimmune skin diseases in domestic animals: I — superficial pemphigus. *Veterinary Dermatology*. 17(5): 291-305.
- 16 Park J.H., Kang J.H., Hyun J.E. & Hwang C.Y. 2018.** Low prevalence of Mupirocin resistance in *Staphylococcus pseudointermedius* isolates from canine pyoderma in Korea. *Veterinary Dermatology*. 29(2): 95-e37.
- 17 Ronet C., Passeli K., Charmoy M., Scarpellino L., Myburgh E., La Torre Y.H., Turco S., Mottram J.C., Fasel N., Luther S.A., Beverley S.M., Launois P. & Tacchini-Cottier F. 2019.** TLR2 Signaling in Skin Nonhematopoietic Cells Induces Early Neutrophil Recruitment in Response to *Leishmania major* Infection. *Journal of Investigative Dermatology*. 139(6): 1318-1328.
- 18 Ruocco V., Ruocco E., Lo Schiavo A., Brunetti G., Guerrera L.P. & Wolf R. 2013.** Pemphigus: Etiology, pathogenesis, and inducing or triggering factors: Facts and controversies. *Clinical Dermatology*. 31(4): 374-381.
- 19 Silva L.M. & Roselino A.M.F. 2003.** Reações de hipersensibilidade a drogas (farmacodermia). *Revista Medicina*. 36(2/4): 460-471.

20 Sung H.J., Yoon I.H. & Kim J.H. 2017. Putative contact ketoconazole shampoo-triggered pemphigus foliaceus in a dog. *The Canadian Veterinary Journal*. 58(9): 914-918.

21 Tavakolpour S. 2018. Pemphigus trigger factors: special focus on pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *Archives of Dermatological Research*. 310(2): 95-106.

22 Visacri M.B., Souza C.M., Sato C.M.S., Granja S., Marialva M., Mazzola P.G. & Moriel P. 2015. Adverse Drug Reactions and quality deviations monitored by spontaneous reports. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 23(2): 130-137.

23 White S.D., Carlotti D.N., Pin D., Bonenberger T., Ihrke P.J., Monet E., Nishifuji K., Iwasaki T. & Papich M.G. 2002. Putative drug-related pemphigus foliaceus in four dogs. *Veterinary Dermatology*. 13(4): 195-202.

24 Wolf R., Tamir A. & Brenner S. 1991. Drug-induced versus drug-triggered pemphigus. *Dermatologica*. 182(4): 207-210.

FIGURE LIST

Figure 1. Aspects of skin lesions before (A) and 4 days after (B) topical use of mupirocin. Treatment after cutaneous mupirocin drug reaction - 07 days (C) and 15 days (D). Author source.

Figure 2. Cytological evaluation (A) presents inflammatory infiltrate characterized by neutrophils, macrophages and acantholytic keratinocytes (arrow). Original magnification: 1000x. Scale bar: 50 μ m. Skin biopsy revealed subcorneal pustule, with acantholytic epithelial cells interspersed by a large number of intact neutrophils. H&E, Original magnification: 100x (B) and 400x (C). Scale bar: 50 μ m. Author source.

Figure 3. Skin lesions in nasal planum (A) and eye (B). Author source.

TABLE LIST

Table 1. Hemato-biochemical parameters in a dog with drug-triggered pemphigus foliaceus. T0 represents the hemato-biochemical parameters before treatment with corticosteroids and azathioprine. T1 represents the parameters after azathioprine and low dose of corticosteroids. T2 represents the parameters after azathioprine removal and high dose of corticosteroids.

TABLE 1

Parameters	Timeline			References [11] Min-Max
	T0	T1	T2	
RBC ($\times 10^6/\mu\text{L}$)	5.5	5.9	-	5.5-8.5
Hematocrit (%)	37.3	39.3	-	37-55
WBC ($\times 10^3/\mu\text{L}$)	10.4	15.0	-	6.0-17.0
Neutrophils (U/L)	7.3	12.9	-	3.0-11.5
Total Proteins (g/dL)	10.0	8.4	-	6.0-8.0
ALT/GPT (U/L)	38.0	277.6	67.0	10.0-88.0
ALP (U/L)	32.0	981.0	174.0	20.0-150.0
BUN (mg/dL)	-	104.7	65.3	21.0-60.0

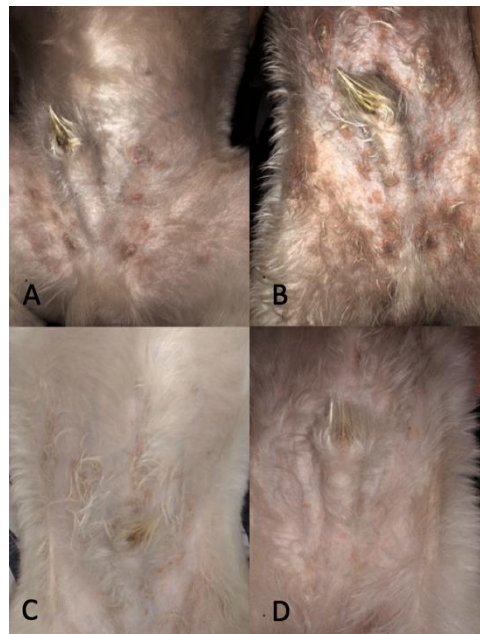
FIGURE 1

FIGURE 2

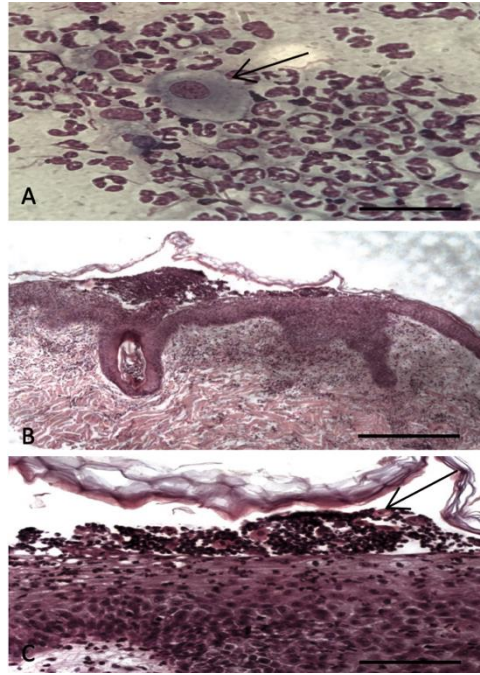
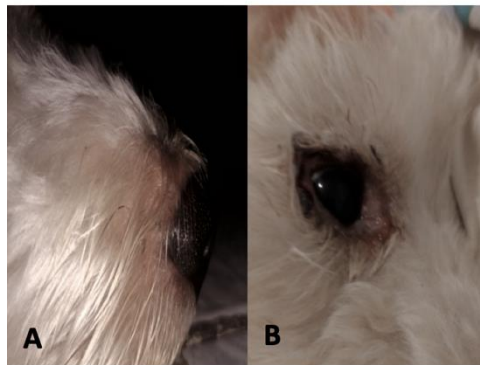


FIGURE 3



8 CAPÍTULO 3 – TERAPIA OTOLÓGICA INDUZ IMUNOTOXICIDADE EM CÃO

(Otological therapy induces immunotoxicity in dog)

Artigo submetido e aceito no periódico Ciência Animal

(B4 Qualis antigo / B2 – Qualis novo)

TERAPIA OTOLÓGICA INDUZ IMUNOTOXICIDADE EM CÃO

(Otolological therapy induces immunotoxicity in dog)

Tiago Cunha FERREIRA^{1*}, Társsila Mara Vieira FERREIRA², Breno Queiroz PINHEIRO¹, Juliana Furtado Lima VERDE², José Alexandre da Silva JÚNIOR², Diana Celia Sousa NUNES-PINHEIRO¹

1 - Professor da Faculdade de Veterinária (FAVET) / Universidade Estadual do Ceará (UECE)

2 - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias / FAVET / UECE

***Autor para correspondência: tiago.cunha@uece.br**

RESUMO

As farmacodermias podem ser definidas como reações adversas em pele, mucosas e anexos, tendo, por vezes, caráter imunomediado. O diagnóstico baseia-se na avaliação clínico-laboratorial do paciente, envolvendo uma pesquisa acerca de fatores relacionados ao uso do fármaco e seus efeitos adversos. Na medicina veterinária, são escassos os relatos de reações farmacodérmicas. Logo, o objetivo do presente trabalho é relatar uma reação adversa após terapia otológica em cão. Foi atendido um paciente canino, fêmea, 02 anos de idade, com histórico de prurido auricular bilateral com evolução de três semanas. Na ocasião, foi realizado exame citológico auricular, evidenciando presença de elevada quantidade de células leveduriformes e cocos, além de células descamativas. Optou-se, então, por terapia à base de solução otológica composta por Gentamicina, Clotrimazol, Betametasona e Benzocaína. O quadro clínico evoluiu de forma satisfatória até o décimo dia de tratamento, quando a paciente apresentou intenso eritema e secreção melicérica bilateralmente. Repetiu-se o exame citológico, assim como realizou-se cultura de bactérias aeróbicas, sendo evidenciado em tais exames um infiltrado inflamatório piogranulomatoso, com pouca presença de conteúdo bacteriano e fúngico, corroborando com os achados da cultura bacteriana. Diante da suspeita de farmacodermia, procedeu-se com a troca de todos os compostos terapêuticos, tendo a paciente evoluído de forma satisfatória até o término do tratamento. Por tratar-se ainda de uma solução otológica composta, não se pode atribuir a causa da reação a especificamente um dos compostos. Contudo, reforça-se a necessidade de conscientização do médico veterinário acerca da identificação e adequada intervenção nas reações adversas medicamentosas, assim como espera-se sua contribuição científica na difusão dessas informações.

Palavras-Chave: Farmacodermia, otite externa, dermatologia canina.

ABSTRACT

Pharmacodermia can be defined as adverse reactions in skin, mucous membranes and appendages, sometimes having immunomediated character. The diagnosis is based on the patient clinical-laboratorial evaluation, involving a research about factors related to the drug use and its adverse effects. In veterinary medicine, reports of pharmacodermic reactions are scarce. Therefore, the aim of the present study is to report an adverse reaction after otologic therapy in dogs. A 2-year-old female canine patient with a history of bilateral auricular pruritus with a three-week course was attended. At the time, auricular cytology was

performed, evidencing the presence of high numbers of yeast cells and cocci, as well as desquamative cells. It was then opted for otologic solution composed of Gentamicin, Clotrimazole, Betamethasone and Benzocaine. The clinical presentation progressed satisfactorily until the tenth day of treatment, when the patient presented intense erythema and meliceric secretion. Cytological examination was repeated, as well as culture of aerobic bacteria. A piogranulomatous inflammatory infiltrate with low bacterial and fungal content was evidenced in these examinations, corroborating with the findings of the bacterial culture. Faced with the suspicion of pharmacodermia, all therapeutic compounds were exchanged, and the patient progressed satisfactorily until the end of the treatment. Because it is still a composed otological solution, the cause of the reaction can not be attributed to specifically one of the compounds. However, there is a need to raise the awareness of the veterinarian about the identification and appropriate intervention in adverse drug reactions, as well as his scientific contribution to the dissemination of this information.

Key Words: Pharmacodermia, otitis externa, canine dermatology.

INTRODUÇÃO

Reações farmacodérmicas são definidas como manifestações adversas em pele, mucosa e anexos, as quais podem estar isoladas ou associadas a outras alterações orgânicas ou sistêmicas. Tais reações também são conhecidas como reações cutâneas medicamentosas, dermatites medicamentosas ou toxidermias (LARSSON, 2002). As dermatites medicamentosas podem gerar alterações estruturais ou funcionais cutâneas, onde o quadro clínico apresenta-se de forma diversificada, com lesões localizadas ou generalizadas (NAYAK e ACHARJYA, 2008). Os sinais dermatológicos comumente descritos envolvem dermatite esfoliativa, angioedema, eczema, urticária, dermatite vesicobolhosa, dentre outros (SILVA e ROSELINO, 2003).

Tais reações podem ser subdivididas em tipo I, a qual é ocasionada devido às propriedades físicas ou químicas de determinado agente ou metabólito, sendo dose dependente, previsível e não tendo caráter imuno-mediado; e tipo II, a qual possui envolvimento do sistema imunológico, sendo uma reação idiossincrática e imprevisível (SCHNYDER e BROCKOW, 2015). As reações do tipo II podem ser ainda inseridas dentro do contexto de imunotoxicidade, onde a droga utilizada é capaz de gerar reações de hipersensibilidades e efeitos deletérios no indivíduo (VOLGER, 2014).

O diagnóstico da doença baseia-se na avaliação clínico-laboratorial do paciente (NAYAK e ACHARJYA, 2008), envolvendo uma busca detalhada de fatores relacionados à administração do fármaco e seus efeitos adversos (NARANJO *et al.*, 1981). Além disso, utilizam-se exames citológico e histopatológico, os quais são importantes ferramentas na busca diagnóstica da farmacodermia. Tais exames, contudo, não são capazes de identificar o agente causal (NAYAK e ACHARJYA, 2008).

Dentre as classes farmacológicas capazes de provocar reações medicamentosas em humanos, destacam-se os fármacos antimicrobianos, seguidos dos imunomoduladores e antineoplásicos (VISACRI *et al.*, 2015). Na Medicina Veterinária, contudo, encontram-se poucos relatos ou dados referentes à frequência de reações a drogas. A partir do exposto e visando à difusão de informações acerca de toxidermias em animais de companhia, o objetivo do presente trabalho foi relatar a ocorrência de reação farmacodérmica após administração de medicação otológica em cão.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi atendido um paciente canino, fêmea, 02 anos de idade, 8,2kg, Poodle, com histórico de prurido auricular bilateral com evolução de 03 semanas. A tutora relatou ainda que a paciente apresentava lambedura de patas frequentemente. Ao exame clínico, foram detectadas alterações em pavilhão auricular externo bilateralmente, estando ambos eritematosos e com presença de discreta secreção auricular de caráter ceruminoso. Ao exame otológico, visualizou-se presença de irritação em canal horizontal. Ao exame dermatológico, não foram visualizados ectoparasitos ou alterações tegumentares além de feotriquismo em membros anteriores. A paciente encontrava-se em normossistêmica.

Na ocasião, foi realizado exame citológico, sendo visualizada presença de cocos e elevada quantidade de estruturas leveduriformes compatíveis com *Malassezia spp* (Fig. 01A). Após a realização dos exames complementares, foi instituída terapia com solução otológica a cada 12 horas por 21 dias, sendo tal medicação composta por Gentamicina, Clotrimazol, Betametasona e Benzocaína. A escolha do produto foi baseada no exame citológico, devido à intensa presença de leveduras, sendo o Clotrimazol um composto de elevada eficácia contra estes microorganismos (LARSSON & LUCAS, 2016). A evolução do quadro clínico ocorreu de forma satisfatória até o décimo dia de terapia, quando a paciente começou a ter recidiva das alterações em pavilhões auriculares (Fig. 02A). Os mesmos apresentaram-se eritematosos, com presença de secreção melicérica bilateral e dor ao toque que, segundo o tutor, se apresentaram de forma abrupta. Procedeu-se novamente com o exame citológico, suspeitando-se de resistência ao fármaco utilizado ou de reação farmacodérmica. Realizou-se ainda cultura para pesquisa de bactérias aeróbicas e, em caso positivo de crescimento bacteriano, seria realizado também teste de sensibilidade aos fármacos antimicrobianos. O exame citológico realizado após a recidiva do quadro clínico revelou presença de infiltrado

inflamatório piogranulomatoso (Fig. 01B), com raros cocos envolvidos e ausência de células leveduriformes.

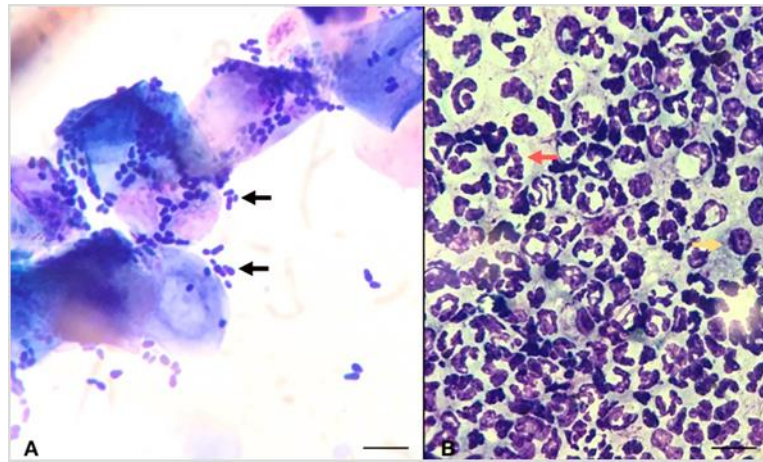


Figura 01: Fotomicrografia de exame citológico auricular, demonstrando intensa presença de células leveduriformes associada a processo inflamatório. A) Células leveduriformes compatíveis com *Malassezia* spp (seta preta); B) Presença de intenso infiltrado inflamatório piogranulomatoso após reação farmacodérmica composto por células polimorfonucleadas (seta vermelha) e mononucleadas (seta amarela). Panótico rápido, microscopia óptica em amplificação de 1000x. Escala: 50µm.

A cultura bacteriana, realizada concomitante ao exame citológico, teve resultado negativo para crescimento de bactérias aeróbicas. Tais achados sugerem que a nova lesão foi ocasionada por reação farmacodérmica à medicação utilizada, sendo realizada a troca do medicamento por outra solução otológica composta por Orbifloxacino, Posaconazol e Mometasona. Após 10 dias da troca da medicação, a paciente apresentou remissão completa do quadro clínico, não sendo possível a visualização de eritema, dor e secreção auricular em ambos ouvidos (Fig. 02D).



Figura 02: Condição e evolução clínica do pavilhão auricular no início da reação farmacodérmica e após a troca da medicação. (A) Avaliação inicial após a farmacodermia, com presença de eritema e secreção auricular de caráter melicérico (seta amarela). (B) Reavaliação auricular após 03 dias da troca da medicação. (C) Reavaliação auricular após 07 dias da troca da medicação. (D) Reavaliação auricular após 10 dias da troca da medicação, onde observa-se ausência de eritema e secreção auricular.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A detecção e avaliação de reações medicamentosas no âmbito clínico são ferramentas importantes no acesso à frequência de ocorrência de efeitos conhecidos e desconhecidos (CEREZA *et al.*, 2010). No Brasil, foi realizado um estudo acerca da percepção de farmacovigilância em hospitais humanos, onde 51% dos entrevistados não estava ciente da importância da notificação de efeitos adversos (JULIAN *et al.*, 2018). Relativo aos animais de companhia, as reações farmacológicas são consideradas doenças de ocorrência rara (LARSSON, 2002). Entretanto, a possibilidade de tais doenças serem pouco relatadas não pode ser descartada, gerando uma escassez de dados acerca da incidência de tais patologias na clínica médica de cães e gatos.

O caso clínico descrito demonstra a ocorrência de toxidermia decorrente da administração tópica de solução otológica composta. A suspeita clínica foi baseada nos padrões clínico-citológicos coincidentes com a administração da medicação, onde as lesões dermatológicas manifestadas, como eritema e prurido, são compatíveis com as descritas por Silva e Roselino (2003). Há ainda ocasiões em que a reação farmacodérmica apresenta-se de

forma grave, como a necrólise epidérmica tóxica, gerando áreas similares a queimaduras de difícil cicatrização, gerando riscos à vida do animal (ALEIXO *et al.*, 2010). No caso relatado, apesar da intensidade da reação cutânea, o paciente continuou com os parâmetros fisiológicos dentro dos padrões esperados de normalidade.

Para auxílio diagnóstico, fez-se uso do algoritmo descrito por Naranjo e colaboradores (1981). Tal método baseia-se em um questionário (Tab. 01) o qual, de acordo com as respostas, é gerada uma pontuação final, de modo a tentar estabelecer uma relação de causalidade entre a utilização da droga e os sinais clínicos apresentados (NARANJO *et al.*, 1981). A relação das dez questões analisadas forneceu um escore de 07, o que caracteriza a administração da medicação como provável causa para o aparecimento das lesões. Para a aquisição de um escore maior, o que definiria a causa da reação farmacodérmica, a droga deveria ser readministrada. Contudo, tal procedimento não foi realizado visando à integridade da saúde do paciente.

Além da avaliação clínica, realizou-se avaliação citológica e cultura bacteriana do material obtido da secreção auricular presente após a reação farmacodérmica. A citologia revelou infiltrado inflamatório piogranulomatoso, com pouco conteúdo bacteriano e fúngico envolvido, reforçando a eficácia do fármaco utilizado na resolução da infecção inicial. Contudo, a persistência da inflamação sugere manutenção do estímulo imunológico local, onde, embora exacerbado, pode ainda ter contribuído de forma positiva para a resolução do quadro infeccioso. Relativo à cultura bacteriana, tal exame foi realizado concomitante à citologia, visando à possibilidade de resistência bacteriana ao fármaco antimicrobiano. Entretanto, não houve crescimento de microorganismos, corroborando com os achados citológicos e reforçando a hipótese da reação farmacodérmica avaliada.

As toxidermias são baseadas em mecanismos imunológicos de hipersensibilidade, sendo o tipo da reação dependente das moléculas envolvidas. O caso clínico descrito demonstra a ocorrência de farmacodermia decorrente da administração de solução otológica. Essa reação ocorreu após o décimo dia de terapia, o que sugere um caráter tardio de resposta de hipersensibilidade. As reações farmacodérmicas tardias estão associadas a mecanismos de hipersensibilidade do tipo IV (VOIE *et al.*, 2012), envolvendo uma fase de sensibilização e uma fase efetora ao antígeno envolvido (KAPLAN *et al.*, 2012). Tais antígenos são tanto capazes de ativar diretamente as células dendríticas, quanto também podem gerar alterações no microambiente celular, induzindo a um estado de alerta imunológico, culminando na resposta efetora aos agentes químicos (PALLARDY e BECHARA, 2017).

Tabela 1: Algoritmo de Naranjo adaptado para a paciente.

Questionamento	Sim	Não	Desconhecido	Escore
Existem notificações CONCLUSIVAS SOBRE esta reação?	1	0	0	1
A reação apareceu após a administração do fármaco?	2	-1	0	2
A reação melhorou quando o fármaco foi suspenso?	1	0	0	1
A reação reapareceu após a readministração da medicação?	2	-1	0	0
A reação reaparece após a administração de um placebo?	-1	1	0	0
A concentração plasmática está em nível tóxico?	1	0	0	0
A reação aumentou com dose maior ou reduziu com dose menor?	1	0	0	0
Existem causas alternativas (ou outros fármacos) ?	-1	2	0	2
O paciente já apresentou reações semelhantes com o mesmo fármaco?	1	0	0	0
A reação foi confirmada por qualquer evidência objetiva?	1	0	0	1
			Total	7

Por ser uma formulação composta, não se pode atribuir a causa da reação a especificamente a uma substância, contudo, dermatites medicamentosas relacionadas aos antibióticos aminoglicosídeos, sendo a Gentamicina um membro dessa classe, já foram reportadas em cães e humanos (ONDER *et al.*, 1994; MILLARD e ORTON, 2004; LARSSON e LUCAS, 2016). A nova terapia baseou-se na troca de todos os princípios ativos, onde o paciente apresentou melhora do quadro clínico logo após o início do tratamento e não possuindo mais lesão ao término do mesmo.

CONCLUSÕES

A partir do exposto, conclui-se que solução otológica composta pode desencadear reações farmacodérmicas em cães, sendo necessária atenção do Médico Veterinário para identificação, entendimento e adoção da terapia mais adequada de acordo com os achados clínicos. Reforça-se ainda que a farmacovigilância é essencial no âmbito Veterinário, onde

esforços devem ser direcionados de forma a melhor difundir os efeitos adversos relacionados ao uso de medicações na clínica médica.

REFERÊNCIAS

ALEIXO, G.A.S.; COELHO, M.C.O.C.; ANDRADE, L.S.S.; LACERDA, M.A.S.; MOTA, A.K.R.; MAIA, F.C.L.; GUERRA, N.S.; OLIVEIRA, L.K.R.B.; SILVA, C.E.S. Farmacodermia em um cão após administração de antibióticos do grupo betalactâmico: relato de caso. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.62, n.6, p.1526-1529, 2010.

CEREZA, G.; AGUSTÍ, A.; PEDRO, S. C.; VALLANO, A.; AGUILERA, C.; DANES, I.; VIDAL, X.; ARNAU, J.M. Effect of an intervention on the features of adverse drug reactions spontaneously reported in a hospital. *European Journal of Clinical Pharmacology*, v.66, p.937–945, 2010.

JULIAN, G.C.; OLIVEIRA, R.W.; MINOWA, E.; CECILIO, L.; BARROS, L.H.C. Pharmacovigilance knowledge in Brazil: perception of participants of oncology patient advocacy group on adverse events reporting. *Brazilian Journal of Oncology*, v.14, p.1-11, 2018.

KAPLAN, D. H.; IGYART O, B. Z.; GASPARI, A. A. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nature Reviews Immunology*, v.12, p.114–124, 2012.

LARSSON, C.E. Drug eruption (DE). In: 27 WSAVA 2002, Granada. Disponível em:<http://www.vin.com/proceedings/Proceedings.plx?CID=WSAVA2002&PID=2551/>. Acessado em: 19 de dezembro 2018.

LARSSON, C.E.; LUCAS, R. Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária. 1ª ed. São Paulo: Interbook, 2016. 853p.

LOBO, M.G.; PINHEIRO, S.M.; CASTRO, J.G.; MOMENTE, V.G.; Pranchevicius, M.C. Adverse drug reaction monitoring: support for pharmacovigilance at a tertiary care hospital in Northern Brazil. *BMC Pharmacology and Toxicology*, n.14, p.5, 2013.

MILLARD, T.P.; ORTON, D.I. Changing patterns of contact allergy in chronic inflammatory ear disease. *Contact Dermatitis*, v.50, p.83-86, 2004.

NARANJO, C.A.; BUSTO, U.; SELLERS, E.M.; SANDOR, P.; RUIZ, I.; ROBERTS, E.A.; JANECEK, E.; DOMECH, C.; GREENBLATT, D.J. A method for estimating the probability of adverse drug reactions. *Clinical Pharmacology*, v.30, p.239–245, 1981.

NAYAK, S.; ACHARJYA, B. Adverse cutaneous drug reaction. *Indian Journal of Dermatology*, v.53, p.2-8, 2008.

ONDER, M.; ONDER T.; OZUNLU, A.; MAKKI, S.S.; GURER, M.A. An investigation of contact dermatitis in patients with chronic otitis externa. *Contact Dermatitis*, v.31, p.116-117, 1994.

PALLARDY, M.; BECHARA, R. Chemical or Drug Hypersensitivity: is the immune system clearing the danger? *Toxicological Sciences*, n.158, p.14-22, 2017.

SCHNYDER, B.; BROCKOW, K. Pathogenesis of drug allergy – current concepts and recent insights. *Clinical and Experimental Allergy*, v.45, p.1376-1383, 2015.

SILVA, L.M.; ROSELINO, A.M.F. Reações de hipersensibilidade a drogas (farmacodermia). *Revista Medicina*, v.36, p.460-471, 2003.

SRIRAM, S.; GHASEMI, A.; RAMASAMY, R.; DEVI, M.; BALASUBRAMANIAN, R.; RAVI, T.K.; SABZGHABHAEI, A.M. Prevalence of adverse drug reactions at a private tertiary care hospital in south India. *Journal of Research in Medical Sciences*, v.16, p.16–25, 2011.

VISACRI, M.B.; SOUZA, C.M.; SATO, C.M.S.; GRANJA, S.; MARIALVA, M.; MAZZOLA, P.G.; MORIEL, P. Adverse drug reactions and quality deviations monitored by spontaneous reports. *Saudi Pharmaceutical Journal*, v.23, p.130-137, 2015.

VOIE, K.L.; CAMPBELL, K.L.; LAVERGNE, S.N. Drug hypersensitivity reactions targeting the skin in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v.26, p.863–874, 2012.

VOLGER, O.L. Omics-based testing for direct immunotoxicity. *Toxicogenomics-Based Cellular Models*, 1^a ed., Amsterdã:Elsevier, 2014, 362p.

9 CONCLUSÕES

Conclui-se, através dos estudos realizados, que as reações de hipersensibilidade possuem importante participação na imunopatogenia de diferentes dermatopatias cutâneas, sendo importante a atenção do médico veterinário para identificação e interpretação de tal distúrbio imunológico. Além disso, foi possível observar uma progressão da reação inflamatória tecidual e sistêmica em cães atópicos. Essa inflamação, contudo, não interferiu no balanço oxidativo sistêmico.

Espera-se que esse trabalho possa contribuir com a melhora da abordagem clínica de doenças de hipersensibilidade em cães, assim como um melhor entendimento acerca da imunopatogenia da dermatite atópica canina.

10 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos nesse trabalho ressaltam a importância da observação e identificação das reações de hipersensibilidade na clínica veterinária, de modo que sejam adotadas terapias adequadas para o controle do quadro inflamatório. Além disso, reforça-se a publicação de casos clínicos associados a tais reações, de forma que haja difusão de informações acerca das mais variadas apresentações clínicas.

Ressalta-se ainda a necessidade de estudos adicionais com a dermatite atópica canina, abordando cães com maior grau lesional. Esse tipo de estudo ajudará a elucidar a dinâmica celular presente na doença, favorecendo um melhor entendimento acerca de sua imunopatogenia.

REFERÊNCIAS

- AKDIS, M. Healthy immune response to allergens: T regulatory cells and more. **Current Opinion in Immunology**, v. 18, p. 738–744, 2006.
- ALMELA, R. M.; RUBIO, C. P.; CERON, J. J.; ANSON, A.; TICHY, A.; MAYER, U. Selected serum oxidative stress biomarkers in dogs with non-food-induced and food-induced atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 29, n. 3, p. 229-e82, 2018.
- ALMOGREN, A.; ADAM, M. H.; SHAKOOR, Z.; GADELRAH, M. O.; MUSA, H. A. Th1 and Th2 cytokine profile of CD4 and CD8 positive peripheral blood lymphocytes in nickel contact dermatitis. **Central European Journal of Immunology**, v. 38, p. 100-106, 2013.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R.C.G., DE PAULA, S. O., MINIM, V.P. R.; BRESSAN, J. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista Nutrição**, Campinas, v. 23, p. 629-643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.
- BRUET, V.; BOURDEAU, P.J.; ROUSSEL, A.; IMPARATO, L.; DESFONTIS, J. C. Characterization of pruritus in canine atopic dermatitis, flea bite hypersensitivity and flea infestation and its role in diagnosis. **Veterinary Dermatology**, v. 23, p. 487– e493, 2012.
- CARDOSO, M. J. L.; MACHADO, L. H. A.; MELUSSI, M.; ZAMARIAN, T. H.; CARNIELLI, C. M.; JUNIOR, J. C. M. F. Dermatopatias em cães: 257 casos. **Archives of Veterinary Science**, v. 16, n. 2, p. 66-74, 2011.
- CARLOTTI, D. N.; REMY, I.; PROST, C. Food allergy in dogs and cats: a review and report of 43 cases. **Veterinary Dermatology**, v. 1, p. 55-62, 1990.
- CHEMPPRAPAI, S.; BROERE, F.; SCHLOTTER, Y. M.; VELDHUIZEN, E. J. A.; RUTTEN, V. P. M. G. A canine keratinocyte cell line expresses antimicrobial peptide and cytokine genes upon stimulation with bacteria, microbial ligands and recombinant cytokines. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 206, p. 35-40, 2018.
- CONCEIÇÃO, L. G.; LOURES, F. H.; CLEMENTE, J. T.; FABRIS, V. E. Biópsia e histopatologia da pele: um valioso recurso diagnóstico na dermatologia – revisão – parte 1. **Clínica Veterinária**, n. 51, p. 36-44, 2004.
- CORK, M. J.; DANBY, S. G.; VASIPOULOS, Y.; HADGRAFT, J.; LANE, M. E.; MOUSTAFA, M.; GUY, R. H.; MACGOWAN, A. L.; TAZI-AHNINI, R.; WARD, S. J. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. **Journal of Dermatology Investigative**, v. 129, p. 1892-1908, 2009.
- DEBOER, D. J.; MORRIS, M. Multicentre open trial demonstrates efficacy of sublingual immunotherapy in canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 23, p. 65, 2012.

DUNSTAN, R. W. A user's guide to veterinary surgical pathology laboratories, or, why do I still get a diagnosis of chronic dermatitis even when I take a perfect biopsy? **Veterinary Clinical North American. Small Animal Practice**, v. 20, p. 1397-1417, 1990.

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

FERREIRA, T. C.; RODRIGUES, F. R. N.; LOPES, C. E. B.; MATOS, M. G.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; VIANA, D. A. Can Pagoda Red staining be used for histopathological differentiation of canine allergic dermatitis? **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 11, n. 3, p. 253-262, 2017.

FERREIRA, T. C.; GUEDES, F. M. G.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Epidermal dysfunctions in canine atopic dermatitis: clinical impacts and therapies. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 12, n. 4, p. 396-406, 2018.

GADEYNE, C.; LITTLE, P.; KING, V. L.; EDWARDS, N.; DAVIS, K.; STEGEMANN, M. R. Efficacy of oclacitinib (Apoquel®) compared with prednisolone for the control of pruritus and clinical signs associated with allergic dermatitis in client-owned dogs in Australia. **Veterinary Dermatology**, v. 25, p. 512–518, 2014.

GALLI, S. J.; TSAI, M. IgE and mast cells in allergic disease. **Nature Medicine**, v. 4, p. 693-704, 2012.

GALLO, R. L. & NAKATSUJI, T. Microbial Symbiosis with the Innate Immune Defense System of the Skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, p. 1974-1980, 2011.

GRIFFIN, C.E.; DeBOER, D.J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p. 255–269, 2001.

GROSS, T. L. **Skin diseases of the dog and cat: clinical and histopathologic diagnosis**. 2. ed. Oxford: Blackwell, 2005. 932 p.

HENSEL, P.; SANTORO, D.; FAVROT, C.; HILL, P.; GRIFFIN, C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. **BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 1-13, 2015.

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

HOBİ, S.; MUELLER, R. S. Efficacy and safety of rush immunotherapy with alumprecipitated allergens in canine atopic dermatitis. **Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere**, v. 42, p. 167–173, 2014.

JAEGER, K.; LINEK, M.; POWER, H. T.; BETTENAY, S. V.; ZABEL, S.; ROSYCHUK, R. A.; MUELLER, R. S. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a

comparison of five locations in three continents. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 118–122, 2010.

Jl, H.; LI, X. K. Oxidative Stress in Atopic Dermatitis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1-8, 2016.

LACEY, K. A.; GEOGHEGAN, J. A.; McLOUGHLIN, R. M. The role of Staphylococcus aureus Virulence Factors in Skin Infection and Their Potential as Vaccine Antigens. **Pathogens**, v. 5, p. 1-17, 2016.

LARCHÉ, M.; ROBINSON, D. S.; KAY, A. B. The role of T lymphocytes in the pathogenesis of asthma. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, p. 450–463, 2003.

LEE, A. J.; RUTTEN, V. P. M. G.; BRUIJIN, J.; WILLIEMSE, T.; BROERE, F. CD4⁺ and CD8⁺ skin associated T lymphocytes in canine atopic dermatitis produce interleukin-13, interleukin-22 and interferon- γ and contain a CD25⁺FoxP3⁺ subset. **Veterinary Dermatology**, v. 25, p. 456-e72, 2014.

LITTLE, P. R.; KING, V. L.; DAVIS, K. R.; COSGROVE, S. B.; STEGEMANN, M. R. A blinded, randomized clinical Trial comparing the efficacy and safety of oclacitinib and ciclosporin for the control of atopic dermatitis in client-owned dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 26, p. 23–30, 2015.

MARSELLA, R.; SANTORO, D.; AHRENS, K.; THOMAS, A. L. Investigation of the effect of probiotic exposure on filaggrin expression in an experimental model of canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 260–e57, 2013.

MATSUI, T.; AMAGAI, M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. **International Immunology**, v. 27, p. 269-280, 2015.

NAKAI, K.; YONEDA, K.; MAEDA, R.; MUNEHITRO, A.; FUJITA, N.; YOKOI, I.; MORIUE, J.; MORIUE, J.; KOSAKA, H.; KUBOTA, Y. Urinary biomarker of oxidative stress in patients with psoriasis and atopic dermatitis **Journal of the European Academy of Dermatology and Venerology**, v. 23, p. 1405–1408, 2009.

NAYAK, S.; ACHARJYA, B. Adverse cutaneous drug reaction. **Indian Journal of Dermatology**, v. 53, p. 2-8, 2008.

NESTLE, F. O.; MEGLIO, P. D.; QIN, J. Z.; NICKOLOFF, B. J. Skin immune sentinels in health and disease. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, n. 10, p. 679-691. 2009.

NIWA, Y.; SUMI, H.; KAWAHIRA, K.; TERASHIMA, T.; NAKAMURA, T.; AKAMATSU, H.; Protein oxidative damage in the stratum corneum: evidence for a link between environmental oxidants and the changing prevalence in nature of atopic dermatitis in Japan. **British Journal of Dermatology**, v. 149, p. 248–254, 2003.

OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

OLIVRY, T., DUNSTON, S. M. Expression patterns of superficial epidermal adhesion molecules in an experimental dog model of acute atopic dermatitis skin lesions. **Veterinary Dermatology**, v. 26, p. 53–e18, 2015.

OLIVRY, T.; HILL, P. B. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVIII): histopathology of skin lesions. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p. 305–309, 2001.

OLIVRY, T.; DeBOER, D. J.; FAVROT, C.; JACKSON, H. A.; MUELLER, R. S.; NUTTALL, T.; PRELAUD, P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). **BMC Veterinary Research**, v. 11, p. 1-15, 2015.

PASPARAKIS, M.; HAASE, I.; NESTLE, F. O. Mechanisms regulating skin immunity and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 289-301, 2014.

PENINO, D; EYERICH, K.; SCARPONI, C.; CARBONE, T.; EYERICH, S.; NASORRI, F.; GARCOVICH, S.; TRAILD-HOFFMANN, C.; ALBANESI, C.; CAVANI, A. IL-17 amplifies human contact hypersensitivity by licensing hapten nonspecific Th1 cells to kill autologous keratinocytes. **Journal of Immunology**, v. 184, p. 4880-4888, 2010.

PLEVNIK KAPUN, A.; SALOBIR, J.; LEVART, A.; KOTNIK, T.; SVETE, A. N. Oxidative stress markers in canine atopic dermatitis. **Research in Veterinary Science**, v. 92, p. 469–470, 2012.

POPA, I.; PIN, D.; REMOUE, N.; OSTA, B.; CALLEJON, S.; VIDEMONT, E.; 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**, v. 35, p. 501–509, 2011.

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

QIU, R.; ZHOU, L.; MA, Y.; ZHOU, L.; LIANG, T.; SHI, L.; LONG, J.; YUAN, D. Regulatory T Cell Plasticity and Stability and Autoimmune Diseases. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, p. 1-19, 2018.

RADITIC, D. M.; REMILLARD, R. L.; TATER, K. C. ELISA testing for common food antigens in four dry dog foods used in dietary elimination trials. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, v. 95, n. 1, p. 90–97, 2011.

RODRIGUES-HOFFMANN, A.; PATTERSON, A.P.; DIESEL, A.; LAWHON, S. D.; LY, H. J.; STEPHENSON, C. E.; MANSELL, J.; STEINER, J. M.; DOWD, S. E.; OLIVRY, T.; SUCHODOLSKI, J.S. The Skin Microbiome in Healthy and Allergic Dogs. **Plos one**, v. 9, p. e83197, 2014.

ROSTAHER, A.; FISCHER, N. M.; URWYLER, A.; FAVROT, C. Circulating CD4+CD25+Foxp3+ T regulatory cell levels in an experimental model of canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 29, p. 511-e171, 2018.

SCOTT, D. W. Observations on canine atopy. **Journal of American Animal Hospital Association**, v. 17, p. 91–100, 1981.

SHIMIZU, T. Lipid mediators in health and disease: enzymes and receptors as therapeutic targets for the regulation of immunity and inflammation. **Annual Review in Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 123–150, 2009.

SILVA, L. M.; ROSELINO, A. M. F. Reações de hipersensibilidade a drogas (farmacodermia). **Revista Medicina**, v. 36, p. 460-471, 2003.

SINKE, J. D.; THEPEN, T.; BIHARI, I. C.; RUTTEN, V. P. M. G.; WILLIEMSE, T. Immunophenotyping of skin-infiltrating T-cell subsets in dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 57, n. 1, p. 13-23, 1997.

SOUZA, T. M.; FIGHERA, R. A.; KOMMERS, G. D.; BARROS, C. S. L. Aspectos histológicos da pele de cães e gatos como ferramenta para dermatopatologia. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 2, p. 177-190, 2009.

TASZKUN I. The evaluation of Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI) test in dogs with atopic dermatitis (AD) treated with cyclosporine or prednisone. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 3, p. 681–688, 2010.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: introdução**. 9. ed. São Paulo: Elsevier, 2014. 533 p.

VISSER, M. J.; LANDECK, L.; CAMPBELL, L. E.; MCLEAN, W. H. I.; WEIDINGER, S.; CALKOEN, F.; JOHN, S. M.; KEZIC, S. Impact of atopic dermatitis and loss-of-function mutations in the filaggrin gene on the development of occupational irritant contact dermatitis. **Cutaneous Allergy**, v. 168, p. 326–332, 2013.

WALECKI, M.; EISEL, F.; KLUG, J.; BAAL, N.; PARADOWSKA-DOGAN, A.; WAHLE, E.; HACKSTEIN, H.; MEINHARDT, A.; FIJAK, M. Androgen receptor modulates Foxp3 expression in CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T-cells. **Molecular biology of the cell**, v. 26, n. 15, p. 2845-2857, 2015.

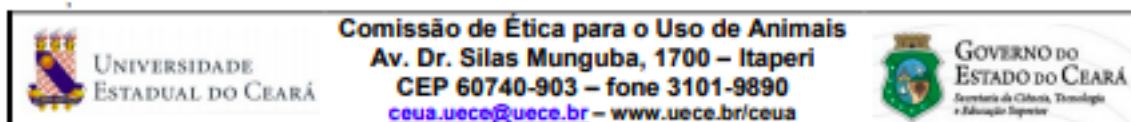
WEIDINGER, S.; BECK, L. A.; BIEBER, T.; KABASHIMA, K.; IRVINE, A. D. Atopic Dermatitis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.

WERFEL, T. The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. **Journal of Investestigative Dermatology**, v. 129, p. 1878–1891, 2009.

YASUKAWA, K.; SAITO, S.; KUBO, T.; SHIBASAKI, Y.; YAMAOKA, K.; HACHIMURA, H.; KYUAMA, T.; AMIMOTO, A.; KUMATA, T.; KITAHARA, Y.; UNO, T.; KADOYA, M.; SAITO, S.; KATO, K.; SHIMODA, T. Low-dose recombinant canine interferon-gamma for treatment of canine atopic dermatitis: An open randomized comparative trial of two doses. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 41–48, 2010.

ANEXO

ANEXO A – CERTIFICADO CEUA

**CERTIFICADO**

Certificamos que o Projeto intitulado "**Avaliação da resposta imune-inflamatória sistêmica e tecidual na dermatite atópica canina**" registrado sob o número **9140062/2018**, tendo como pesquisador principal **Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotados pela **Comissão de Ética para o Uso de Animais da Universidade Estadual do Ceará (CEUA – UECE)**. Este certificado expira-se em 31 de dezembro de 2020.

CERTIFICATE

We hereby certify that the Project entitled "**Avaliação da resposta imune-inflamatória sistêmica e tecidual na dermatite atópica canina**" registered with the protocol **9140062/2018**, under the supervision of **Diana Célia Sousa Nunes Pinheiro** is in agreement with Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the **Ethics Committee in Animal Experimentation of Ceará State University (CEUA – UECE)**. This certificate will expire on December 31st, 2020.

RESUMO

Vigência do projeto	1º de dezembro de 2018 a 30 de novembro de 2019
Espécie/linhagem	<i>Canis familiaris</i> (cão doméstico)
Número de animais	6 meses a 8 anos de idade/ 2 a 30 Kg
Peso/idade	15
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Clínica particular

Fortaleza, 30 de junho de 2019.

Maria Erivalda Farias de Aragão
Presidente CEUA-UECE