



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

“O *STRESS* OXIDATIVO NA DERMATITE ATÓPICA CANINA: VITAMINA E COMO BIOMARCADOR DURANTE TERAPÊUTICA COM CICLOSPORINA”

SUSANA PATRÍCIA SOARES DA SILVA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte
Correia

Doutor Mário Alexandre Gonçalves
Quaresma

Doutora Ana Mafalda Gonçalves
Xavier Félix Lourenço

ORIENTADORA

Doutora Ana Mafalda Gonçalves
Xavier Félix Lourenço

2018
LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

“O STRESS OXIDATIVO NA DERMATITE ATÓPICA CANINA: VITAMINA E COMO BIOMARCADOR DURANTE TERAPÉUTICA COM CICLOSPORINA”

SUSANA PATRÍCIA SOARES DA SILVA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutor José Henrique Duarte
Correia
Doutor Mário Alexandre Gonçalves
Quaresma
Doutora Ana Mafalda Gonçalves
Xavier Félix Lourenço

ORIENTADORA

Doutora Ana Mafalda Gonçalves
Xavier Félix Lourenço

2018
LISBOA

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Devo um sem fim de agradecimentos aos meus pais, que ao longo de 27 anos me deram tudo o que podiam e não podiam e em tudo se esforçaram para que eu conseguisse alcançar os meus objetivos. Obrigada pelos sacrifícios que fizeram por mim, por serem quem são e por terem em muito contribuído para eu ser quem sou. Obrigada mana Inês por, depois de muito teres sido pedida, teres surgido na minha vida, para me ensinares a ser uma pessoa melhor. Obrigada pelos teus conselhos, pelo teu amor incondicional (muito disfarçado) e por todos os momentos que passamos e passaremos juntas. Obrigada Carlitos, por todo o apoio, por todo o carinho e amor e por me teres acompanhado em todo o percurso. Primeiro como namorado, depois como noivo e sempre como companheiro de uma vida. Obrigada por tentares que ultrapasse sempre os meus receios e por me dares força para conseguir transformar tudo numa minúscula pedra no caminho.

Obrigada a todos os Professores com quem tive oportunidade de aprender, antes do curso de Medicina Veterinária e durante o curso, com especial destaque para a Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço, que tanto me ensinou. Ensinou-me tudo o que sei sobre Dermatologia, mas também muito do que fiquei a saber sobre como acarinhar o animal e o tutor. Gostava que todos os futuros Médicos Veterinários aprendessem a fazer contigo um relatório, a ver uma citologia ao microscópico, a fazer testes intradérmicos e a viver os casos, como o fazes, procurando informação até oferecer uma resposta, mesmo nos casos onde não parece haver nenhuma. Obrigada por todo o apoio que deste ao meu projeto. Obrigada por seres maravilhosa e me teres dado a conhecer tanto. Obrigada a toda a *dream dermat team*, em especial à Joana Cardoso que tanto me ajudou, nos meus primeiros passos na dermatologia e em todos os passos do meu projeto, em cada segundo que eu precisei, estiveste sempre lá, um eterno obrigada por isso. Obrigada à Lúcia por fomentar o espírito de entreajuda da nossa equipa.

Obrigada Professora Doutora Berta São Braz pela disponibilidade mesmo fora de horas. Obrigada por tudo o que me ensinou e por me ter estimulado sempre a ser melhor. Obrigada ao Professor Doutor Mário Quaresma, pela troca de ideias que esteve na base deste projeto. Obrigada ao Professor Doutor José Prates e à Doutora Cristina Alfaia por me ter ajudado com o protocolo laboratorial e por todo o tempo que cederam no apoio a essa importante etapa. Obrigada ao Dr. Telmo Nunes pela ajuda na análise estatística dos dados e, principalmente, por me ter ensinado a trabalhar com o R.

Obrigada a todos os elementos do Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, pelo muito que me ensinaram. De cada turno, saí sempre cansada, mas muito mais rica. Obrigada ao Dr. Gonçalo Vicente por ter sido, não só um modelo, mas um companheiro. Por tantos momentos e por tantos ensinamentos. Obrigada à Dr.^a Ana Isabel Filipe e à Dr.^a Maria Inês Marques, por quererem a minha pequena ajuda

sempre e por me terem ensinado tanto. Obrigada ao Dr. Ricardo Ferreira, pela paciência com que explicava o que era difícil de entender e por valorizar a minha opinião quando a temática era cutânea. Obrigada ao Dr. Ricardo Marques, por me mostrar como ser um grande médico veterinário, até para com os colegas de trabalho. Obrigada à Dr.^a Joana Pontes pela paciência de explicar o mesmo várias vezes e tentar tornar o invisível, visível. Obrigada à Dr.^a Ana Murta e ao Dr. Rodrigo Bom por me terem feito estudar mais e me terem dado liberdade para fazer muito. Obrigada à Dr.^a Joana Almeida por me ter ensinado a pôr fim ao sofrimento, quando não há outro caminho. À Dr.^a Joana Gomes, o meu agradecimento sobre o que me ensinou sobre os vários casos com que nos deparámos no internamento. Obrigada Dr.^a Diana Conceição por tentares estimular o interesse na área da tua paixão. À Dr.^a Mariana Pereira e Dr.^a Ana Reinho, um obrigada por todos os ensinamentos na área dos exóticos. Obrigada por toda a partilha do vosso vasto conhecimento. À Dr.^a Leonor Iglésias, obrigada por estimular o pensamento crítico e a minha melhoria enquanto futura profissional. Obrigada Dr.^a Daniela Matias pelo que me ensinaste sobre dermatologia e pela ajuda no acompanhamento dos animais do meu projeto. À Dr.^a Maria Alexandra Basso e à Dr.^a Carla Monteiro, o meu obrigado pela paciência nas explicações. Obrigada à Dr.^a Ana Carvalho por todas as partilhas e desabafos. Obrigada ao Dr. Óscar Gamboa, Dr. António Almeida, à Professora Doutora Sandra Jesus, ao Professor Doutor António Ferreira, ao Professor Doutor Miguel Carreira e à Professora Doutora Esmeralda Delgado, por tudo o que me ensinaram.

Obrigada a toda a equipa de enfermagem e auxiliares por tanto que me ensinaram, o que me transmitiram não tem limites e os meus agradecimentos nunca serão suficientes. Obrigada por tornarem os turnos de 24 horas mais leves e as horas no internamento em bons momentos. Obrigada à minha Patrícia, à Rita e à Margarida, que tanto me ajudou com o meu grupo controlo. Obrigada à Sandra, à Irina, à Raquel, à Sofia, à Joana, à Carla, ao Pedro, ao Luís e ao Filipe.

Obrigada aos meus colegas de estágio, principalmente ao Rúben, à Joana, à Sophie e ao Ricardo. Obrigada pela companhia nas merecidas pausas e na ajuda sempre que necessário. Obrigada Catarina Duarte pelos teus ensinamentos e pelas gargalhadas e toda a partilha. Foste inspiradora.

Obrigada às pessoas que me acompanharam em todas as aulas, trabalhos e exames, às amigas que vou levar para uma vida: Catarina Mateus, Filipa Lopes, Filipa Paulos e Lília Silva.

RESUMO

Silva, S.P.S. (2018) O *stress* oxidativo na dermatite atópica canina: vitamina E como biomarcador durante terapêutica com ciclosporina.

A dermatite atópica canina é uma doença que afeta um grande número de animais, sendo que se estima que 10 a 15% da população canina esteja afetada. É uma doença de etiologia multifatorial e de apresentações clínicas diversas, embora haja uma distribuição lesional característica. Recentemente foi demonstrado que o *stress* oxidativo apresenta um papel importante na dermatite atópica no Homem e também que os níveis serológicos de vitamina E (α -tocoferol), importante antioxidante, encontram-se alterados em cães com a doença. É expectável que cães com a doença menos controlada apresentem um maior *stress* oxidativo e, assim, níveis serológicos de α -tocoferol inferiores.

No presente estudo, foram acompanhados cães com dermatite atópica sob terapêutica com ciclosporina, monitorizados quanto ao estadio clínico através da classificação do prurido, do CADESI-04 e do teor de α -tocoferol em intervalos de 3 semanas. Tanto quando sabemos, este foi o primeiro estudo que avaliou o teor de α -tocoferol ao longo do tempo. Os resultados apresentados revelam que cães saudáveis apresentam um teor de α -tocoferol superior a canídeos com dermatite atópica, o que espelha uma resposta adaptativa que leva à distribuição de α -tocoferol no tecido alvo, reduzindo a sua concentração sérica. Foi possível também sugerir uma associação entre o aumento plasmático de α -tocoferol e a diminuição da classificação do prurido. Este é o sinal clínico da doença que mais afeta a qualidade de vida e contribui indiretamente para o agravamento dos defeitos na barreira cutânea consequentemente facilitando a presença de infeções e o aumento do estado inflamatório, aumentando o *stress* oxidativo. O controlo do prurido com recurso à ciclosporina resulta então também num maior equilíbrio no consumo de antioxidantes. Não foram encontradas diferenças significativas que permitissem concluir a existência de uma relação entre o teor de α -tocoferol e o CADESI-04.

Este estudo permite fundamentar a utilização do α -tocoferol como agente objetivo de monitorização da dermatite atópica canina, o que pode ser particularmente importante se aplicado em estudos de monitorização clínica. Levanta-se ainda a possibilidade lógica do controlo do *stress* oxidativo, com recurso à suplementação com antioxidantes, como a vitamina E.

Palavras-chave: dermatite atópica canina, ciclosporina, *stress* oxidativo, vitamina E, α -tocoferol.

ABSTRACT

Silva, S.P.S. (2018) Oxidative stress in canine atopic dermatitis: vitamin E as a biomarker during cyclosporine therapeutics.

Canine atopic dermatitis is a disease that affects a large number of animals, as 10 to 15% of the canine population is likely to be affected. It's a disease with multifactorial aetiology and multiple clinical presentations, although there is a characteristic lesion distribution. It has recently been shown that oxidative stress plays a major role in human atopic dermatitis and the important antioxidant vitamin E (α -tocopherol) plasmatic levels are altered in dogs with the disease. Dogs with less controlled disease are expected to exhibit increased oxidative stress and thus lower α -tocopherol serologic levels.

In the present study, dogs with atopic dermatitis were monitored during cyclosporine treatment regarding atopic dermatitis severity using accepted criteria namely: pruritus score and CADESI-04 and also α -tocopherol levels at 3-week intervals. As far as we know, this is the first study to assess α -tocopherol levels over time in canine atopic dermatitis. The results show that healthy dogs have a superior α -tocopherol plasmatic level than dogs with atopic dermatitis, which reflects an adaptive response that leads to α -tocopherol distribution in target tissues, reducing its serological concentration. It was possible to suggest a relation between the increase of α -tocopherol and the reduction of the pruritus score. Pruritus is the hallmark of atopic dermatitis and profoundly affects the life quality and indirectly contributes to skin barrier defects deterioration. This will contribute to yeast and bacteria overgrowth and to increase the inflammatory status, therefore increasing oxidative stress. Controlling pruritus with cyclosporine also results in a better balance regarding antioxidants consumption. No significant differences were found between α -tocopherol levels and CADESI-04 for any time point.

This study supports the use of α -tocopherol as an objective mean to monitor canine atopic dermatitis in clinical studies. It's further suggested that supplementation with antioxidants, such as vitamin E, is relevant for the control of oxidative stress.

Key-words: canine atopic dermatitis, cyclosporine, oxidative stress, vitamin E, α -tocopherol.

ÍNDICE

CAPÍTULO I. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO	1
1. Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa	1
2. Centro Veterinário de Berna	3
3. Formações.....	4
CAPÍTULO II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
1. Introdução.....	5
2. Incidência e prevalência da dermatite atópica canina	6
3. Fisiopatologia da dermatite atópica canina	7
3.1. Barreira cutânea	7
3.1.1. Alterações na barreira cutânea	8
3.1.2. A barreira cutânea, o <i>stress</i> oxidativo e a dermatite atópica.....	9
3.1.3. A barreira cutânea, a vitamina E e a dermatite atópica.....	10
3.2. Sistema Imunitário	11
3.3. Fatores genéticos	12
3.4. Fatores ambientais	13
3.5. A infeção cutânea e a dermatite atópica	14
3.5.1. O papel de <i>Staphylococcus</i>	14
3.5.2. O papel de <i>Malassezia</i>	15
3.6. A dermatite atópica e as reações cutâneas adversas ao alimento	15
3.7. Fatores perpetuantes	16
3.7.1. Auto-traumatismo	16
3.7.2. <i>Stress</i>	16
4. Manifestações clínicas	17
4.1. Idade de aparecimento dos primeiros sinais clínicos	17
4.2. Predisposição de género.....	17
4.3. Predisposição rácica	18
4.4. Sazonalidade	18
4.5. Ambiente	18
4.6. Distribuição anatómica do prurido e lesões.....	18
4.7. Avaliação da gravidade lesional e do prurido.....	19
5. Diagnóstico.....	20
5.1. Diagnósticos diferenciais.....	20
5.2. História pregressa e critérios de avaliação.....	21
6. Tratamento	22
6.1. Terapêutica etiológica	23
6.2. Terapêutica sintomática	24

6.2.1. Ciclosporina	25
6.2.2. Glucocorticóides e tacrolimus	26
6.2.3. Oclacitinib	27
6.2.4. Melhoria da barreira cutânea	27
6.2.5. Outras moléculas	28
6.3. Terapêutica antimicrobiana e antifúngica	29
6.4. Outras medidas terapêuticas	30
6.4.1. Terapêutica antioxidante	30
7. Poderá o <i>stress</i> oxidativo ser um fator importante na dermatite atópica canina?	32
7.1. Alguns conceitos sobre <i>stress</i> oxidativo	33
CAPÍTULO III. O <i>STRESS</i> OXIDATIVO NA DERMATITE ATÓPICA CANINA: VITAMINA E COMO BIOMARCADOR DURANTE TERAPÊUTICA COM CICLOSPORINA	36
1. Introdução	36
2. Objetivos	36
3. Materiais e métodos	36
3.1. População em estudo	36
3.2. Dignóstico de DAC	38
3.3. Terapêutica com ciclosporina	38
3.4. CADESI-04	38
3.5. Classificação do prurido	39
3.6. Desenho do estudo	39
3.7. Determinação da vitamina E	40
3.8. Análise estatística	41
4. Resultados	42
4.1. Caracterização da amostra	42
4.1.1. Caracterização do grupo de animais com DAC	42
4.1.2. Caracterização do grupo controlo	45
4.2. Teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$)	45
4.3. CADESI-04	48
4.4. Classificação do prurido	49
4.5. Teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) e CADESI-04	52
4.6. Teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) e o prurido	53
5. Discussão	54
6. Limitações do estudo e algumas considerações	59
7. Conclusões e perspetivas futuras	61
BIBLIOGRAFIA	62
ANEXO 1. CADESI-04	81
ANEXO 2. Materiais e método para determinação do teor de α -tocoferol (16 amostras)	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração com a distribuição do padrão lesional na dermatite atópica canina da autoria de C. Domingos. Fonte: original, 2018.	19
Figura 2. Mecanismos de ação da CsA na DAc (adaptado de Olivry, T., comunicação “CAD: systemic therapy: broad or narrow anti-inflammatory targets?”, ESVD Therapeutics Workshop Davos, Março 22, 2018)..	26
Figura 3. Esquema com os momentos de avaliação do presente estudo.	40

ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Boxplot da distribuição do teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) nos grupos controlo e com DAc (T0, T1, T2 e T3).	46
Gráfico 2. Evolução do teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) ao longo das consultas no grupo de cães com DAc.	51
Gráfico 3. Evolução da classificação do CADESI-04 ao longo das consultas no grupo de cães com DAc.	51
Gráfico 4. Evolução da classificação do prurido ao longo das consultas no grupo de cães com DAc.	51

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição das horas de estágio pelos diferentes serviços no HE da FMV-UL. ...	1
Tabela 2. Critérios para o diagnóstico de DAc, segundo Favrot (2010).	22
Tabela 3. Critérios de inclusão e exclusão de animais no grupo com DAc.	37
Tabela 4. Critérios de inclusão e exclusão de animais no grupo controlo.	38
Tabela 5. Gravidade das manifestações clínicas da DAc segundo o CADESI-04.	39
Tabela 6. Caracterização dos animais com DAc.	43
Tabela 7. Distribuição de animais com DAc por género.	44
Tabela 8. Distribuição de animais com DAc por raça.	44
Tabela 9. Distribuição etária dos animais com DAc incluídos no estudo.	45
Tabela 10. Caracterização dos cães incluídos no grupo controlo.	45
Tabela 11. Teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) no grupo de cães com DAc ao longo do tempo.	47
Tabela 12. Teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) no grupo controlo.	47
Tabela 13. CADESI-04 no grupo de animais com DAc ao longo do tempo.	49
Tabela 14. Classificação do prurido no grupo de animais com DAc ao longo do tempo.	50
Tabela 15. Teor de α -tocoferol nos momentos em que o valor do CADESI-04 obtido foi máximo e mínimo.	52
Tabela 16. Teor de α -tocoferol nos momentos em que a CP obtida foi máxima e mínima.	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ARNm – Ácido ribonucleico mensageiro

α -TTP – alfa-Tocoferol Transferase

BID – *bis in die*

CADESI – *Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index*

CAFR – *Cutaneous Adverse Food Reactions* (Reações cutâneas adversas ao alimento)

CP – Classificação do Prurido

CsA – Ciclosporina A

DA – Dermatite Atópica

DAC – Dermatite Atópica canina

DAh – Dermatite Atópica humana

FMV-UL – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

GPX – Glutathione Peroxidase

HE – Hospital Escolar

HPLC – *High performance liquid chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)

ID – Identificação

IFN- γ – Interferão- γ

Ig – Imunoglobulina

IL – Interleucina

ITAE – Imunoterapia alérgico-específica

ITFCAD – *International Task Force on Canine Atopic Dermatitis*

JAK – *Janus Associated Kinases*

MDA – Malondialdeído

MRSP – *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes à metilina

N/A – Não Aplicável

O_2^- – Radical superóxido

OH^- – Ião hidróxido

8-OHdG – 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina

PRR – *Pattern Recognition Receptors* (receptores de reconhecimento de padrões)

RL – Radicais livres

SCORAD – *SCORing Atopic Dermatitis*

SID – *Semel in Die*

SOD – Superóxido Dismutase

SRD – Sem Raça Definida

T0 – Tempo 0 de avaliação (antes do início da toma de ciclosporina)

T1 – Tempo 1 de avaliação (3 semanas após o início da toma de ciclosporina)

T2 – Tempo 2 de avaliação (6 semanas após o início da toma de ciclosporina)

T3 – Tempo 3 de avaliação (9 semanas após o início da toma de ciclosporina)

Th – *T helper*

TNF- α – *Tumor Necrosis Factor-alpha* (Fator de necrose tumoral-alfa)

Treg – Células T reguladoras

VE – Vitamina E

CAPÍTULO I. DESCRIÇÃO DAS ATIVIDADES DE ESTÁGIO

O estágio curricular foi realizado no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, na área de medicina e cirurgia de animais de companhia, sob orientação científica da Ex.^{ma} Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço, com a duração de seis meses, compreendidos entre o dia 1 de Setembro de 2014 e 28 de Fevereiro de 2015, num total de 1090 horas de trabalho. Posteriormente, foi mantido o acompanhamento das consultas de dermatologia nesta instituição, entre o dia 1 de Março de 2015 e 30 de Junho de 2015. Foi também realizado um estágio extracurricular no Centro Veterinário de Berna, na área de medicina e cirurgia de animais de companhia, compreendidos entre o dia 16 de Março de 2015 e 23 de Abril de 2015.

1. Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa

O estágio realizado no Hospital Escolar (HE) foi organizado num esquema rotacional entre os serviços de medicina interna, internamento e cirurgia e a respetiva carga horária pode ser consultada na tabela 1.

Tabela 1. Distribuição das horas de estágio pelos diferentes serviços no HE da FMV-UL.

Serviço	Tempo despendido (horas)
Medicina Interna e Consultas de Especialidade	566
Internamento	362
Cirurgia	162
Total	1090

- Medicina Interna

Em medicina interna, era da responsabilidade da estagiária a receção e pesagem dos animais, a recolha da anamnese, incluindo o estímulo iatotrópico e a realização do exame físico completo. Após este procedimento e completa descrição das informações recolhidas no sistema informático, era feita a apresentação do caso clínico ao médico veterinário responsável pela consulta. Sempre que possível, eram discutidos diagnósticos diferenciais, eventuais exames complementares a realizar e possíveis terapêuticas a instituir. Em consulta, foi dada à estagiária a oportunidade de realizar vários procedimentos, tais como a colheita de sangue para análise, cateterização venosa e aplicação do sistema de venoclise e preparação e administração de vacinas. Foi também possível acompanhar ativamente vários procedimentos e exames de diagnóstico. Sempre que necessário, e de forma a dar

continuidade ao atendimento do animal, este era acompanhado no serviço de imagiologia. Após a conclusão do exame, era feita a discussão das alterações imagiológicas detetadas e respetiva relevância clínica. Ainda no serviço de imagiologia, a estagiária teve oportunidade de auxiliar na monitorização do animal durante e após a anestesia necessária à realização da tomografia axial computadorizada. No que respeita à ecografia, a estagiária teve a oportunidade de assistir a ecografias e a procedimentos ecoguiados, dos quais são exemplo a cistocentese.

- Consultas de Especialidade

A maioria das consultas de especialidade acompanhadas foram da área de dermatologia e de oncologia. Ademais, foi possível acompanhar um menor número de consultas de animais exóticos, oftalmologia, ortopedia e neurologia.

Em dermatologia, foi feito o acompanhamento das consultas da Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço, sendo realizada a receção e pesagem dos animais, a recolha da anamnese, incluindo o estímulo iatotrópico, a realização do exame dermatológico e exames complementares de diagnóstico considerados mais apropriados, nomeadamente citologias cutâneas e auriculares, raspagens cutâneas e tricogramas. Sempre que possível eram discutidos diagnósticos diferenciais, eventuais exames complementares a realizar e possíveis terapêuticas a instituir. A estagiária também esteve ativamente envolvida na elaboração do relatório da consulta e esclarecimento do tutor. Neste serviço foi possível acompanhar e realizar testes intradérmicos alérgico-específicos, protocolos *Rush* para o início da imunoterapia alérgico-específica, maneo de feridas, biópsias de pele, punções aspirativas com agulha fina, observações com lâmpada de Wood e videoscopias.

Em oncologia, para além do acompanhamento das consultas do Dr. Gonçalo Vicente, foi possível participar nas sessões de quimioterapia. Nos dias preconizados para este efeito, os estagiários eram responsáveis pelo acompanhamento até à sala destinada para as sessões de quimioterapia, onde os animais usualmente eram cateterizados e era realizada uma colheita de sangue para realização de hemograma. Sempre que necessário, era aplicado o sistema de venóclise. A estagiária acompanhava a realização do hemograma e deslocação ao laboratório equipado com câmara de fluxo laminar para preparação dos quimioterápicos adequados para cada animal. De seguida, procedia-se à sua administração.

- Internamento

No internamento, de acordo com a informação transmitida pelo Médico Veterinário assistente, bem como pelo Enfermeiro Veterinário e/ou pelo Técnico Auxiliar, a estagiária era responsável pelo acompanhamento dos animais internados, nomeadamente no que toca à prestação de cuidados de higiene e alimentação. Periodicamente era realizada a

monitorização dos animais, bem como a preparação e administração de fármacos. A estagiária participou ativamente também em muitos outros procedimentos, tais como planificação e monitorização da fluidoterapia, colheita de sangue, urina ou outras amostras para análise, limpeza e desinfeção de feridas. Estes mesmos procedimentos, sempre que tal era requerido, foram executados no internamento destinado a animais com doenças infetocontagiosas. Foi feito o acompanhamento de animais em período pós-cirúrgico ou recobro após anestesia geral, acompanhamento de animais em câmara de oxigénio e administração de oxigénio, realização de curvas de glicemia, testes de supressão com dexametasona em dose baixa e monitorização durante transfusão sanguínea.

Foi também possível acompanhar as visitas dos tutores aos animais internados, com esclarecimento de dúvidas, sempre que tal se justificasse, bem como dar a alta aos animais internados, com esclarecimento dos tutores sobre o plano terapêutico.

- **Cirurgia**

No período de acompanhamento da equipa cirúrgica, foi possibilitada a participação em consultas pré e pós-cirúrgicas, onde eram também esclarecidas quaisquer eventuais dúvidas dos tutores. Foi possível participar ativamente em todos os procedimentos relacionados com a preparação pré-cirúrgica dos pacientes.

Durante a cirurgia, foram ocupados cargos de anestesista, ajudante de cirurgião ou circulante. Enquanto anestesista, foi requerido um controlo do plano anestésico do paciente, com recurso à avaliação dos sinais vitais. Enquanto ajudante de cirurgião, foi possível assistir e intervir numa grande variedade de procedimentos cirúrgicos, que compreenderam, na sua maioria, destartarizações e cirurgias de tecidos moles, tais como ovariohisterectomias, orquiectomias e nodulectomias. Foi também possível presenciar procedimentos ortopédicos e cirurgia oftalmológica.

Durante o período de permanência neste serviço, foi também possível acompanhar endoscopias, nomeadamente gastroscopias e videotoscopias.

No final da cirurgia, era feito o acompanhamento durante o recobro e, esporadicamente, foi também necessário contactar os tutores e informar como correu a cirurgia e qual o plano de alta do animal. A estagiária esteve também envolvida no planeamento da terapêutica pós-cirúrgica e prescrição da mesma, com supervisão do Médico Veterinário Cirurgião responsável pelo caso clínico.

2. Centro Veterinário de Berna

O Centro Veterinário de Berna é um hospital especializado direccionado para a área da Oncologia, oferecendo ainda serviços de Medicina Interna, Internamento, Cirurgia e

Consultas de Especialidade noutras áreas, como a Dermatologia e a Fisioterapia. Possui um pequeno laboratório próprio e um serviço de Urgências 24 horas.

A estagiária realizou um turno noturno por semana, entre as 00h00 e as 8h00, sendo que nos restantes dias o seu horário era diurno e de forma a acompanhar o maior número de procedimentos e consultas possível.

A estagiária assistiu a consultas de medicina interna e consultas de especialidade, com maior frequência da área de oncologia, acompanhou procedimentos cirúrgicos, também com maior relevo para os procedimentos cirúrgicos na área da oncologia, tendo participado sempre que possível como ajudante de Médico Veterinário Cirurgião, ajudante de Médico Veterinário Anestesiologista ou circulante.

Esteve também presente no internamento, para a realização de monitorizações programadas e também para acompanhamento no recobro.

A estagiária pode assistir e dar apoio à preparação de quimioterápicos. Também participou ativamente na obtenção de resultados de análises como hemograma e bioquímicas e acompanhou a preparação das amostras e respetivo diagnóstico citológico de punções de agulha fina, sempre que as mesmas eram analisadas em laboratório próprio.

No que toca à área de imagiologia, a estagiária pode acompanhar a realização de radiografias, ecografias abdominais e ecocardiografias.

3. Formações

A estagiária teve a possibilidade de assistir às aulas da disciplina opcional “Abordagem à dermatologia baseada na evidência”, que contribuiu para a sistematização dos conhecimentos já adquiridos nesta área e para a obtenção de outros que, por questões de casuística, foram menos abordados.

A estagiária participou ainda na organização de uma ação de Formação em Dermatologia, enquadrada no I Curso de Pós-Graduação denominado “Estratégias Terapêuticas em Animais de Companhia”, na Faculdade de Medicina Veterinária. Foi-lhe também possível assistir à maioria das palestras desta ação de formação.

CAPÍTULO II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Introdução

A pele é o maior órgão do corpo, representando 12% do peso corporal de um cão adulto. Em clínica de animais de companhia, o estímulo iatrogénico mais frequente são problemas do foro dermatológico. Desses, o mais comum é a dermatite atópica canina (DAc), que pode ser definida como uma doença dermatológica do foro alérgico, pruriginosa e inflamatória, com predisposição genética e com apresentação clínica característica associada a anticorpos do tipo IgE, direcionados normalmente contra alérgenos ambientais (Halliwell, 2006). Para além dos fatores genéticos que levam à maior predisposição para o desenvolvimento da doença, as alterações na barreira cutânea, que originam um maior contacto com antígenos ambientais, as alterações no sistema imunitário, as infeções microbianas e também o *stress* oxidativo estão envolvidos na patogénese da doença. A pele está em permanente contacto com agentes oxidantes e, quando a barreira cutânea não se encontra íntegra, maior é a susceptibilidade do organismo a lesões oxidativas. Nas últimas décadas, o *stress* oxidativo tem mesmo sido documentado como responsável por um papel importante na doença, sendo sugerida uma relação entre a gravidade das manifestações clínicas da doença e a extensão de lesão oxidativa nas membranas celulares. A vitamina E é um antioxidante lipossolúvel e o seu efeito clássico é reduzir e prevenir lesões oxidativas nos tecidos. A homeostase desta vitamina encontra-se alterada em pacientes com a doença, espelhando uma resposta adaptativa que leva à distribuição de VE no tecido alvo, reduzindo a sua concentração sérica (Kapun et al., 2013).

A DAc é assim uma doença multifatorial, que pode ter manifestações clínicas muito diferentes e para a qual não existe uma solução terapêutica única que tenha o mesmo resultado em todos os pacientes, sendo que hoje é sugerido inclusive que diferentes endotipos podem apresentar respostas terapêuticas diversas e eventualmente até previsíveis face a determinados fármacos. O maior conhecimento da diversidade de apresentações e da realidade de que não existe uma forma terapêutica que sirva a todo e qualquer um dos pacientes estimula o estudo e desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e requer a implementação de práticas terapêuticas personalizadas.

Sendo uma doença muito estudada devido à complexidade da sua fisiopatologia e impacto na qualidade de vida dos animais e tutores, espera-se que continuem a ser descobertas novas moléculas. Quanto mais específicos os seus efeitos, como é o caso do oclacitinib, um fármaco inibidor das JAK (*Janus Associated Kinases*) usado para o controlo do prurido, mais relevante se torna a utilização de métodos adicionais de monitorização objetiva da doença em si e não apenas da sua face mais visível, o prurido. De facto, este pode por vezes funcionar como a ponta de um iceberg, tornando óbvia a doença uma vez ultrapassado o limiar de prurido.

2. Incidência e prevalência da dermatite atópica canina

A DAC é considerada a segunda causa mais frequente de prurido em cães, seguindo a dermatite alérgica à picada da pulga (Tarpataki, Pápa, Reczigel, Vajdovich & Vörösi, 2006; Chesney, 2011). Atualmente, não existem dados suficientes que permitam a obtenção da prevalência e incidência da DA em toda a população canina. A verdadeira prevalência é difícil de determinar, uma vez que os casos mais ligeiros são muitas vezes controlados com recurso a terapêutica de alívio sintomatológico, sem existir necessidade de averiguar qual a doença subjacente e algumas manifestações de DAC não são reconhecidas como tal por tutores e por médicos veterinários, tal como a otite crónica, a conjuntivite e as infeções bacterianas e por *Malassezia* (Hillier & Griffin, 2001). Ainda assim, estima-se que a prevalência da DAC seja de 10% a 15% e tenha vindo a aumentar nas últimas décadas, tal como tem acontecido com a dermatite atópica humana (Hillier & Griffin 2001; Scott, Miller & Griffin, 2001; Marsella & Girolomoni, 2009; Marsella & Olivry, 2003; Tarpataki et al., 2006; Renert-Yuval & Guttman-Yassky, 2017). Este aumento tem vindo a ser explicado através da “hipótese de higiene”, defendida por Strachan (1989), já que a melhoria das condições de higiene pode estar na origem de um menor número de infeções numa fase inicial da vida, sendo que o autor defende que estas últimas seriam responsáveis por prevenir o desenvolvimento de doenças alérgicas. Em paralelo, foi feita a mesma comparação relativamente ao contacto com parasitas (Holt, 2000), sendo defendido que as infeções parasitárias possam ter um efeito protetor face ao desenvolvimento da doença (Zwickl et al., 2018). Posteriormente, foi defendido que a presença de microrganismos patogénicos seria responsável por promover a ativação de células dendríticas e células T, para que desta forma, existisse o controlo de reações inflamatórias inapropriadas, características das doenças alérgicas (Rook & Brunet, 2005). A associação da menor exposição a agentes bacterianos e parasitários, bem como o aumento do número de banhos e o uso de produtos inadequados, poderá ser também uma causa para a alteração da barreira cutânea (Miller et al., 2013).

Contudo, existe também a hipótese deste aumento estar relacionado com a maior sensibilidade da classe médico-veterinária para esta doença, resultando num diagnóstico mais frequente (Marsella & Girolomoni, 2009). Por outro lado, é também possível que se possa atribuir este aumento à diferença do estilo de vida dos animais de companhia, dado que os cães passam cada vez mais tempo dentro de casa, aumentando a sua exposição a alergénios presentes nestes ambientes, como os ácaros do pó (Marsella & Girolomoni, 2009). Pode ainda ponderar-se que o aumento da ligação emocional entre os tutores e os respetivos animais de companhia possa contribuir para um mais frequente encaminhamento para o médico veterinário ou ainda que o aumento da popularidade de raças com predisposição para o desenvolvimento de DAC, possa conduzir ao aumento da prevalência

da doença (Sousa & Marsella, 2001; Miller et al., 2013). Ademais, a vacinação dos cachorros está grandemente difundida, o que poderá aumentar a produção de anticorpos IgE e a prática de desparasitação interna e externa é cada vez mais comum.

3. Fisiopatologia da dermatite atópica canina

Como já foi anteriormente referido, a DAc resulta da interação entre fatores genéticos, imunológicos e ambientais. Trata-se de uma doença com elevada complexidade genética e fisiopatológica (Bieber, 2010), o que resulta num elevado grau de heterogeneidade das manifestações clínicas. Assim sendo, a mesma doença pode ser manifestada de diferentes formas, dependendo do seu fenótipo clínico (Wilhem, Kovalik & Favrot, 2011).

3.1. Barreira cutânea

A pele é um tecido com elevado metabolismo e que tem a maior área de superfície do corpo, tendo um papel preponderante para a homeostase. A pele é constantemente desafiada pelo contacto com uma grande variedade de estímulos ambientais. A primeira linha de defesa é oferecida pela epiderme – a camada mais superficial da pele. A epiderme protege o organismo da perda de água, dos efeitos da exposição aos raios UV, das lesões físicas, das invasões de microrganismos, bem como dos desafios imunológicos. Os queratinócitos são o tipo celular predominante na epiderme e são os responsáveis por oferecer proteção mecânica contra parasitas e microrganismos, bem como formam a primeira linha de defesa imunológica contra alergénios ambientais e microbiológicos (Bangert, Brunner & Stingi, 2011).

Na pele, o sistema imunitário inato é constituído por uma barreira física (estrato córneo e junções intercelulares), celular (queratinócitos, mastócitos, neutrófilos e células apresentadoras de antígenos) e elementos segregados (Clark & Kupper, 2005).

Pelo seu papel de barreira externa, a pele contacta com oxidantes, o que aumenta a sua vulnerabilidade ao desenvolvimento de alterações oxidativas (Ji & Li, 2016). O estrato córneo é a camada da pele mais exposta a todos os fatores ambientais, pelo que é particularmente suscetível. O estrato córneo é constituído por queratinócitos, corneodesmosomas e lípidos intercelulares (Marsella & Samuelson, 2009). Por um processo de diferenciação, os queratinócitos originam corneócitos que se ligam entre si através de corneodesmosomas (Cork et al., 2006). Os lípidos intercelulares encontram-se distribuídos segundo um sistema lamelar, de forma a reter água no estrato córneo, bem como a prevenir a penetração de agentes exógenos (Feingold, 2007).

O controlo do nível de oxidantes é efetuado, não apenas pela limitação da sua produção, como também pela sua eliminação. Os organismos possuem sistemas antioxidantes que

atuam através da eliminação de radicais livres (RL) ou através da limitação dos seus efeitos nefastos. Os antioxidantes podem ser classificados em antioxidantes de baixa ou elevada massa molecular e em antioxidantes lipossolúveis ou hidrossolúveis. Vários antioxidantes atingem o organismo através da alimentação, como o ácido ascórbico, o tocoferol ou os carotenóides. Existem também outros antioxidantes que são sintetizados pelo organismo, como a melatonina ou a glutatona, que tem um papel antioxidante fundamental, já que interagem diretamente com os RL ou podem atuar como cofactor para as enzimas destoxicantes de RL. Contudo, quando a eliminação não é possível, existem sistemas enzimáticos antioxidantes capazes de limitar os efeitos dos RL (Lushchak, 2014).

O sistema antioxidante da pele consiste na presença de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Na primeira categoria podem enumerar-se a glutatona peroxidase (GPX), catalase e superóxido dismutase (SOD) (Matés, Pérez-Gómez & Blanca, 2000). Nos antioxidantes não enzimáticos, podem referir-se o α -tocoferol, β -caroteno, ascorbato e glutatona que também estão presentes nas células (Briganti & Picardo 2003). Devido ao elevado conteúdo lípidico do estrato córneo, é expectável que antioxidantes lipofílicos como o α -tocoferol desempenhem um papel importante durante o *stress* oxidativo.

3.1.1. Alterações na barreira cutânea

Existem vários estudos que alertam para alterações de barreira cutânea em cães com DAC, que aparentam desempenhar um importante papel no desenvolvimento da doença (Marsella & Samuelson, 2009). Foi encontrada uma grande heterogeneidade na distribuição de lípidos no estrato córneo de cães com DAC (Shimada, Yoon, Yoshihara, Iwasaki & Nishifujii, 2009; Popa et al., 2011), além de que foi já detetado um menor conteúdo lípido e uma menor coesão do mesmo no estrato córneo de cães com a doença (Popa et al., 2011). Encontraram-se também evidências de que a pele de cães com DAC tem lípidos em gotículas ao invés de se encontrarem dispersos de modo a preencher os espaços intercelulares (Inman, Olivry, Dunston, Montiero-Rivierre & Gatto, 2001; Marsella & Girolomoni, 2009). Também se observou uma diminuição da quantidade de ceramidas e, em consequência, uma maior perda epitransdérmica de água (Reiter, Torres & Wertz, 2009; Shimada et al., 2009), embora se acredite que uma parte desta diminuição possa ser associada à inflamação cutânea (Stahl, Paps, Bäumer & Olivry, 2012). Foram detetadas alterações na expressão do gene da filagrina em pacientes humanos com DAh, o que leva ao aumento da perda de água, interfere com a estrutura dos queratinócitos e leva ao aumento do pH no estrato córneo (Elias, 2018). Vários estudos foram realizados sobre a DAC e foi sugerido que o catabolismo da filagrina pudesse estar alterado em cães com DAC (Fanton, Santoro, Corneigliani & Marsella, 2017). Foram também encontradas alterações na expressão do ARNm da filagrina em canídeos com a doença (Santoro, Marsella, Ahrens,

Graves & Bunick, 2013), no entanto, estas também se verificaram em cães sem a doença pelo que são necessários mais estudos para determinar o papel da filagrina na DAc (Roque, O'Leary, Kyaw-Tanner, Duffy & Shipstone, 2011). Uma vez que não foi ainda encontrada uma relação entre estas alterações e a gravidade de sinais clínicos apresentados, a relevância clínica destes dados é assim desconhecida (Marsella, 2013a), ainda que seja defendido que estas alterações sejam apenas associadas a determinadas raças e em localizações concretas, não sendo possível extrapolar para toda a população canina (Wood, Ollier, Nuttall, McEwan & Carter, 2010). Foi também demonstrada uma menor expressão de genes associados à formação da barreira cutânea em cães com DAc (Merryman-Simpson et al., 2008). Várias proteínas das *tight junction* também demonstraram ter uma expressão reduzida em cães com a doença (Halliwell, 2009; Marsella, 2013b; Nishifuji & Yoon, 2013; Nishifuji, 2015; Kim et al., 2016), o que permite uma entrada mais fácil de antigénios e agentes patogénicos (Elias, 2018).

3.1.2. A barreira cutânea, o *stress* oxidativo e a dermatite atópica

A inflamação cutânea na DA é caracterizada histologicamente pela presença de um elevado infiltrado de linfócitos, monócitos e eosinófilos (Gaga, Frew, Varney & Kay, 1991). Estas células libertam substâncias bioativas, citoquinas pro-inflamatórias e RL. A adesão de eosinófilos a células vasculares endoteliais aumenta o nível de RL (Nagata, Sedgwick, Bates, Kita & Busse, 1995). Tanto os mastócitos, que se encontram em maior número na DA, como os monócitos, são capazes de produzir RL (Polla, Ezekowitz & Leung, 1992). Os RL aparentam estar relacionadas com a patogénese da inflamação alérgica (Nagata et al., 1995; Henderson & Kaliner, 1978; Polla et al., 1992), podendo desencadear lesões oxidativas a lípidos, proteínas e ADN (Valko et al., 2007; Briganti & Picardo, 2003). Desta forma, o aumento da produção de RL pode ser uma das causas de lesão tissular na DA (Tsuboi et al., 1998; Niwa et al., 2003). Em caso de alteração no ADN, os produtos alterados são detetados e eliminados por enzimas de reparação (Simic, 1992), o que significa que o nível destes produtos está relacionado com o equilíbrio entre o ritmo de produção e reparação dos mesmos (Simic, 1992). O biomarcador 8-OHdG traduz as alterações ao ADN resultantes do contacto com radicais OH[•], sendo que pacientes humanos com DAh apresentaram valores significativamente aumentados, comparativamente a grupos controlo, bem como foi determinada uma correlação estatisticamente significativa entre este marcador e o SCORAD (*SCORing Atopic Dermatitis*), que se trata de um método de avaliação da extensão e gravidade das lesões da DAh (Tsuboi et al., 1998). O marcador de peroxidação lipídica malondialdeído (MDA) encontra-se significativamente aumentado em cães com DAc, comparativamente a animais controlo (Kapun, Salobir, Levart, Kotnik & Svete, 2012) e foi encontrada uma correlação estatisticamente significativa entre este marcador e o CADESI-

03, o que sugere uma associação entre a gravidade da manifestação clínica da doença e a extensão de lesão oxidativa nas membranas lipídicas (Kapun et al., 2012).

3.1.3. A barreira cutânea, a vitamina E e a dermatite atópica

Para além das alterações verificadas a nível do aumento da oxidação, também os antioxidantes sofrem alterações na presença da DA. A VE é o antioxidante predominante no estrato córneo no Homem (Thiele, Schroeter, Hsieh, Podda & Packer, 2001), oferecendo proteção maioritariamente contra a peroxidação lipídica (Traber & Atkinson, 2007).

A VE foi descoberta em 1922 e, em 1938 foi caracterizada bioquimicamente, tendo sido designada por tocoferol (Fernholz, 1938). A VE é encontrada em oito formas que incluem quatro tocoferóis (alfa, beta, gama e delta) e quatro tocotrienóis (alfa, beta, gama e delta). Trata-se de um antioxidante lipossolúvel que apenas é sintetizado por plantas e cianobactérias. Como tal, apenas está disponível através da alimentação (Schneider, 2005; Raila, Rohn, Schweigert & Abraham, 2011). É uma das vitaminas mais abrangentemente difundidas e a sua maior fonte são os óleos vegetais, mas podem ser encontradas num grande número de alimentos (Raila et al., 2011; Bunnell, Keating, Quaresimo & Parman, 1965).

A biodisponibilidade da vitamina E pode ser influenciada por vários fatores, como a quantidade de VE da alimentação e de outros nutrientes que estejam relacionados com a sua absorção; as proteínas envolvidas na absorção de VE e as diferenças individuais na eficiência da absorção, que pode ser influenciada por doenças; o metabolismo da VE; fatores relacionados com o estilo de vida; o género; e o polimorfismo genético (Schmölz, Birringer, Lorkowski & Wallet, 2016).

A VE é absorvida no intestino, juntamente com lípidos, formando quilomícrons e entra em circulação através do sistema linfático, sendo transportada até ao fígado. Neste local, a α -TTP seleciona a forma alfa dos tocoferóis, sendo esta a forma que maioritariamente se encontra disponível no plasma. A maioria das formas beta, gama e delta é secretada na biliar ou excretada diretamente nas fezes (Brigelius-Flohé & Traber, 1999). A α -TTP é a responsável por facilitar o transporte de α -tocoferol para as membranas plasmáticas (Schmölz et al., 2016). Aproximadamente 90% do conteúdo corporal de VE é armazenada no tecido adiposo (Schmölz et al., 2016).

O efeito clássico da VE é reduzir e prevenir lesões oxidativas nos tecidos, encontrando-se concentrada nas membranas celulares. É considerada a primeira linha de defesa contra a peroxidação lipídica, protegendo as membranas celulares nas fases iniciais do ataque por radicais livres (Nachbar & Korting, 1995; Wolf, Wolf & Ruocco, 1998; Brigelius-Flohé & Traber, 1999). O α -tocoferol reage com os radicais, impedindo a formação de novos radicais livres e interrompendo a reação em cadeia. É constantemente secretado para a superfície

cutânea, através das células sebáceas. Devido à elevada concentração de gordura no estrato córneo, este antioxidante lipofílico tem um papel preponderante na remoção de RL da pele durante o *stress* oxidativo (Thiele, Weber & Packer, 1999; Thiele 2001; Antille, Sorg, Lübbe & Saurat, 2002). Todos os tecidos dependem dos níveis plasmáticos de VE.

Na DAh foi demonstrado que existem alterações na homeostase da VE (Antille et al., 2002; Hozyasz, Chelchowska, Laskowska-Klita, Ruszkowska & Milanowski, 2004), encontrando-se concentrações significativamente superiores de VE e menores concentrações de peróxidos lipídicos na pele de pacientes com a doença, quando comparados com controlos saudáveis (Antille et al., 2002), o que pode significar que o estímulo oxidativo crónico na DAh pode provocar uma resposta que leva à redistribuição de VE, direcionando-se para o tecido alvo, de forma a reduzir os efeitos da lipoperoxidação (Antille et al., 2002). Por outro lado, Hozyasz et al. (2004) indicaram que não existem diferenças significativas entre o nível plasmático de VE em pacientes humanos com DAh em comparação com indivíduos saudáveis, embora a homeostase da VE se encontre alterada, já que a concentração nos eritrócitos é inferior em pacientes com a doença (Hozyasz et al., 2004). Em cães com DAC foram encontrados níveis plasmáticos significativamente reduzidos de VE quando comparados com animais saudáveis, embora não tenham sido encontradas diferenças significativas nas concentrações de VE na pele (Kapun et al., 2013). Apesar disto, outros artigos não têm demonstrado diferenças significativas dos níveis plasmáticos de VE entre cães com a doença e cães saudáveis (Kapun et al., 2014).

3.2. Sistema Imunitário

O sistema imunitário de pacientes com DA tem sido alvo de inúmeros estudos, sendo que foram detetadas várias alterações tanto no sistema imunitário inato como no sistema imunitário adquirido em indivíduos com DA comparativamente a controlos saudáveis.

O sistema imunitário inato oferece a primeira linha de defesa contra agentes patogénicos (Halliwell, 2009). Estes agentes expressam padrões moleculares ausentes no hospedeiro que o sistema imunitário inato reconhece através dos receptores para reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors* ou *PRR*). Foram detetadas alterações nos *PRR* de pacientes atópicos, sendo possível associar estas anomalias com a incapacidade de controlo das infeções bacterianas (Bieber & Novak, 2009; De Benedetto, Agnihotrei, McGirt, Bankova & Beck, 2009; Halliwell, 2009).

Estudos histopatológicos da pele de pacientes humanos e caninos com DA demonstraram também uma reduzida presença de neutrófilos, mesmo na presença de infeção (Halliwell, 2009). A justificação pode estar associada à diminuição da expressão de uma molécula de adesão em pacientes atópicos (Halliwell, 2009). Uma vez mais, isto poderá tornar os cães com DAC mais susceptíveis a infeções. Os peptídeos antimicrobianos aumentam

grandemente em caso de lesão e apresentam uma atividade antimicrobiana de largo espectro mas, em pacientes humanos e caninos com DA, foram detectadas várias alterações na sua atividade (Santoro et al., 2013).

O sistema imunitário adquirido apresenta mecanismos de defesa que formam uma segunda linha de defesa, sendo mais demorada contra agentes patogénicos do que o sistema imunitário inato (Hill & Olivry, 2001; Bangert et al, 2011). Os cães com DAc apresentam um maior número de células de Langerhans e de células dendríticas na derme, sendo que as primeiras estão significativamente aumentadas em casos de pele lesionada. As células dendríticas com expressão de IgE à superfície desempenham um papel importante na captura e apresentação de antígenos e são observadas em pele lesional ou pele intacta de cães com DAc, mas não em cães sem a doença (Olivry, Moore, Affolter & Naydan, 1996).

Na pele dos cães com DAc predominam citocinas características de uma resposta do tipo Th2 (Olivry, Dean, Tompkins, Dow & Moore, 1999), como a IL-31 que é uma citocina relacionada com o prurido nos cães e que é detetada em animais com DAc (Gonzales et al., 2013; Furue, Yamamura, Kido-Nakahara, Nakahara & Fukui, 2018), existindo uma correlação positiva entre os níveis de circulação de IL-31 e a gravidade da doença (Marsella, Ahrens & Sanford, 2018). Nos pacientes caninos foram ainda encontrados níveis de IL-4, IL-2, IFN- γ e TNF- α significativamente superiores (Nuttall, Knight, McAleese, Lamb & Hill, 2002).

As células T reguladoras (*Treg*) desempenham funções imunossupressoras, impedindo a proliferação de células T alérgico-específicas, bem como a produção de citocinas Th1 e Th2. São também capazes de inibir a produção de IgE. Assim, é sugerido que as células *Treg* tenham um papel preponderante no desenvolvimento de doenças alérgicas (Gambineri, Torgerso & Ochs, 2003; Borrego, Rosa, Algueró, Trindade & Rosado Pinto, 2007; Ogg, 2009; Loser & Beissert, 2012; Beccati, Martini, Comazzi, Fanton, & Cornegliani, 2016).

3.3. Fatores genéticos

A observação clínica permite concluir que a DAc surge mais frequentemente em determinadas raças caninas, o que suporta a componente genética desta doença (Sousa & Marsella, 2001; Zur, Ihrke, White & Kass, 2002a; Tarpatki et al., 2006; Picco et al., 2008; Jaeger et al., 2010). As raças mais comumente indicadas nestes estudos foram o Golden Retriever, Retriever do Labrador, West Highland White Terrier, Cão de Pastor Alemão, Cocker Spaniel, Boxer e Bouledogue Francês, ainda que a predisposição de DAc seja variável entre diferentes estudos e regiões geográficas. As raças autóctones têm vindo a ser estudadas e o Cão de Serra da Estrela (Lourenço-Martins, 2011) e o Cão de Água Português mostraram ter predisposição para a DAc, sendo que este último mostrou ter um

fenótipo clínico característico (Casimiro, 2017). Esta variabilidade pode espelhar as diferenças genéticas entre populações mediante a sua localização geográfica ou podem corresponder à falta de avaliação da prevalência da raça no território em causa (Lourenço-Martins, 2011).

Um estudo realizado com cães das raças Golden Retriever e Retriever do Labrador, sujeitos às mesmas condições ambientais e de manejo durante dois anos, indicou que a heritabilidade da DAC seria aproximadamente de 0,47, o que indicaria que perto de 50% do risco de desenvolvimento de DAC seria determinado pelo genótipo individual e a restante percentagem associada a fatores ambientais. Com base na forte influência genética apresentada neste estudo, cães com DAC não devem originar descendentes. Neste estudo foi ainda mencionado que este valor poderia ser estimado para outras raças, caso sejam mantidas nas mesmas condições ambientais (Shaw, Wood, Freeman, Littlewood & Hannant, 2004).

Atualmente foram já publicados vários estudos sobre a influência de alterações no genoma na manifestação da DAC (Merryman-Simpson et al., 2008; Wood et al., 2009a; Wood et al., 2009b; Roque et al., 2011b; Salzmänn et al., 2011; Mullin, Carter, Williams, McEwan & Nuttall, 2012; Owczarek-Lipska et al., 2012; Roque et al., 2012; Tengvall et al., 2013). Os estudos realizados até à atualidade determinaram vários possíveis genes candidatos a estar envolvidos na patogenia, através do seu papel na imunidade, formação da barreira cutânea, apoptose e inflamação (Bizikova et al., 2015). Num destes estudos, foram obtidas diferenças significativas na expressão de ARNm em 11 de 20 genes testados em cães saudáveis, quando comparados com cães com DAC. Alguns destes genes estavam relacionados com a barreira cutânea e a imunidade (Wood et al., 2009a). Para além da genética, existem evidências que sugerem que a exposição a determinados fatores ambientais influenciam a prevalência e desenvolvimento de DAC. Assim, a DAC aparenta ter uma base genética complexa que, conjuntamente com fatores ambientais, predispõe indivíduos a desenvolver a doença clinicamente (Bizikova et al., 2015).

3.4. Fatores ambientais

Os fatores ambientais desempenham um papel muito importante na manifestação da DAC. Os alérgenos com maior relevância aparentam ser os ácaros do pó, os pólenes e os fungos, embora seja variável consoante a região e o clima (Hill & DeBoer, 2001). Em Portugal, na região de Lisboa, os alérgenos com maior número de sensibilizações parecem ser os ácaros domésticos, seguidos dos pólenes (Lourenço-Martins, 2011). Também os ácaros de armazenamento são responsáveis pelo desenvolvimento de reações de hipersensibilidade em muitos cães com DAC (Nuttall et al., 2006) e existem autores que defendem a existência

de reatividade cruzada entre estes e os ácaros do pó (Bensignor & Carlotti, 2002; Saridomichelakis et al., 2008; Lourenço-Martins, 2011; Marsella & Saridomichelakis, 2010). A exposição a alérgenos pode ocorrer via epicutânea, inalatória e oral. As três são importantes e apresentam efeitos cumulativos, embora o tipo de via de exposição não defina a distribuição das lesões. Destas vias, a exposição epicutânea continuada parece desempenhar um papel de maior relevo (Marsella, Nicklin & Lopez, 2006). Nesta existe uma transferência direta de antígenos ambientais através do estrato córneo e das células apresentadoras de antígenos existentes na epiderme, iniciando-se, de seguida, o processo inflamatório (Olivry & Hill, 2001). A presença de células de Langerhans, bem como a presença de IgE nas mesmas, apoia a hipótese de captura de alérgenos na epiderme e que a apresentação de antígenos pelas mesmas seja mediada pelas IgE (Olivry et al., 1996).

3.5. A infeção cutânea e a dermatite atópica

3.5.1. O papel de *Staphylococcus*

No cão, a infeção bacteriana é associada à inflamação e ao prurido, mesmo em animais sem DAC. Assim, quando a DAC e a infeção bacteriana estão simultaneamente presentes, o desconforto do animal é superior (DeBoer & Marsella, 2001; Lourenço-Martins, 2011). Em cães com DA, o auto-traumatismo, a corticoterapia e as alterações imunológicas aparentam ser fatores determinantes para a presença de infeção.

Staphylococcus pseudintermedius está presente em várias áreas do corpo de cães saudáveis (Marsella & Olivry, 2003; Devriese et al., 2005), mas tem demonstrado maior aderência na pele de cães com DAC, sendo considerado um agente patogénico oportunista (McEwan, 2000; Simou, Thoday, Forsythe & Hill, 2005) e a principal causa de piodermite no cão. Uma das proteínas mais importantes para a adesão de *Staphylococcus pseudintermedius* é a fibronectina que, em pacientes com DA encontra-se presente nas camadas superficiais da pele e a sua síntese é estimulada em fases agudas da DA (Postlethwaite, Holness, Katai & Raghov, 1992). Por outro lado, *Staphylococcus* libertam toxinas, sendo que algumas comportam-se como superantígenos que levam à ampliação e ao perpetuar da resposta alérgica cutânea (Marsella & Olivry, 2003). Para além da estimulação da resposta inespecífica, *S. aureus* também induz a produção de IgE específica, estimulando o processo inflamatório (Leung et al., 1993; Nissen et al., 1997; Lin et al., 2000; Ong, Patel, Ferdman, Dunaway & Church, 2008). Também já foi demonstrada a penetração transepidérmica de antígenos de *Staphylococcus*, o que pode aumentar a desgranulação de mastócitos.

Uma vez que os cães atópicos apresentam uma maior tendência para infeções bacterianas recorrentes e, conseqüentemente realizam esporadicamente antibioterapia, constituem um grupo de risco quanto ao desenvolvimento de estirpes de *Staphylococcus pseudintermedius*

resistentes à metilina (MRSP). Em 2011 observou-se uma prevalência de MRSP em cães atópicos com piodermite de 7,1% (Lourenço-Martins, 2011). Atualmente a prevalência aumentou drasticamente, sendo observados casos numa base semanal (comunicação pessoal da Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço, Junho 6, 2018). Este dado reitera a importância da adesão aos *guidelines* propostos para o manejo da infecção bacteriana cutânea, tanto no que se refere a biocidas como a antibióticos (Morris, Loeffler, David, Guardabassi & Weese, 2017).

3.5.2. O papel de *Malassezia*

Malassezia pachydermatis é uma levedura que faz parte da microbiota cutânea normal dos cães, apresentando uma distribuição variável (Bond, Saijonmaa-Koulumies & Lloyd, 1995; Kennis, Rosser Jr, Olivier, & Walker, 1996; Bond, Lampton & Lloyd, 2000). Apesar disto, *M. pachydermatis* é considerada uma levedura oportunista (Chryssantou, Broberger & Petrini, 2001), podendo ser patogénica sob determinadas circunstâncias (Chen & Hill, 2005). Embora não seja possível obter uma correlação entre a presença de lesões cutâneas e a presença de *Malassezia* (Nardoni, Dini, Taccini & Mancianti, 2007), parece que esta levedura atua como elemento de agravamento da doença cutânea (DeBoer & Marsella, 2001).

Uma característica clínica da dermatite por *Malassezia* é o prurido e estima-se que 50% dos cães com dermatite por *Malassezia* têm DAC ou estão afetados por outra doença alérgica (DeBoer & Marsella, 2001).

Julga-se que estas leveduras são capazes de estimular o sistema imunitário por penetração percutânea, com consequente libertação de alérgenos na pele (Scheynius, Johansson, Buentke, Zargari & Linder, 2002; Chen & Hill, 2005). Os defeitos na barreira da epiderme verificados na presença de DAC, permitem que o sistema imunitário seja exposto aos antígenos de *Malassezia*, resultando em respostas inflamatórias e/ou de hipersensibilidade (DeBoer & Marsella, 2001).

Como a imunidade celular é importante na prevenção e recuperação de infeções fúngicas, alterações nas respostas mediadas por células podem então predispor o hospedeiro ao sobrecrecimento de *Malassezia* (Mason, Mason & Loyd, 1996).

3.6. A dermatite atópica e as reações cutâneas adversas ao alimento

A prevalência das reações cutâneas adversas ao alimento (*cutaneous adverse food reactions - CAFR*) varia consoante a população em análise, sendo que em cães e gatos estima-se que seja aproximadamente 1%. Se consideramos os cães e gatos com doenças cutâneas, são 5% dos animais mas, no caso de analisarmos animais com prurido, a população afetada será de 15 a 20%. Será ainda de 10 a 25% nos casos de animais com

doenças cutâneas alérgicas e, por último, será de um terço dos cães com DAc. Desta forma, justifica-se que todos os animais com prurido e em todos os que se suspeite de doenças cutâneas alérgicas seja feito o despiste (Olivry & Mueller, 2017). A *International Task Force on Canine Atopic Dermatitis* (ITFCAD) apoiou a ideia de que componentes alimentares poderiam desencadear crises de DAc em cães com hipersensibilidade a estes alergénios. É de referir que, para além dos sinais típicos da DAc, as *CAFR* podem manifestar-se de outras formas, como é o caso da urticária. Perante este conceito, considera-se que a DAc pode ser exacerbada por alergénios alimentares, mas nem todos os cães com DAc têm crises induzidas por alimentos (Olivry et al., 2010a).

O teste *gold standard* para o diagnóstico das *CAFR* é o teste de provocação-eliminação alimentar. Para este teste é necessário que a alimentação do animal seja substituída por ingredientes novos ou hidrolisados proteicos durante 8 semanas. Nos casos em que ocorre uma diminuição no prurido existe o diagnóstico quando, em seguida, é feito um período de provocação com a dieta anterior. Caso a remissão de sintomas ocorra antes das 8 semanas, o início da provocação deve ser antecipado, de forma a ocorrer o mais próximo possível da remissão (Olivry, Mueller & Prélaud, 2015b).

3.7. Fatores perpetuantes

3.7.1. Auto-traumatismo

Após o contacto com aeroalergénios, o cão com DAc experiencia uma sensação de prurido intenso, que muitas vezes é acompanhada de infeções secundárias, responsáveis por perpetuar o prurido. O auto-traumatismo resultante é um fator que facilita a manutenção do estado de inflamação (Griffin & DeBoer, 2001). Por sua vez, as alterações da barreira cutânea que surgem em sequência deste comportamento, podem facilitar a entrada de novos alergénios e outros agentes patogénicos (Marsella & Samuelson, 2009).

3.7.2. Stress

Em animais, o *stress* psicológico é difícil de avaliar, no entanto, num questionário realizado em 2010 a tutores de cães com DAc, 73% dos inquiridos considerou que a doença tinha um grande impacto na qualidade de vida dos seus animais (Link & Favrot, 2010). Foi demonstrado um aumento do nível de cortisol em cães com DAc, relativamente a cães saudáveis e foi encontrada uma correlação entre a classificação do CADESI-03 e o nível de cortisol. Apesar de ser um valor influenciado por outros parâmetros, pode assumir-se que o *stress* crónico está aumentado nestes canídeos (Park, Kim, Shin & Hwang, 2016). Sendo possível obter efeitos positivos no controlo da doença em alguns cães, através da terapia comportamental, o aumento da inflamação pode também estar relacionada com fatores de *stress*. O *stress* induz alterações imunológicas que, conjuntamente com o auto-traumatismo,

contribuem para o agravamento da sintomatologia, como se verifica com o aumento dos glucocorticóides endógenos que predisõem a alterações na permeabilidade da barreira cutânea, na integridade do estrato córneo e na defesa antimicrobiana (Elias & Schmuth, 2009). Ainda assim, considera-se necessário que sejam feitos mais estudos, antes de serem elaboradas recomendações relativamente ao manejo de *stress* em cães com DAc (Olivry et al., 2015a).

Em medicina humana, a manifestação clínica da DAh é frequentemente associada a *stress* psicológico, sendo este considerado um fator que despoleta e agrava as manifestações da doença (Suárez, Feramisco, Koo & Steinhoff, 2013), sendo possível correlacionar o prurido e o estado de ansiedade em pacientes com DAh (Oh et al., 2010). Julga-se que o *stress* influencia de forma direta e indireta a resposta imunitária, a expressão de neuropeptídeos cutâneos e a função cutânea de barreira, ainda que os mecanismos exatos não estejam clarificados (Suárez et al., 2013). O próprio *stress* provocado pela presença da doença e das dificuldades inerentes ao controlo das suas manifestações não pode também ser ignorado, formando um aparente ciclo vicioso (Oh et al., 2010; Bridgett & Norén, 2017).

4. Manifestações clínicas

4.1. Idade de aparecimento dos primeiros sinais clínicos

Comumente, os primeiros sinais clínicos de DAc surgem entre os 6 meses e os 3 anos de idade (Griffin & DeBoer, 2001), sendo que 78% dos cães com DAc apresentam os primeiros sinais até aos 3 anos (Favrot, Steffan, Seewald & Picco, 2010). Raramente as primeiras manifestações ocorrem antes dos 6 meses ou depois dos 7 anos de idade (Favrot et al., 2010). Os cães nascidos durante o outono demonstraram uma maior incidência da doença (Nødtvedt, Egenvall, Bergvall & Hedhammar, 2006).

4.2. Predisposição de género

Os estudos sobre a existência de uma maior prevalência da doença consoante o género são contraditórios (Griffin & DeBoer, 2001; Favrot et al., 2010), embora seja sugerido que não existe predisposição de género (Saridomichelakis, Koutinas, Gioulekas & Leontidis, 1999; Bourguignon, Favarato, Guimarães & Ferreira, 2013). Também relativamente à esterilização são encontrados dados díspares. Em Portugal, num estudo com 150 cães com DAc, os resultados indicaram que poderia existir uma predisposição da doença em fêmeas inteiras (Lourenço-Martins, 2011). No entanto, num estudo publicado em 2016 com 1638 cães com DAc foi sugerido que cães esterilizados têm um risco significativamente superior de desenvolver a doença, sendo este ainda maior em fêmeas (Sundburg, Belanger, Bannasch, Famula & Oberbauer, 2016).

4.3. Predisposição rácica

A observa o clínica permite concluir que a DAC surge mais frequentemente em determinadas raças caninas, sendo mais frequentemente mencionadas as raças Golden Retriever, Retriever do Labrador, West Highland White Terrier, Cão de Pastor Alemão, Cocker Spaniel, Boxer e Bouledogue Francês (Griffin & DeBoer, 2001; Sousa & Marsella, 2001; Zur et al., 2002a; Tarpataki et al., 2006; Picco et al., 2008; Jaeger et al., 2010). Contudo, deve ter-se em conta que a predisposi o de DAC   variável entre diferentes estudos e regiões geográficas. Relativamente às raças autóctones, podem referir-se o Cão de  gua Português e o Cão de Serra da Estrela (Lourenço-Martins, 2011; Casimiro, 2017).

4.4. Sazonalidade

As manifesta es iniciais da doença podem ser sazonais dependendo dos alergénios envolvidos, mas tendem para se manifestar de forma não sazonal com o avançar da doença, ainda que possam existir varia es na gravidade dos sintomas consoante a altura do ano (Griffin & DeBoer, 2001).

4.5. Ambiente

Cães que habitam em ambientes urbanos apresentam maior risco de desenvolvimento da doença (N dtvedt et al., 2006) e o mesmo se verifica para cães que vivem maioritariamente no interior da habita o (Favrot et al., 2010), o que poderá estar relacionado com o maior contacto com ácaros domésticos (Marsella & Samuelson, 2009).

4.6. Distribui o anat mica do prurido e lesões

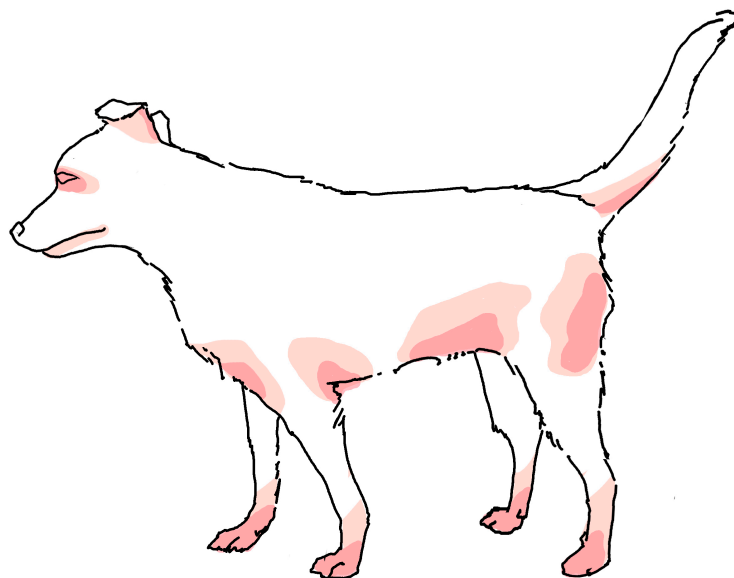
A manifesta o característica da DA   o prurido (Griffin & DeBoer, 2001). Tanto o prurido, como as lesões seguem uma distribui o anat mica característica, que pode ser observada na figura 1, sendo mais frequentemente afetadas a face, o pavilhão auricular, as extremidades dos membros e o abd men ventral (Griffin & DeBoer, 2001; Jaeger et al., 2010). Apesar disto, existem diferenças entre o fenótipo clínico de cada raça, sendo a distribui o das lesões muito variável (Wilhem et al., 2011; Casimiro, 2017). Existem ainda cães que não exibem lesões, mesmo em áreas pruriginosas (Favrot et al., 2010).

Quando estão presentes lesões primárias, estas consistem em eritema (Griffin & DeBoer, 2001), sendo que a presença de pápulas e pústulas pode surgir secundariamente e não como manifesta o primária da doença.

Existem várias lesões secundárias descritas, nomeadamente a colora o acastanhada do pelo, em consequência da lambedura frequente, escoria es e alopec a, associadas a autotraumatismo e hiperpigmenta o e liquenifica o, devido   inflama o cr nica.  

também frequente a presença de otite externa (Saridomichelakis et al., 1999; Zur et al., 2002a; Jaeger et al., 2010), conjuntivite (Lourenço-Martins, 2011; Lourenço-Martins et al., 2011) e infeções bacterianas e fúngicas, com as respetivas manifestações lesionais.

Figura 1. Ilustração com a distribuição do padrão lesional na dermatite atópica canina da autoria de C. Domingos. Fonte: original, 2018.



4.7. Avaliação da gravidade lesional e do prurido

Para que seja feita uma avaliação inicial da gravidade das manifestações da DAC, bem como a sua monitorização ao longo do tempo e uma análise da eficácia da terapêutica instituída, podem usar-se métodos de comparação, como escalas de prurido e escalas indicativas da gravidade das manifestações da doença (*Canine Atopic Dermatitis and Severity Index* - CADESI). Com o desenvolvimento de métodos terapêuticos com efeitos específicos direcionados apenas para o controlo das manifestações da DAC, torna-se mais importante utilizar métodos adicionais objetivos de monitorização da doença em si.

As escalas de prurido podem ser visuais analógicas, numéricas, descritivas ou uma conjugação das várias opções. Foi demonstrado que, quando o mesmo animal é avaliado por duas pessoas diferentes, o grau de concordância entre duas respostas é maior com a utilização de escalas numéricas e com descritivos relacionados com a gravidade, ao invés de descritivos relacionados com alterações comportamentais e escalas visuais analógicas (Hill, Lau & Rybníček, 2007). Foi já demonstrado que estas escalas diferenciam cães com doenças cutâneas, de cães com doenças não cutâneas, sendo considerado o intervalo normal de 0 a 1,9 (Rybníček, Lau-Gillard, Harvey & Hill, 2009). Isto não quer dizer que um animal com classificação do prurido inferior a 1,9 não tenha uma doença cutânea

pruriginosa, mas sim que a gravidade do prurido apresentado nesse caso é comparável ao de muitos cães sem doença cutânea, tratando-se de um nível em que a maioria dos tutores não procuraria avaliação médico-veterinária.

O CADESI é uma classificação indicativa da gravidade da DAc, que tem vindo a ser submetido a várias alterações. Para elaborar o mais recente e validado CADESI-04 é necessário avaliar a presença de eritema, como marcador de inflamação aguda, liquenificação, como marcador de inflamação crónica, bem como da combinação de escoriação e alopecia, como marcador de prurido, numa escala de 0 a 3, em 20 regiões corporais. O maior resultado possível é 180 e as regiões em avaliação são as mais tipicamente afetadas num animal com DAc, podendo ser consultadas no anexo 1 (Olivry et al., 2014).

5. Diagnóstico

A DAc não tem sinais clínicos patognomónicos que permitam que seja feito um diagnóstico definitivo com base no exame físico e história pregressa do animal (DeBoer & Hillier, 2001a), uma vez que a doença pode ter várias apresentações clínicas (Wilhem et al., 2011), a extensão das lesões é variável, pode tratar-se de uma apresentação aguda ou crónica e ainda podem existir infeções secundárias concomitantes. Deste modo, existem bases para o diagnóstico da DAc. Primeiramente, o clínico deverá descartar outras doenças cutâneas com sinais clínicos semelhantes aos de cães com DAc, como a presença de pulgas, de outros ectoparasitas, como ácaros, e de infeções cutâneas primárias, entre outras. Seguidamente, deverá ser feita uma análise detalhada da história pregressa, no que toca a idade de apresentação dos primeiros sinais clínicos, existência de prurido sem lesões, sazonalidade, predisposição familiar ou rácica e resposta prévia à terapêutica com glucocorticóides, bem como uma análise ao desenvolvimento da doença e ao padrão lesional.

5.1. Diagnósticos diferenciais

Na presença de dermatite alérgica à picada da pulga, as lesões cutâneas e o prurido estão localizados na zona lombossagrada, na base da cauda e na área caudomedial das coxas sem mesmo se verificar uma contagem elevada do parasita no animal (Bruet, Bourdeau, Roussel, Imperato & Desfontis, 2012), ainda que estas zonas não se encontrem exclusivamente afetadas na presença de dermatite alérgica à picada da pulga (Wilhem et al., 2011; Casimiro, 2017). Pode dar-se o caso de, ao animal, ser concomitantemente diagnosticada DAc e dermatite alérgica à picada da pulga, o que pode dificultar o diagnóstico da primeira. Deste modo, em qualquer animal suspeito de DAc, deverá fazer-se

um protocolo de controlo e prevenção, bem como em qualquer animal com que este habite ou com o qual se relacione. Em locais endémicos, os animais com DAc devem ser desparasitados externamente ao longo de todo o ano (Olivry et al., 2015a). Em caso de banhos frequentes, recomenda-se o uso de desparasitantes sistémicos de administração oral (Olivry et al., 2015a).

No que toca às infeções cutâneas, é de salientar que estas são muito frequentes em cães com DAc, mas podem estar associadas a outras doenças com manifestações cutâneas, como algumas endocrinopatias. Uma vez que o sobrecrescimento bacteriano pode alterar o padrão de distribuição de prurido, é importante eliminar a infeção antes de avaliar se a doença primária é pruriginosa, qual a sua gravidade e padrão de distribuição de lesões. A infeção primária por *Malassezia pachydermatis* deve ser também descartada. Em cães com hipersensibilidade, a presença de um escasso número de leveduras pode ser o suficiente para a presença de lesões. Assim, pode ser instituída uma terapêutica antifúngica (Negre, Bensignor & Guillot, 2009), de forma a que se compreenda de que forma o prurido está relacionado com esta infeção.

As manifestações cutâneas relacionadas com alimentos podem dever-se a intolerâncias alimentares, sendo estas reações não imunomediadas ou alergias alimentares, sendo estas imunomediadas, incluindo as hipersensibilidades mediadas por IgE (Hillier & Griffin, 2001). Uma vez que a apresentação clínica pode ser semelhante à de DAc é importante realizar o diagnóstico (Picco et al., 2008). Para tal, deve pesquisar-se a presença de sintomatologia gastrointestinal, como vômitos, diarreia, tenesmo, fezes pastosas, flatulência e aumento do número de dejeções (Picco et al., 2008; Favrot et al., 2010). O teste *gold standard* para o diagnóstico de alergia alimentar é o teste de provocação-eliminação alimentar já descrito (DeBoer & Hillier, 2001a; Olivry et al., 2015b). Especula-se que a presença de ácaros de armazenamento em alimentos secos (Gill, McEwan, McGarry & Nuttall, 2011; Hibberson & Vogelnest, 2014) possa levar a manifestações de DAc pela reatividade cruzada com os ácaros do pó, aos quais, um elevado número de cães apresenta hipersensibilidade. Assim, os tutores devem ser encorajados a armazenar os alimentos em recipientes limpos e selados (Olivry et al., 2015a).

5.2. História pregressa e critérios de avaliação

O sintoma característico da DAc é o prurido, que pode manifestar-se através de coçar, esfregar, morder, lambe e abanar da cabeça. Dependendo do tipo de alérgenos envolvidos, o prurido pode ser sazonal (pólen) ou não sazonal (ácaros) (Zur et al., 2002a). O prurido pode desenvolver-se sem associação a lesões cutâneas ou pode estar presente eritema e pápulas ocasionais (Griffin & DeBoer, 2001). Existe uma distribuição anatómica relacionada com o quadro clínico da doença (Griffin & DeBoer, 2001), ainda que existam

variações consoante a raça em causa (Wilhem et al., 2011; Casimiro, 2017). Em estadios crónicos surgem lesões secundárias, como escoriações, alopecia, hiperpigmentação, crostas e seborreia. Para apoio no diagnóstico da doença podem ser usados os validados critérios de Favrot, que podem ser consultados na tabela 2, sendo que esta avaliação deve ser feita em conjunto com a exclusão de outras doenças de apresentação clínica semelhante. O preenchimento de cinco critérios permite a obtenção de uma sensibilidade de 85% e uma especificidade de 79% no diagnóstico da doença, enquanto que a inclusão de um critério adicional, permite que a especificidade aumente para 89%, mas leve à diminuição da sensibilidade para 58% (Favrot et al., 2010).

Tabela 2 - Critérios para o diagnóstico de DAc, segundo Favrot (2010).

Critérios de Favrot
Início dos sinais clínicos antes dos 3 anos
Animal que viva maioritariamente no interior da habitação
O prurido precede as lesões na altura de aparecimento de sintomas
Prurido responsivo à terapêutica com glucocorticóides
Patas dianteiras afetadas
Pavilhão auricular afetado
Margens dos pavilhões auriculares não afetadas
Zona lombossagrada não afetada

6. Tratamento

A terapêutica da DAc deve ser multi-intervencional e elaborada para cada animal, com base na sua história e manifestações clínicas (Scott et al., 2001; Olivry et al., 2010a). É assim importante intervir e desenvolver novas moléculas que atuem nos vários fatores envolvidos na doença, tais como a presença de alérgenos, o prurido, a inflamação e o *stress* oxidativo. Nessa lógica de ideias é também relevante usar medidores objetivos da evolução clínica da doença.

O tratamento de fase aguda pressupõe a identificação e eliminação de elementos despoletantes, banhos com champôs adequados e controlo do prurido e lesões cutâneas com o uso de glucocorticóides orais ou tópicos ou oclacitinib. Para o maneio da DAc crónica, devem ser identificados e evitadas as causas das crises, deve existir um elevado cuidado com a higiene da pele e pelo, que pode pressupor um maior número de banhos e ainda o aumento da ingestão de ácidos gordos. A medicação que tem demonstrado maior eficácia na redução do prurido crónico e das lesões cutâneas engloba os glucocorticóides orais e tópicos, a ciclosporina oral, o oclacitinib oral e o lokivetmab. De forma a prevenir ou atrasar

as manifestações agudas de DAc, podem considerar-se a imunoterapia alergénio-específica ou ainda a aplicação de glucocorticóides tópicos (Olivry et al., 2010a).

6.1. Terapêutica etiológica

- Evicção alergénica

Existem vários alergénios capazes de despoletar um quadro agudo de DAc, nomeadamente os alergénios ambientais (como ácaros ou pólenes), determinados alimentos ou ainda a picada de pulga ou de outros insetos. Apenas um animal com hipersensibilidade a estes alergénios terá manifestações clínicas e apenas no caso dos alergénios estarem em quantidade suficiente para despoletar uma crise. Assim, a identificação e a eliminação do contacto com os alergénios pode ser importante para prevenir a recorrência de crises agudas (Olivry et al., 2010a; Olivry et al., 2015a).

Os ácaros do pó são os alergénios mais importantes na DAc (Hill & DeBoer, 2001; Lourenço-Martins, 2011), pelo que a implementação de medidas de controlo e eliminação é relevante para os pacientes com hipersensibilidade a estes alergénios (Arlian & Platts-Mills, 2001). Apesar das evidências da utilidade da aplicação de medidas de controlo (Swinnen & Vroom, 2004; Raffan et al., 2005; Fujimura, 2011), ainda não foram definidos quais os melhores métodos a aplicar (Olivry et al., 2015a), sendo que podem ser ponderados o uso de acaricidas, o uso de capas impermeáveis nas camas dos animais, bem como a limpeza e aspiração frequentes da cama e ambiente do animal (Olivry et al., 2010a).

Os pólenes são o segundo grupo de alergénios mais importante na DAc, sendo que num estudo realizado na região de Lisboa com 138 animais com DAc, cerca de metade (48%) apresentou sensibilização a pelo menos uma espécie polínica (Lourenço-Martins, 2011). A consulta de boletins polínicos da Rede Portuguesa de Aerobiologia (Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica) permite evitar períodos prolongados no exterior e manter as janelas da habitação abertas quando as concentrações polínicas para as quais o animal apresenta sensibilizações sejam mais elevadas.

- Imunoterapia alergénio-específica

Os testes intradérmicos alergénio-específicos e as serologias para detecção de IgE são úteis para identificar hipersensibilidade a alergénios ambientais (Hillier & DeBoer, 2001; DeBoer & Hillier, 2001b) e elaborar um plano terapêutico com imunoterapia alergénio-específica (Olivry et al., 2010a) ou com evicção alergénica em cães já diagnosticados com a doença. Cães sem DAc podem ter resultados positivos nestes testes, pelo que estes nunca devem ser utilizados como meio de diagnóstico (Olivry et al., 2015a).

A imunoterapia específica para alergénios é definida, pela Organização Mundial de Saúde, como a prática de administrar quantidades crescentes de um extrato alergénico a um

indivíduo alérgico com o intuito de melhorar os sintomas associados à exposição aos alérgenos implicados na sua doença (Bousquet, Lockey & Malling, 1998; Olivry et al., 2010a). Não existem evidências de qual o melhor método para a escolha de alérgenos a incluir na imunoterapia, entre a realização de testes intradérmicos alérgénio-específicos ou a realização de serologia IgE (Zur, White, Ihrke, Kass & Toebe, 2002b; Schnabl, Bettenay, Dow & Mueller, 2006), ainda que seja sugerido que exista uma grande variabilidade dos resultados das serologias entre diferentes laboratórios (Plant, Neradelik, Polissar, Fadok & Scott, 2014). Apenas devem ser incluídos nas preparações para a ITAE os alérgenos aos quais foi demonstrada uma reação exacerbada e nos casos em que é provável que ocorra uma nova exposição e esta não possa ser evitada (Olivry et al., 2010a).

A ITAE tem demonstrado ser uma forma eficaz e segura de reduzir os sinais clínicos em cães com DAc (Loewenstein & Mueller, 2009; Olivry et al., 2010b; DeBoer, Verbrugge & Morris, 2010; Dell, Griffin, Thompson & Griffies, 2012; Carlotti, Gribbeauval, Costargent, Ganiayre & Viaud, 2013; Marsella, Santoro, Ahrens & Thomas, 2013a; Hobi & Mueller, 2014), sendo aconselhada a todos os cães com diagnóstico de DAc (Griffin & Hillier, 2001). Contudo, não foi demonstrada superioridade de nenhum dos protocolos de introdução: tradicional, *rush* ou de baixa dose (Olivry et al., 2010b). A frequência e concentração devem ser avaliadas individualmente. Como se trata de um método cujos resultados demoram algum tempo a surgir, é recomendado que sejam implementadas outras terapêuticas até que se acredite que a imunoterapia é eficaz. Apenas após a administração de imunoterapia durante um ano pode ser feita a ponderação no que toca aos possíveis benefícios para o animal em causa. Nesta altura pode também ponderar-se a redução da frequência de administração, em casos em que houve uma completa remissão de sintomatologia (Olivry et al., 2015a).

6.2. Terapêutica sintomática

A administração oral de glucocorticóides (Olivry & Muller, 2003; Olivry et al., 2010b; Olivry & Bizikova, 2013; Gadeyne et al., 2014; Taszkun, 2010), ciclosporina (Olivry et al., 2010b; Taszkun, 2010; Olivry & Bizikova, 2013; Kovalik et al., 2011; Steffan, Favrot & Mueller, 2006) ou oclacitinib (Gadeyne et al., 2014; Little, King, Davis, Cosgrove & Stegemann, 2015; Cosgrove et al., 2013) demonstrou ser eficaz para o tratamento de DAc (Gadeyne et al., 2014). O plano terapêutico que inclua estas substâncias é especialmente indicado nos casos em que a DAc não é localizada (Olivry et al., 2010a). Os glucocorticóides e o oclacitinib levaram a melhorias mais rápidas do que a ciclosporina, mas a ciclosporina pode ser combinada nas primeiras três semanas com prednisolona para acelerar a melhoria clínica (Dip et al., 2013). É contraindicada a utilização conjugada a longo termo de corticosteróides e ciclosporina ou oclacitinib pela potencial imunossupressão que pode

predispor ao desenvolvimento de infecções (Olivry et al., 2015a), ainda que a utilização individual de ciclosporina e corticosteróides não tenha demonstrado influenciar a microbiota cutânea (Widmer et al., 2018).

O uso concomitante de imunoterapia alérgico-específica, champôs emolientes, dietas enriquecidas com ácidos gordos essenciais ou suplementos de ácidos gordos essenciais pode potenciar a redução da dose ou frequência de glucocorticóides orais, ciclosporina e até mesmo oclacitinib para a manutenção da remissão dos sinais clínicos da DAc (Saevik et al., 2004; Olivry et al., 2015a).

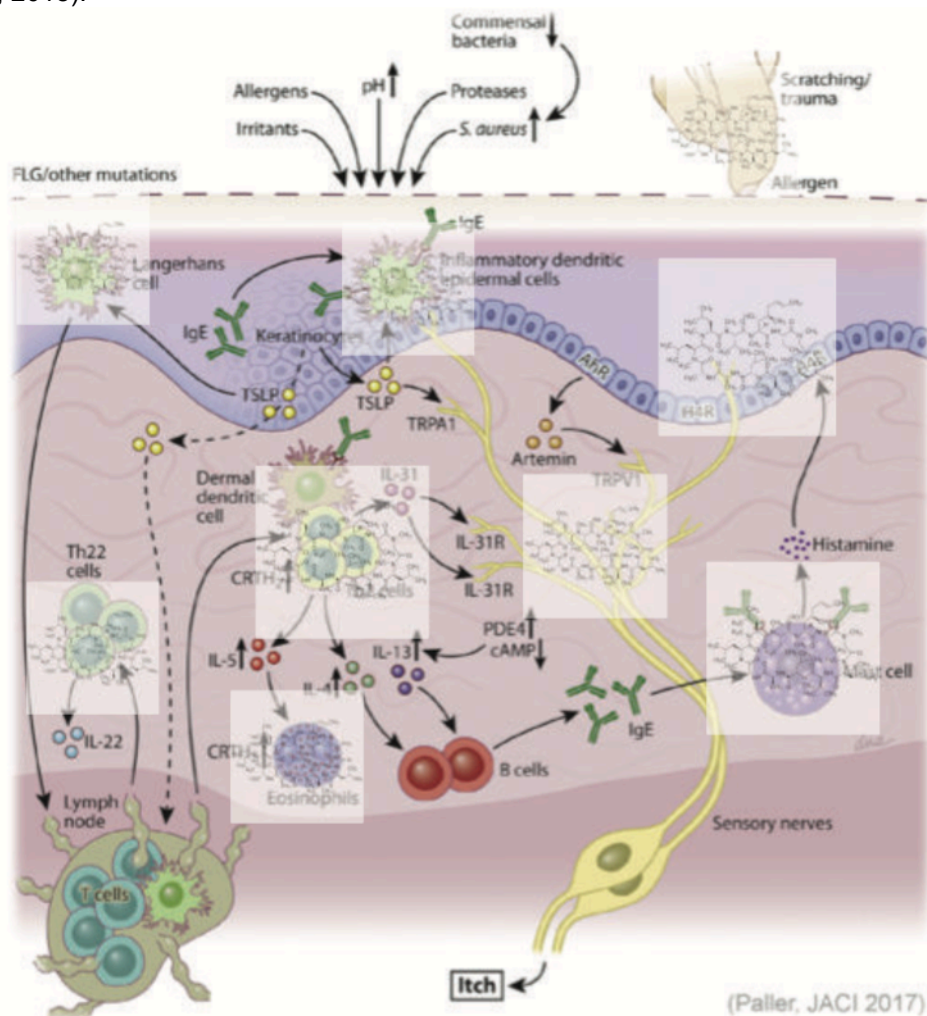
6.2.1. Ciclosporina

A ciclosporina é um fármaco com propriedades imunossupressoras e imunomoduladoras isolada a partir do fungo *Beauveria nivea* (von Arx, 1986). Começou a ser usada em medicina humana para prevenir a rejeição de órgãos transplantados e, mais tarde, no tratamento de DAh e psoríase (Forsythe & Paterson, 2014). Em medicina veterinária foi já publicado um grande número de estudos relativos à eficácia e segurança da utilização deste fármaco no tratamento da DAc (Forsythe & Paterson, 2014).

A ciclosporina interfere com a ativação e proliferação das células T através da inibição da calcineurina, o que resulta numa modificação da resposta imunitária mediada por células e diminui a produção de citocinas pro-inflamatórias (White, Santoro, Ahrens & Marsella, 2018). Tem ainda muitas outras ações, como se pode observar na figura 2.

A CsA tem uma elevada margem de segurança e uma meia vida de 9 horas, concentrando-se na pele após administração oral (Steffan, Alexander, Brovedani & Fisch, 2003), pelo que apenas é necessário que seja administrada uma vez ao dia (Guaguère, Steffan & Olivry, 2004), numa dose de 5 mg/kg até ao controlo dos sinais clínicos (Olivry et al., 2015a), sendo que são necessárias três a quatro semanas para que a CsA seja eficaz na redução dos sinais cutâneos e da inflamação na pele de cães atópicos (White et al., 2018). Depois, a dose deve ser ajustada, quer através da diminuição da frequência de administração (de dois em dois dias, de três em três dias ou apenas dois dias por semana) ou pela diminuição da dose diária a administrar (Olivry et al., 2010b). As formulações genéricas de ciclosporina demonstraram ser bioequivalentes, pelo que podem ser utilizadas como substitutos (Olivry et al., 2015a).

Figura 2 - Mecanismos de ação da CsA na DAC (segundo Olivry, T., comunicação “CAD: systemic therapy: broad or narrow anti-inflammatory targets?”, ESVD Therapeutics Workshop Davos, Março 22, 2018).



6.2.2. Glucocorticóides e tacrolimus

- Glucocorticóides tópicos e tacrolimus

O uso de aerossóis com glucocorticóides tem-se mostrado eficaz no tratamento de manifestações agudas de DAC (DeBoer et al., 2002; Nuttall et al., 2009; Olivry et al., 2010a; Olivry et al., 2015a; Lourenço et al., 2016), sendo inclusivamente demonstrado que a aplicação diária de aceponato de hidrocortisona em aerossóis durante uma a duas semanas resulta na melhoria significativa de lesões e prurido em cães com DAC (Nam et al., 2012). Esta intervenção é especialmente indicada em lesões cutâneas localizadas e durante curtos períodos de tempo (Olivry et al., 2015a; Lourenço et al., 2016). Assim, após uma fase inicial de aplicação diária, os glucocorticóides tópicos devem ser utilizados de forma intermitente, ainda que a duração e frequência do tratamento necessite de ser adaptada a cada animal (Nuttall et al., 2009; Olivry et al., 2015a; Lourenço et al., 2016), mas normalmente decorrem até completa remissão dos sintomas (Olivry et al., 2015a). Deve ter-se em atenção que a

utilização diária prolongada no tempo tem efeitos secundários, sendo o mais comum, a atrofia cutânea (Gross, Walder & Ihrke, 1997; Kimura & Doi, 1999). Apesar disso, foi estudado que a aplicação tópica de aerossóis com aceponato de hidrocortisona em áreas onde existiram lesões cutâneas, dois dias consecutivos em cada semana pode atrasar a recorrência e gravidade das lesões nesses locais, sem causar atrofia cutânea (Lourenço et al., 2016).

Devido ao seu elevado custo, o tacrolimus pode ser reservado para cães que revelem já a presença de atrofia cutânea (Olivry, et al., 2015a).

- Glucocorticóides orais

A administração de prednisolona, prednisona ou metilprednisolona numa dose de 0,5 a 1,0 mg/kg a cada 24 horas ou dividida e administrada de 12 em 12 horas, melhora as manifestações clínicas graves e/ou extensas de DAc (Taszkun, 2010; Olivry et al., 2015a, Olivry et al., 2010b; Kovalik et al., 2011; Gadeyne et al., 2014). Depois da remissão, a dose deve ser a mínima possível e deve ser administrada na menor frequência possível que mantenha a ausência de sinais para evitar efeitos secundários a longo termo (Olivry et al., 2010; Olivry et al., 2015a). Os efeitos adversos são proporcionais à potência do fármacos, à dose utilizada e à duração do plano terapêutico (Gadeyne et al., 2014).

6.2.3. Oclacitinib

O oclacitinib é um fármaco inibidor das enzimas *JAK* com elevada e rápida atividade antipruriginosa sendo já significativa ao fim de 4 horas (Gonzales et al., 2016). A rapidez de ação é um efeito diferenciador relativamente a outros fármacos concorrentes, nomeadamente à ciclosporina. Deve ser administrado numa concentração de 0,4 a 0,6 mg/kg de 12 em 12h durante 14 dias e depois a cada 24h (Olivry et al., 2015a). No caso da remissão total dos sinais clínicos, deve tentar-se ajustar a dose para o mínimo necessário para a manutenção de ausência de sintomatologia. Este fármaco não foi aprovado para a utilização em cães com menos de 12 meses de idade (Olivry et al., 2015a).

6.2.4. Melhoria da barreira cutânea

- Banho com champô não-irritante

O banho com um champô emoliente com uma formulação que contenha lípidos, açúcares complexos e antissépticos demonstrou um efeito antipruriginoso moderado (Loflath et al., 2007), sendo que o mesmo efeito foi visível em champô emoliente com formulação com fitosfingosina, óleo de framboesa e lípidos (Bourdeau, Bruet & Gremillet, 2007; Olivry et al., 2010a; Bensignor, Pin & Bourdeau, 2013). Pode também ser ponderado o uso de

hidratantes após o banho (Olivry et al., 2010a; Olivry et al., 2015a). A utilização destes champôs pode ser benéfica em cães com DAC leve, sendo que um banho pelo menos uma vez por semana com um champô adequado remove alérgenos da superfície da pele e leva ao aumento da hidratação cutânea (Olivry et al., 2010a; Olivry et al., 2015a). A intensidade e frequência do banho são os fatores mais importantes a ter em conta para a redução do prurido (Olivry et al., 2010a; Olivry et al., 2015a) e devem ser adaptadas a cada animal.

- Suplementação com ácidos gordos essenciais

A administração oral de ácidos gordos essenciais, especialmente, os ricos em Omega-3, tanto como suplemento alimentar ou em dietas enriquecidas, influencia os lípidos superficiais cutâneos (Popa et al., 2011) e melhora o brilho e a qualidade do pelo (Marsh, Ruedisueli, Coe & Watson, 2008). Os ácidos gordos essenciais podem mostrar ligeiros benefícios na melhoria dos sinais clínicos da DAC, não se considerando, contudo, a terapêutica em exclusivo (Olivry et al., 2010a; Olivry et al., 2015a). A administração de ácidos gordos essenciais não deve ser inferior a 2 meses (Olivry, Marsella & Hillier, 2001; Olivry et al., 2010b; Popa et al., 2011) e foi demonstrado que as dietas enriquecidas com ácidos gordos essenciais fornecem maiores quantidades dos mesmos, do que a sua administração sobre a forma de suplementos (Roudebush, Bloom & Jewell, 1997).

- Aplicação tópica de formulações com lípidos

A utilização de formulações tópicas lipídicas pode ajudar a normalizar os defeitos na barreira lipídica do estrato córneo (Popa et al., 2012; Piekutowska, Pin, Rème, Gatto & Haftek, 2008). Contudo, ainda não existem evidências suficientes que suportem a utilização desta terapêutica isoladamente (Marsella et al., 2013b; Blaskovic, Rosenkrantz, Neuber, Sauter-Louis & Mueller, 2014). Em cães que façam suplementação alimentar com ácidos gordos essenciais não se denotam benefícios da sua utilização suplementar tópica (Olivry et al., 2015a).

6.2.5. Outras moléculas

- Interferão-gama recombinante canino

A administração subcutânea de interferão-gama recombinante canino, numa dose de 5.000 a 10.000 unidades/kg três vezes por semana, durante 4 semanas e depois uma vez por semana demonstrou ser eficaz para o tratamento de DAC (Iwasaki & Hasegawa, 2006; Yasukawa et al., 2010; Olivry et al., 2015a).

- Lokivetmab

Lokivetmab é um anticorpo monoclonal anti-IL-31 canina. Atua através da ligação e neutralização do mediador inflamatório IL-31, que se trata de uma citocina que está envolvida na manifestação de prurido em cães com DA (Michels et al., 2016a). Pode ser usado a título crónico e os estudos já realizados comprovam a sua eficácia e segurança, sendo recomendada a administração inicial de duas doses mensais consecutivas de 1-3,3 mg/kg por via subcutânea (Michels et al., 2016a). Com uma administração na dose de 2,0 mg/kg SC, este fármaco demonstrou uma redução do prurido ao fim de um dia e uma diminuição do CADESI-03 ao fim de uma semana, mantendo-se o seu efeito durante um mês (Michels et al., 2016b).

- Anti-histamínicos

Os anti-histamínicos tipo 1 demonstram um ligeiro efeito antiprurítico, tanto utilizados isoladamente, como em combinação com outros agentes (Eichenseer, Johansen & Mueller, 2013; Plevnik, Kobal, Domanjko-Petric & Kotnik, 2009). Contudo, a sua ação é variável de indivíduo para indivíduo (Eichenseer, 2013; Kapun et al., 2014). Para melhores resultados, aconselha-se a utilização destes fármacos a título preventivo diariamente (Olivry et al., 2015a), optando-se por hidroxizina (2 mg/kg BID) ou cetirizina (0,5-1 mg/kg SID) (De Vos, Maleux, Baltes & Gobert, 1987; Bizikova, Papich & Olivry, 2008).

- Masitinib

O masitinib trata-se de um inibidor da proteína tirosina-quinase e aparenta ter algum benefício em cães com DAc crónica, mas este efeito benéfico deve ser avaliado contra o risco de efeitos adversos renais e que requerem a realização de urianálises periódicas para detetar a presença de proteinúria (Cadot et al., 2011). Pode considerar-se a utilização de masitinib nos casos de DAc crónica não responsiva à terapêutica mais clássica (Cadot et al., 2011; Olivry et al., 2015a).

6.3. Terapêutica antimicrobiana e antifúngica

As infeções bacterianas e/ou fúngicas na pele e ouvido externo são causas comuns de crises agudas de DAc. Assim, quando estas surgem, deve seguir-se uma terapêutica tópica e/ou sistémica sendo de extrema importância a seleção adequada do tratamento a usar, seja ele um biocida, um antibiótico e/ou antifúngico, idealmente recorrendo-se a *guidelines* do país em questão (caso haja) ou internacionais (Olivry et al., 2010a; Beco et al., 2013; Hillier et al., 2014; Olivry et al., 2015a).

6.4. Outras medidas terapêuticas

6.4.1. Terapêutica antioxidante

Dada a associação entre o *stress* oxidativo e o desenvolvimento e perpetuação da DA, deve ser ponderada a inclusão de estratégias que resultem na diminuição do *stress* oxidativo, tais como a diminuição da produção de radicais livres e potenciação da capacidade antioxidante, a diminuição da intensidade da inflamação e da produção de citocinas pro-inflamatórias e evitar o contacto com fatores ambientais e físicos que despoletem uma crise de DAc. Neste âmbito, pondera-se a utilização de agentes anti-inflamatórios, fármacos imunomoduladores, emolientes cutâneos e antioxidantes (melatonina e vitaminas A, C, D, E) (Ji & Li, 2016).

- Terapêutica com vitamina E

Apesar de ser conhecida há muito tempo, existem alguns fatores que têm levado à reduzida utilização terapêutica de VE em medicina humana e veterinária, tal como a difícil comparação de resultados pela disparidade de utilização do rácio entre tocoferol e lípidos plasmáticos ou a utilização do valor absoluto de tocoferol. Por outro lado, as terapias orais com VE têm demonstrado uma reduzida incidência de efeitos secundários (Bendich & Machlin, 1988; Machlin, 1989).

Os primeiros estudos com a utilização terapêutica de VE em cães datam de 1947 (Richtsmeier, Spooner & Meyer, 1947; Lambert, 1947; Holman, 1947). Desde então, muitas foram as publicações sobre os efeitos terapêuticos desta vitamina (Baskin et al., 2000; Heaton et al., 2002; Kapun et al., 2013; Kapun et al., 2014).

Apesar de ser apontada como medida terapêutica, a utilização de VE em pacientes com alergia é uma temática muito complexa, sobre a qual ainda será necessário realizar um grande número de estudos (Caraffa et al., 2016).

O primeiro estudo sobre a eficácia da utilização de VE para o tratamento de DA data de 1989, em que foi testado se a suplementação alimentar de VE e selénio ou das referidas substâncias individualmente poderia ser benéfica em pacientes humanos adultos com DAh. Nenhuma das substâncias se mostrou eficaz. Apesar deste resultado, existem vários estudos que defendem a suplementação de VE em pacientes com DA, sendo que a suplementação resulta no aumento cutâneo e serológico de VE. Em ratos em que foi induzida a doença, foi demonstrado que a administração de tocotrienol (VE insaturada) é capaz de diminuir a sintomatologia, como o prurido e ainda diminuiu os níveis séricos de histamina, através da supressão da desgranulação de mastócitos e também se mostrou eficaz na supressão da proteína quinase C, estando esta última associada ao efeito antidesgranulante do tocotrienol.

A suplementação oral de VE leva a um aumento plasmático da concentração de antioxidantes. Ademais, existe uma diminuição da oxidação de ADN e um aumento da resistência de lipoproteínas à oxidação *in vitro* (Baskin et al., 2000).

A adição de VE na terapia da DAh levou à diminuição dos níveis serológicos de IgE bem como à remissão de sinais clínicos (Tsourelis-Nikita, Hercogova, Lotti & Menchini, 2002; Javanbakht et al., 2011), sendo ainda demonstrada a presença de uma relação negativa entre a concentração de α -tocoferol plasmático e os valores do SCORAD em pacientes com terapêutica com VE (Javanbakht et al., 2011). Em cães foi também evidenciado o aumento significativo da VE e da capacidade antioxidante total em cães com DAc aos quais foi administrada VE, comparativamente ao grupo placebo, sendo obtidas classificações CADESI-03 significativamente inferiores no primeiro grupo (Kapun et al., 2014). O efeito antioxidante da administração terapêutica de VE é traduzido pela diminuição de indicadores de peroxidação lipídica, sendo este apenas possível quando as dietas basais são suplementadas com, pelo menos, 445 UI de VE por kg de alimento (Jewell, Toll, Wedekind & Zicked, 2000).

A VE tem também demonstrado ser útil para a terapêutica da dor, inflamação e reações alérgicas. A VE protege contra as alterações cutâneas induzidas pela exposição a raios UV, através de uma combinação de antioxidantes e propriedades absorptivas de UV, sendo de ponderar a sua aplicação tópica previamente à exposição solar. A VE tem demonstrado um papel importante na melhoria da resposta imunitária e a sua ação sobre os ácidos gordos poli-insaturados tem demonstrado ser útil na diminuição de doenças alérgicas.

- Terapêutica com vitamina E e ciclosporina

Em 2002 foi feito um estudo em que foi testada a variação na biodisponibilidade de ciclosporina, quando administrada concomitantemente com VE. Foram usadas duas formulações de ciclosporina existentes no mercado e os resultados não foram conclusivos, pois em apenas uma das apresentações a administração de VE levou à maior biodisponibilidade de ciclosporina e não houve diferenças significativas na biodisponibilidade da outra apresentação testada (Fischer, Harkin & Freeman, 2002). Em 2011, chegou-se à conclusão de que a suplementação com uma formulação com VE e Zinco-carnosina não seria suficiente para diminuir os efeitos secundários gastrointestinais consequentes do início da administração de ciclosporina em cães com DAc (Wilson, Rosenkrantz & Roycroft, 2011). Desta forma, pode concluir-se que a administração concomitante de VE e ciclosporina pode não alterar a biodisponibilidade da segunda e que ainda não existem estudos que apoiem que a administração de VE possa ajudar a controlar os efeitos secundários da administração de ciclosporina.

- Vitamina D

A vitamina D é naturalmente produzida pela pele após exposição a radiação UV, mas também pode ser obtida através da alimentação e está envolvida na manutenção da barreira cutânea, na resposta imunitária e na produção de péptidos antimicrobianos. O estudo do seu papel na terapêutica da DA, indica que poderá ser usada como um elemento adicional pelo seu papel na redução do prurido e redução das lesões agudas e crônicas como manifestação da doença (Klinger et al., 2018).

7. Poderá o *stress* oxidativo ser um fator importante na dermatite atópica canina?

Várias doenças cutâneas demonstraram estar associadas a um aumento da concentração de RL, lesão celular e lesões consequentes em outros tecidos (Briganti & Picardo 2003, Sivaranjani, Venkata & Rajeev, 2013). Na pele, está bem documentada a influência do *stress* oxidativo no envelhecimento da pele e no desenvolvimento de neoplasias cutâneas (Ji & Li, 2016). Nas últimas décadas, o *stress* oxidativo tem sido documentado como responsável por um papel importante na DAh (Tsuboi et al., 1998; Omata et al., 2001; Niwa et al., 2003; Tsukahara et al., 2003; Briganti & Picardo, 2003; Sivaranjani, Rao & Rajeev, 2013; Ji & Li, 2016). Recentemente têm ainda sido publicadas evidências da importância do envolvimento do *stress* oxidativo na DAc (Kapun et al., 2012; Kapun et al., 2014). A inflamação cutânea característica da DA é propícia à maior produção de radicais livres, que consequentemente levam ao maior número de lesões oxidativas (Valko et al., 2007; Briganti & Picardo, 2003), tendo já sido sugerido que exista uma relação entre a peroxidação lipídica e as manifestações clínicas em cães com DAc, pela correlação encontrada entre o marcador MDA e o CADESI-03 (Kapun et al., 2012). Por outro lado, o *stress* oxidativo promove a inflamação tissular através da regulação de genes que codificam citocinas pro-inflamatórias (Li & Ji, 2016). Ademais, está também estudado que a homeostase dos antioxidantes presentes na pele como a VE está alterada em cães com a doença (Antille et al., 2002; Hozyasz et al., 2004), o que pode significar que o estímulo oxidativo crônico na DAc pode desencadear uma resposta que direciona a VE para o tecido alvo de forma a reduzir os efeitos da lipoperoxidação (Antille et al., 2002).

Dado o envolvimento do *stress* oxidativo na inflamação cutânea, deve ser analisado o seu importante papel na patogênese da doença, que nos poderá levar a compreender melhor o desenvolvimento e manutenção da doença. Estes dados podem levar à incorporação de moléculas não utilizadas habitualmente e à elaboração de novas estratégias de terapêutica multimodal, como o uso combinado de fármacos anti-inflamatórios, agentes

imunomoduladores, formulações para equilíbrio da barreira cutânea e agentes antioxidantes (Li & Ji, 2016).

7.1. Alguns conceitos sobre *stress* oxidativo

O termo “*stress* oxidativo” foi introduzido para investigação em biologia e medicina em 1985 e é definido como uma alteração no equilíbrio entre pro-oxidantes e antioxidantes, em benefício dos primeiros (Sies, 1985). Atualmente, a definição tem vindo a sofrer alterações, de forma a expressar o dinamismo envolvido no processo. Os organismos vivem num ambiente de constante produção de RL. Deste modo, existem processos de controlo para a manutenção de níveis reduzidos destas substâncias, isto é, a sua produção e eliminação estão equilibradas para a permanência num nível estacionário (Lushchak, 2014). Contudo, este equilíbrio pode ser alterado, sob certas circunstâncias, tais como o aumento dos níveis de componentes endógenos ou exógenos que sofram oxidação associada à produção de RL, depleção das reservas de antioxidantes de baixa massa molecular, inativação de enzimas antioxidantes, diminuição da produção de enzimas antioxidantes e antioxidantes de baixa massa molecular ou a conjugação dos vários fatores enumerados. O aumento do nível estacionário de RL resulta num desequilíbrio entre os processo de produção e eliminação e afeta a grande maioria dos processos biológicos, sendo denominado de *stress* oxidativo (Lushchak, 2014). Se os sistemas antioxidantes forem capazes de atuar sob os níveis de RL presentes, o seu nível retorna aos valores iniciais. Em alguns casos, a célula ou os sistemas antioxidantes não conseguem neutralizar os valores elevados de RL, pelo que podem induzir perturbações significativas na homeostase. Um último cenário pode estar presente, por exemplo, quando existe uma alteração no estado fisiológico do organismo, e os níveis de RL não retornam ao intervalo inicial, acabando por estabilizar num novo nível quase-estacionário (Lushchak, 2014). O excesso de formação de RL e/ou a alteração no sistema antioxidante, resulta num processo que pode ser um importante mediador de lesão em estruturas celulares, como lípidos, membranas, proteínas e ADN (Valko et al., 2007).

- Fontes de RL

As células estão exposta a uma grande variedade de RL de fontes exógenas e endógenas (Schallreuter & Wood, 1989; Kohen, Fanberstein & Tirosh, 1997). Nas fontes exógenas podem ser incluídos o oxigénio, o ozono, a radiação ionizante e não ionizante, os poluentes atmosféricos, vários fármacos, xenobióticos e agentes químicos, bem como bactérias, vírus e os próprios alimentos (Ames, 1986; Pentland, 1994; Evelson, Ordonez, Llesuy & Boveris, 1997; Naito, Yoshikawa, Yoshida & Kondo, 1998; Podda, Traber, Weber, Yan & Packer, 1998; Bhalla, 1999; Kanner & Lapidot, 2001; Shadyro, Yurkova & Kisel, 2002). É relevante esclarecer que a presença de bactérias e vírus pode resultar na produção de RL pela

libertação direta pelos mesmos ou pela resposta endógena induzida por fagócitos e neutrófilos. Apesar da exposição do organismo a RL através de fontes exógenas ser elevada, a exposição a fontes endógenas é muito mais importante e extensiva, já que se trata de um processo contínuo, ao longo do ciclo de vida de todas as células do organismo. As principais fontes endógenas de RL são as mitocôndrias (durante a produção de ATP) (Richter et al., 1995), a maioria das enzimas (Friedl, Till, Trentz & Ward, 1989; Deliconstantinos, Villiotou & Stavrides, 1996) e os leucócitos (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos), através do seu mecanismo de combate a bactérias (Ginsburg, 1998). Também vários processos fisiológicos levam ao aumento da produção de RL, como o desenvolvimento embrionário e o envelhecimento (Harman, 1956; Harman, 1972; Ornoy, Zaken & Kohen, 1999). Muitas doenças servem também de fonte para a produção contínua de RL, podendo destacar-se os casos em que está presente inflamação, como na DA.

- Propriedades químicas de RL

A maioria dos RL têm um período de semivida muito curto, pelo que reagem rapidamente com outras moléculas. O ambiente fisiológico, caracterizado pelo seu pH, tem uma grande influência no tempo de semivida dos RL. A toxicidade destes elementos não é necessariamente correlacionada com a reatividade (Kohen & Nyska, 2002). Em muitos casos, a maior semivida de uma espécie pode indicar uma maior toxicidade do elemento, uma vez que lhe atribui tempo suficiente para se difundir e atingir uma localização sensível, onde poderá interagir e causar alterações num local distante daquele onde foi produzido. Por outro lado, uma espécie extremamente reativa, com uma semivida extremamente curta, é produzida no local onde pode originar as alterações. Se o alvo biológico do radical não estiver adjacente ao seu local de produção, não irão existir alterações oxidativas (Kohen & Nyska, 2002). A elevada reatividade dos radicais e o seu curto período de semivida ilustram o seu potencial efeito tóxico, bem como as dificuldades inerentes à prevenção das alterações oxidativas. Para prevenir a interação entre os radicais e os alvos biológicos, o antioxidante deve estar presente no local onde os radicais são produzidos, para competir com o radical pelo substrato (Kohen & Nyska, 2002).

- Alvos de alterações oxidativas

O fluxo contínuo de RL de origem endógena e exógena resulta em alterações oxidativas contínuas e cumulativas aos componentes celulares, o que conduz a alterações em várias funções celulares (Comporti, 1989). Os alvos biológicos mais vulneráveis a alterações oxidativas são as enzimas, as membranas lipídicas e o ADN (Kohen & Nyska, 2002).

Todas as membranas celulares são especialmente vulneráveis a sofrer oxidação devido à sua elevada concentração de ácidos gordos insaturados. Esta alteração lipídica, usualmente

chamada de peroxidação lipídica ocorre em três estádios. Uma simples iniciação do processo pode originar uma reação em cadeia resultante na peroxidação de todos os lípidos insaturados presentes na membrana celular (Kohen & Nyska, 2002). As proteínas, que são também dos principais constituintes da membrana celular, podem ser alvos da ação dos RL. Após interação dos RL com proteínas, estas últimas podem sofrer alterações diretas ou indiretas, que originam perda de atividade enzimática, alteração nas funções celulares, como a produção de energia, interferência com a iniciação de potenciais de ação, assim como alterações no tipo de proteína celular (Kohen & Nyska, 2002). Apesar do ADN ser uma molécula estável e protegida, os RL podem interagir e causar vários tipos de alterações, como a modificação de bases ou alterações no sistema de reparação do ADN, entre outras (Kohen & Nyska, 2002).

CAPÍTULO III. O STRESS OXIDATIVO NA DERMATITE ATÓPICA CANINA: VITAMINA E COMO BIOMARCADOR DURANTE TERAPÊUTICA COM CICLOSPORINA

1. Introdução

A VE é um antioxidante lipossolúvel e o seu efeito clássico é reduzir e prevenir lesões oxidativas nos tecidos. Uma vez que a homeostase de VE se encontra alterada na DA no Homem, espelhando uma resposta adaptativa que leva à distribuição de VE no tecido alvo, reduzindo a sua concentração sérica, espera-se que o controlo terapêutico da DAc com ciclosporina, possa resultar num aumento sérico de VE ao longo do curso terapêutico, a par de uma melhoria nas manifestações clínicas, com redução da classificação do prurido e do CADESI-04.

2. Objetivos

Com a realização deste estudo pretende-se determinar o papel da VE como ferramenta de monitorização da DAc, relacionando o seu nível sérico com outros métodos de monitorização, mais comumente utilizados: CADESI-04 e classificação do prurido. Pretende-se ainda aferir o papel antioxidante da terapêutica com ciclosporina, possivelmente inerente à estabilização redox da doença e encontrar mais evidências que suportem a utilização terapêutica de VE na DAc.

3. Materiais e métodos

3.1. População em estudo

Todos os cães incluídos no grupo com DAc do presente estudo deslocaram-se ao Hospital Escolar da FMV-UL para uma consulta da especialidade de dermatologia entre Fevereiro e Agosto de 2015. Os canídeos tinham já diagnosticada DAc ou o diagnóstico foi realizado no momento da primeira avaliação sempre pelo mesmo elemento da equipa clínica (Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço – Médica Veterinária responsável pelo Serviço de Dermatologia e Imunoalergologia na FMV-UL) e aos quais foi prescrita terapêutica com ciclosporina numa dose de 5 mg/kg a cada 24 horas. Apenas foram incluídos cães com idade superior a 12 meses, sem qualquer outra doença diagnosticada, sendo realizada uma anamnese completa, exame físico completo e análise hematológica. Não existiu qualquer limitação referente a raça ou género para a inclusão de cães neste estudo. No entanto, a

todos foi exigida a manutenção da sua dieta habitual durante o período de acompanhamento.

É de referir que foi dada a possibilidade aos tutores de abandonarem o estudo em qualquer etapa e sem qualquer justificação e que os dados do estudo foram submetidos a aprovação da Comissão de Ética e Bem-Estar Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa.

Para a inclusão no presente estudo, todos os cães admitidos no grupo de animais com DAC tiveram que respeitar os critérios de inclusão e exclusão estipulados na tabela 3.

Tabela 3. Critérios de inclusão e exclusão de animais no grupo com DAC.

Critérios de inclusão do grupo com DAC
1. idade igual ou superior a 12 meses;
2. Diagnóstico clínico de dermatite atópica canina;
3. Administração de ciclosporina na posologia 5 mg/kg a cada 24 horas;
4. Manutenção da dieta constante ao longo do estudo;
5. Animais de tutores que concordaram em participar no estudo.
Critérios de exclusão do grupo com DAC
1. Animais com evidências clínicas de doenças concomitantes;
2. Animais com contraindicações para o início da terapêutica com ciclosporina, tal como a presença de um nódulo, uma neoplasia ou alergia conhecida à substância ativa;
3. Terapêutica antimicrobiana ou antifúngica nos últimos 7 dias;
4. Terapêutica com antihistamínicos nos últimos 14 dias;
5. Terapêutica com glucocorticóides orais ou tópicos nos últimos 28 dias;
6. Terapêutica com ciclosporina nos últimos 56 dias;
7. Terapêutica com ácidos gordos essenciais nos últimos 56 dias;
8. Animais que interrompam a terapêutica por um período igual ou superior a 48h.

Os animais incluídos no grupo controlo deslocaram-se ao HE da FMV-UL para cirurgia eletiva de orquiectomia ou ovariohisterectomia ou para consulta de rotina. Apenas foram incluídos os cães sem qualquer outra doença diagnosticada, sem sintomas que evidenciassem a presença de qualquer doença por diagnosticar, como a DAC e que respeitassem o período de privação farmacológica estipulado. Para tal seleção, foi realizada uma anamnese completa, exame físico completo e observação das análises hematológicas e bioquímicas.

Para a inclusão no presente estudo, todos os cães admitidos no grupo controlo tiveram que respeitar os critérios de inclusão e exclusão estipulados na tabela 4.

Tabela 4. Critérios de inclusão e exclusão de animais no grupo controlo.

Critérios de inclusão do grupo controlo
1. Animais saudáveis;
2. Cães aos quais foi feita uma colheita de sangue para efeito de análises pré-cirúrgicas ou de rotina;
3. Animais de tutores que concordaram em participar no estudo.
Critérios de exclusão do grupo controlo
1. Animais com evidências clínicas de doenças concomitantes;
3. Terapêutica antimicrobiana ou antifúngica nos últimos 7 dias;
4. Terapêutica com antihistamínicos nos últimos 14 dias;
5. Terapêutica com glucocorticóides orais ou tópicos nos últimos 28 dias;
6. Terapêutica com ciclosporina nos últimos 56 dias;
7. Terapêutica com ácidos gordos essenciais nos últimos 56 dias.

3.2. Diagnóstico de DAC

O diagnóstico de DAC foi realizado de acordo com critérios de diagnóstico validados e após exclusão de outras causas de prurido. Assim, todos os cães apresentavam uma história pregressa compatível com DAC, manifestações clínicas associadas à doença e foram excluídas outras doenças pruriginosas, não existindo resposta ao teste de eliminação-provocação e foi implementado um regime de controlo de pulgas. Foram ainda realizadas citologias cutâneas para avaliar a presença de infeções fúngicas e/ou bacterianas.

3.3. Terapêutica com ciclosporina

Todos os cães incluídos no estudo realizaram terapêutica com ciclosporina (Atopica®, Novartis Animal Health) numa dose de 5 mg/kg SID, dado que a todos foi necessária a implementação de um protocolo com agentes farmacológicos para controlo crónico da DAC, pela presença de crises responsivas a glucocorticóides orais, mas com recidivas pouco depois do término da administração, bem como apresentavam um quadro generalizado, não sendo recomendado o uso de formulações tópicas. É ainda de referir que, aquando da realização da componente prática do presente estudo, não estavam ainda disponíveis no mercado português as substâncias ativas oclacitinib e lokivetmab.

3.4. CADESI-04

O CADESI é uma escala indicativa da gravidade das manifestações da DAC. No presente estudo foi utilizado o mais recente CADESI-04, sendo avaliada a presença de eritema, como marcador de inflamação aguda, liquenificação, como marcador de inflamação crónica, bem

como a presença combinada de escoriação e alopecia, como marcador de prurido, numa escala de 0 a 3, em 20 regiões corporais. O maior resultado possível é 180 e as regiões em avaliação são as mais tipicamente afetadas num animal com DAc: região perilabial, pavilhões auriculares, axilas, patas dianteiras (faces dorsal e palmar), patas traseiras (faces dorsal e plantar), flexor ulnar do carpo, face palmar metacárpica, flancos, região inguinal, abdómen, períneo e face ventral da cauda (Olivry et al., 2014). Consoante o resultado obtido, pode classificar-se o grau de gravidade das manifestações clínicas segundo a tabela 5. A avaliação de cada animal foi registada em tabela própria, sendo que a tabela base pode ser consultada no anexo 1.

Tabela 5. Gravidade das manifestações clínicas da DAc segundo o CADESI-04.

CADESI-04	Gravidade das manifestações clínicas da DAc
10 - 34	Ligeira
35 - 59	Moderada
60 - 180	Grave

3.5. Classificação do prurido

Para a classificação do prurido representativa do período mais próximo à consulta foi utilizada uma escala visual numérica de 0 a 10 com descrição relacionada com o nível de gravidade, frequência e alterações comportamentais, encontrando-se nos extremos inferior um animal que não se coça em momento algum e, no extremo superior, um animal que se coça, lambe, morde e/ou esfrega com muita frequência, interrompendo até tarefas rotineiras como dormir, comer ou brincar na tentativa de alívio do prurido (Hill et al., 2007).

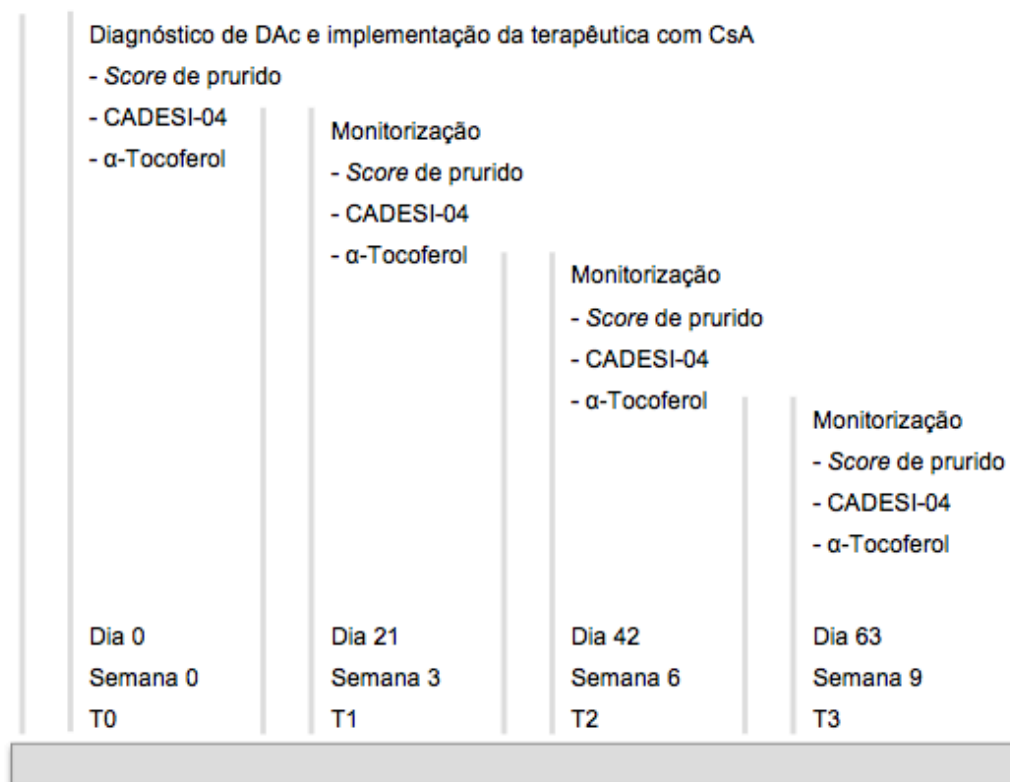
É de referir que os valores indicados correspondem à perceção do tutor e não a um dado objetivo (Hill et al., 2007; Rybníček et al., 2009), motivo pelo qual é importante que seja sempre o mesmo membro da família a realizar a avaliação (Plant, 2007).

3.6. Desenho do estudo

Na primeira consulta dos animais incluídos no grupo de cães com DAc foi confirmado ou realizado o diagnóstico da doença e, em seguida, elaborado o CADESI-04 e questionado aos tutores qual a classificação do prurido numa escala visual numérica de 0 a 10 com descrição relacionada com o nível de gravidade, frequência e alterações comportamentais. Foi também feita uma colheita de sangue para a realização de hemograma e análises bioquímicas da função hepática e renal que aferissem o estado de saúde dos cães previamente ao início da terapêutica, bem como permitissem determinar a concentração de VE serológica. Dado que foi prescrita terapêutica com ciclosporina, foi agendada a

monitorização a cada três semanas com a repetição do CADESI-04, nova avaliação da CP e nova colheita serológica para determinar a concentração de VE. Os vários momentos de avaliação encontram-se sistematizados na figura 3.

Figura 3. Esquema com os momentos de avaliação do presente estudo.



Ao grupo controlo, sendo feitas análises pré-cirúrgicas ou de rotina para aferir o estado de saúde dos animais, foi também feita uma colheita de sangue para determinar a concentração de VE serológica.

3.7. Determinação da vitamina E

A determinação da VE foi realizada seguindo um protocolo laboratorial cedido pelo Professor Doutor José Prates e pela Doutora Cristina Alfaia, sendo adaptado às amostras em causa. Os materiais utilizados encontram-se enumerados no anexo 2 e, no anexo 3 encontra-se o protocolo laboratorial (etapas de saponificação e extração) para a análise de cada 16 amostras. As amostras foram saponificadas de forma a hidrolisar os lípidos e extrair a vitamina, depois seguiu-se a extração com n-hexano e, em seguida, a determinação por *HPLC* (Agilent 1100 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Alemanha), em fase normal e deteção por fluorescência.

O *HPLC* trata-se de uma técnica de cromatografia usada para separar os componentes de uma mistura, identificar os mesmos e quantificá-los. Um volume de 20 µl da amostra foi injetada através do injetor automático e arrastada pela fase móvel (hexano-isopropanol (99:1)) que se encontrava sob pressão (45 bar), através da coluna (Agilent Zorbax Rx-Sil, 5 µm tamanho de partícula, 4,6 mm ID x 25 cm) que continha a fase estacionária. Os componentes da amostra foram separados através de interações com a fase móvel e com a fase estacionária. Estes compostos, ao saírem da coluna, passaram por um detetor que gerou um sinal elétrico proporcional à quantidade de compostos em análise ao passar na célula do detetor (Parreira, 2013). O processo foi realizado a uma temperatura de +20°C, com fluxo de 1,0 ml/min e o tempo de corrida foi de 17 minutos. A detecção de tocoferóis por UV foi realizada a um comprimento de onda de 295 nm (excitação) e 325 nm (emissão). O equipamento encontrava-se ligado a um computador (HP Compaq dc5800, Califórnia, Estados Unidos da América) onde se registaram e processaram os dados necessários de forma a gerar o cromatograma, o qual foi utilizado para identificar e quantificar os componentes da mistura. A análise quantitativa foi realizada comparando a resposta do componente presente na mistura com a resposta (área do pico) de soluções padrão cuja concentração é exatamente conhecida (Parreira, 2013).

3.8. Análise estatística

Inicialmente foi criada uma base de dados através do programa Microsoft® Excel® para Mac 2011 versão 14.0.0 (100825) com todos os valores determinados na análise *HPLC*, bem como os valores de CADESI-04 e da classificação do prurido obtidos pelo acompanhamento dos cães em estudo. Para análise dos dados obtidos, utilizou-se o programa R® versão R 3.4.3 GUI 1.70 El Capitan build (7463) para iMAC OS X e a sua extensão R Commander®.

Foi realizada a estatística descritiva das variáveis quantitativas obtendo-se a média e desvio padrão dos diferentes parâmetros em avaliação (teor de α -tocoferol (µmol/L), classificação do CADESI-04 e prurido) em função do tempo (nos vários momentos em avaliação).

Foi feita uma análise da variância recorrendo ao método ANOVA para medidas repetidas, sendo testado cada um dos parâmetros (teor de α -tocoferol (µmol/L), classificação do CADESI-04 e do prurido), tendo em consideração que foi analisado o mesmo indivíduo ao longo do tempo.

Com a aplicação do teste Shapiro-Wilk, percebeu-se que os valores de teor de α -tocoferol (µmol/L) nos momentos em que os valores de classificação obtidos no CADESI-04 foram superiores e os mais baixos e também nos momentos em que os valores da CP obtidos foram superiores e os mais baixos não tinham uma distribuição normal, pelo que estes dados foram comparados através do teste não paramétrico de Wilcoxon.

Para a comparação entre o teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) obtido no grupo controlo e o valor obtido no grupo de cães com DAC antes do início da terapêutica foi usado um teste-t emparelhado.

A comparação entre o grupo controlo e os vários momentos de avaliação após o início da toma de ciclosporina foi realizada mediante a aplicação de um teste-t emparelhado e, como foram usadas comparações múltiplas, o valor de p foi ajustado, segundo o método de Holm (1979).

Por fim, foram obtidos gráficos relativos à média de teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$), classificação do CADESI-04 e do prurido nos vários momentos de avaliação e ainda um gráfico *boxplot* para avaliar a distribuição do teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) em cães saudáveis e com DAC ao longo da terapêutica com ciclosporina.

Para a análise de dados foi considerado um intervalo de confiança de 95% e, por isso, todos os valores de $p < 0,05$ considerados como estatisticamente significativos.

4. Resultados

4.1. Caracterização da amostra

Foram incluídos no estudo 21 cães diagnosticados com DAC como descrito anteriormente e a realizar terapêutica com ciclosporina na posologia de 5mg/kg/SID e 6 cães não atópicos, saudáveis como grupo controlo. Estes últimos não se encontravam a tomar qualquer medicação.

No grupo de animais com DAC 13 cães eram fêmeas e 8 machos, apresentando idades compreendidas entre 1 ano e os 13 anos e 8 meses. No mesmo grupo, o peso variou entre os 1,6 kg e os 45,8 kg e foram seleccionados 17 cães de raça (81%) e 4 cães sem raça definida (19%).

No grupo controlo, 4 eram fêmeas e 2 machos, com idades compreendidas entre 9 meses e 7 anos. O peso variou entre os 6,6 kg e os 41 kg, sendo que 3 cães eram de raça, 2 cruzados e 1 cão sem raça determinada.

4.1.1. Caracterização do grupo de animais com DAC

Na tabela 6 estão sumarizadas as características dos cães incluídos no grupo com DAC, nomeadamente género, raça, idade aquando da inclusão no presente estudo e peso.

Tabela 6. Caracterização dos animais com DAC.

ID	Gênero	Raça	Idade aquando da inclusão no presente estudo	Peso (kg)
1	fêmea inteira	Yorkshire Terrier	9 anos e 2 meses	7,2
2	macho inteiro	Basset Hound	9 anos e 7 meses	21
3	fêmea esterilizada	West Highland White Terrier	4 anos e 2 meses	6,8
4	fêmea esterilizada	Weimaraner	1 ano e 4 meses	29,4
5	fêmea esterilizada	SRD	2 anos e 9 meses	7
6	fêmea inteira	Bouledogue Francês	2 anos e 6 meses	12,2
7	fêmea inteira	Retriever do Labrador	4 anos e 2 meses	32,5
8	fêmea inteira	SRD	3 anos e 1 mês	21
9	macho inteiro	Bouledogue Francês	2 anos e 3 meses	11
10	fêmea inteira	Beagle	3 anos e 10 meses	15
11	fêmea esterilizada	Bouledogue Francês	1 ano e 4 meses	12
12	fêmea inteira	Yorkshire Terrier	2 anos e 6 meses	1,6
13	macho inteiro	SRD	2 anos e 3 meses	20
14	macho inteiro	Retriever do Labrador	6 anos e 4 meses	45,8
15	macho inteiro	Retriever do Labrador	2 anos e 3 meses	36
16	macho inteiro	West Highland White Terrier	7 anos	10
17	fêmea esterilizada	SRD	1 ano e 6 meses	22
18	macho inteiro	Boxer	1 ano	26
19	fêmea inteira	Shih Tzu	5 anos e 10 meses	8
20	macho inteiro	Retriever do Labrador	13 anos e 8 meses	31,7
21	fêmea esterilizada	Weimaraner	1 ano e 3 meses	29

SRD – sem raça definida.

- Distribuição por género

No que toca à distribuição de género, houve uma maior prevalência de fêmeas. Dos 21 cães incluídos, 13 eram fêmeas (62%) e 8 machos (38%). Na tabela 7 pode ainda observar-se o número de cães esterilizados e inteiros, sendo que a maioria dos animais pertencia ao segundo grupo (71%).

Tabela 7. Distribuição de animais com DAC por género.

Género	Número de animais	
	Frequência absoluta	Frequência relativa
Fêmea	Inteira	7 33%
	Esterilizada	6 29%
Macho	Inteiro	8 38%
	Esterilizado	0 0%
Total	21	100%

- Distribuição por raça

Na tabela 8 encontram-se os dados relativos à distribuição de cães com DAC por raça. Foram incluídos no estudo 17 cães de raça (81%), sendo o Retriever do Labrador a mais representada (19%) e 4 cães sem raça definida (19%).

Tabela 8. Distribuição de animais com DAC por raça.

Raça	Número de animais
Retriever do Labrador	4
Bouledogue Francês	3
Yorkshire Terrier	2
West Highland White Terrier	2
Weimaraner	2
Basset Hound	1
Boxer	1
Shih Tzu	1
Beagle	1
SRD	4
Total	21

SRD – sem raça definida.

- Distribuição etária

A distribuição etária dos animais com DAC incluídos no estudo pode ser analisada na tabela 9 sendo notório que o grupo de cães adultos é o mais representado.

Tabela 9. Distribuição etária dos animais com DAc incluídos no estudo.

Faixa etária	Número de animais	
	Frequência absoluta	Frequência relativa
Adulto jovem (> 1 ano e ≤ 2 anos)	5	24%
Adulto (> 2 anos e ≤ 8 anos)	13	62%
Geriátrico (>8 anos)	3	14%
Total	21	100%

4.1.2. Caracterização do grupo controlo

No grupo controlo, foram incluídos 4 fêmeas (67%) e 2 machos (33%). As restantes características dos cães incluídos no grupo controlo, nomeadamente género, raça, idade aquando da inclusão no presente estudo e peso estão presentes na tabela 10.

Tabela 10. Caracterização dos cães incluídos no grupo controlo.

ID	Género	Raça	Idade aquando da inclusão no presente estudo	Peso (kg)
Controlo 1	macho inteiro	xPinscher Miniatura	3 anos	6,6
Controlo 2	fêmea esterilizada	Weimaraner	1 ano e 9 meses	27
Controlo 3	fêmea inteira	Cão Boieiro de Berna	9 meses	35,5
Controlo 4	fêmea inteira	xPodengo Português	7 anos	10,5
Controlo 5	fêmea inteira	SRD	3 anos e 3 meses	8,5
Controlo 6	macho inteiro	Cão da Serra da Estrela	2 anos e 1 mês	41

SRD – sem raça definida; x – cruzado.

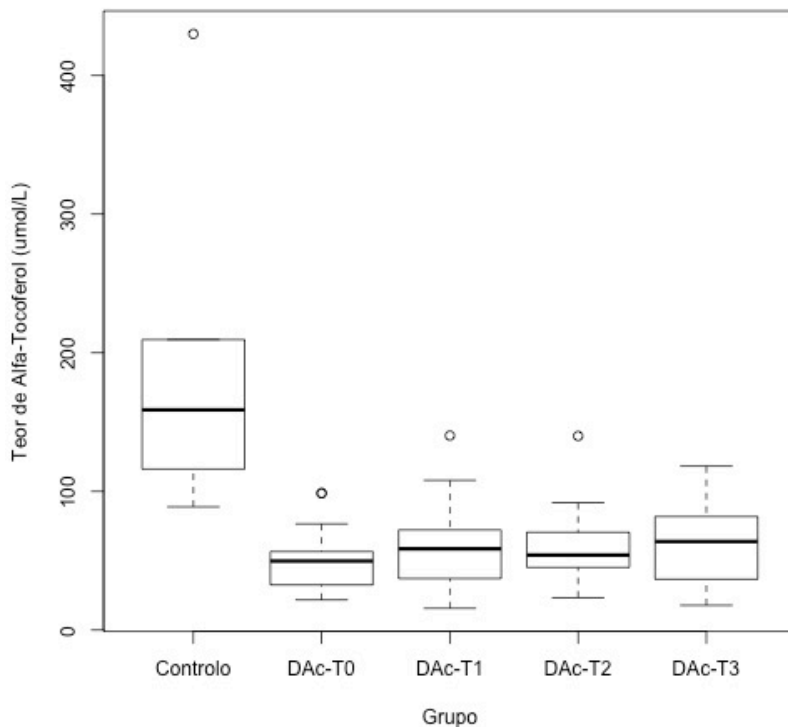
4.2. Teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$)

- Cães saudáveis e cães com dermatite atópica

Existiu uma diferença significativa entre o teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) de cães saudáveis, quando comparados com cães com DAc antes do início da terapêutica, $t(5) = -2,78$, $p = 0,04$.

No gráfico 1 é possível observar a distribuição média do teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) sendo expostos os dados do grupo controlo e do grupo de cães com DAc, nos vários momentos de avaliação (T0, T1, T2 e T3).

Gráfico 1 - *Boxplot* da distribuição do teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) nos grupos controlo e com DAc (T0, T1, T2 e T3).



o – outlier

- Cães com dermatite atópica durante terapêutica com ciclosporina

Após o início da toma de ciclosporina, não existiu uma diferença significativa entre o teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) de cães saudáveis e de cães com DAc em tratamento. Isto verificou-se 3 semanas, $t(4) = -2,65$, $p = 0,18$, 6 semanas, $t(3) = -1,97$, $p = 0,28$ e 9 semanas após o início da terapêutica com CsA, $t(2) = -2,16$, $p = 0,28$.

No grupo de cães com DAc, assistiu-se a um ligeiro aumento da média do teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) ao longo do tempo, o que se pode observar no gráfico 2, sendo que a maior diferença foi verificada entre a primeira consulta e a monitorização realizada 3 semanas após o início da toma de ciclosporina. Apesar da evolução observada, não existem diferenças significativas entre os vários períodos em avaliação, $F(1, 3) = 0,86$, $p = 0,47$. Na tabela 11 é possível observar o teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) obtido ao longo das várias consultas dos cães com DAc, enquanto a tabela 12 expõe qual o teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) do grupo controlo.

Tabela 11. Teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) no grupo de cães com DAc ao longo do tempo.

ID	Teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$)			
	T0	T1	T2	T3
1	98,65	45,88	48,59	NA
2	51,68	74,78	62,36	118,18
3	56,67	NA	NA	NA
4	29,46	27,65	46,18	21,82
5	32,67	40,84	45,16	36,66
6	34,73	38,98	NA	NA
7	25,26	60,97	55,84	66,94
8	49,78	90,85	80,8	63,89
9	25,86	15,65	23,38	17,85
10	40,77	108,05	40,42	45,88
11	32,62	35,38	30,74	28
12	27,09	31,02	43,53	NA
13	76,64	58,6	89,85	76,46
14	54,84	54,07	52,38	102,27
15	51,01	69,72	64,31	81,93
16	71,97	66,59	70,49	NA
17	21,71	29,76	50,2	43,49
18	59,46	85,51	91,8	NA
19	98,74	140,28	139,98	84,33
20	55,88	59,46	64,78	NA
21	44,72	NA	NA	NA
Número (n)	21	19	18	13
Média	49,53	59,69	61,16	60,59
Desvio Padrão	22,38	30,85	27,04	31,42

Tabela 12. Teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) no grupo controle.

ID	Teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$)
Controlo 1	116,13
Controlo 2	430,01
Controlo 3	209,51
Controlo 4	155,09
Controlo 5	88,88
Controlo 6	162,57
Média	199,92
Desvio Padrão	136,38

4.3. CADESI-04

No gráfico 3 é possível observar a evolução da média da classificação do CADESI-04 obtido ao longo das várias consultas do grupo de cães com DAc. Ao longo do tempo, assistiu-se a uma diminuição significativa do CADESI-04, $F(3, 3) = 9,27$, $p < 0,001$, sendo que a maior diferença entre as médias obtidas foi verificada entre a primeira consulta e a monitorização realizada 3 semanas após o início da toma de CsA.

Na tabela 13 é possível observar quais os valores de classificação do CADESI-04 obtido ao longo das várias consultas em cada animal do grupo de cães com DAc.

Na primeira consulta, a média de valores de CADESI-04 obtidos foi de 28,81 (DP=25,63), considerando-se um valor representativo de manifestações ligeiras de DAc. Apesar desta média, em três cães obteve-se uma classificação superior a 60 e como tal, o grau da manifestação da doença foi considerado grave e, em três outros cães, o grau de manifestação de doença foi considerado moderado. Por outro lado, 4 cães não tinham quaisquer manifestações cutâneas da doença.

Na segunda consulta, três semanas após o início da toma de ciclosporina, a média de valores de CADESI-04 obtidos foi de 13,84 (DP=12,97), considerando-se um valor representativo de manifestações ligeiras de DAc. Nenhum dos cães apresentou manifestações graves da doença, embora em dois, o grau de manifestação de doença foi considerado moderado. Em dez cães o CADESI-04 foi inferior a 10, valor a partir do qual as manifestações da doença são consideradas ligeiras.

Na terceira consulta, a média de valores de CADESI-04 obtidos foi de 11 (DP=9,13), considerando-se um valor representativo de manifestações ligeiras de DAc. Nenhum dos cães apresentou manifestações graves ou moderadas da doença. Em nove cães o CADESI-04 foi inferior a 10.

Na quarta consulta, a média de valores de CADESI-04 obtidos foi de 12,69 (DP=11,70), o que se trata de um valor representativo de manifestações ligeiras de DAc. Nenhum dos cães apresentou manifestações graves da doença, embora um dos cães tenha apresentado manifestações moderadas. Em 8 cães o CADESI-04 foi inferior a 10.

Tabela 13. CADESI-04 no grupo de animais com DAc ao longo do tempo.

ID	CADESI-04			
	T0	T1	T2	T3
1	52	20	19	NA
2	95	24	24	9
3	69	NA	NA	NA
4	29	3	0	7
5	45	38	23	2
6	27	9	NA	NA
7	25	6	12	12
8	18	2	3	2
9	49	29	22	37
10	27	10	18	32
11	20	11	12	7
12	6	1	0	NA
13	0	6	6	8
14	29	34	9	24
15	10	3	7	7
16	63	36	23	NA
17	0	1	0	0
18	0	2	0	NA
19	31	23	18	18
20	10	5	2	NA
21	0	NA	NA	NA
Número (n)	21	19	18	13
Média	28,81	13,84	11,00	12,69
Desvio Padrão	25,63	12,97	9,13	11,70

4.4. Classificação do prurido

No gráfico 4 é possível observar a evolução da média da classificação do prurido indicado pelos tutores ao longo das várias consultas. Assistiu-se a uma redução significativa da CP ao longo do tempo, $F(3, 3) = 21,24$, $p < 0,001$, sendo que a maior diferença entre a média foi verificada entre a primeira consulta e a monitorização realizada 3 semanas após o início da toma de ciclosporina.

Na tabela 14 é possível observar qual a classificação do prurido indicado pelos tutores em cada uma das consultas.

Na primeira consulta, a média da CP foi de 6,45 (DP=2,21), sendo que nenhum dos tutores indicou que o seu animal tivesse uma CP dentro dos valores normais (inferior a 1,9). Já na segunda consulta, a média da CP foi de 3,16 (DP=1,76), sendo que três tutores indicaram que o seu animal tinha uma CP dentro dos valores normais. Ao momento da terceira consulta, a média de CP foi de 3,53 (DP=1,96), aumentando ligeiramente face ao valor anteriormente indicado, sendo que, em quatro cães, foram indicados valores normais. Na quarta consulta, a média de CP foi de 2,82 (DP=2,04), representando o valor mais baixo de entre todas as avaliações. Nesta consulta, 4 em 14 tutores indicaram valores correspondentes a uma classificação de prurido considerada normal.

Tabela 14. Classificação do prurido no grupo de animais com DAC ao longo do tempo.

ID	CP			
	T0	T1	T2	T3
1	5	7	6	4
2	10	3.5	2	2
3	5	NA	NA	NA
4	9	0	1	0
5	10	5	4	3
6	7	1	NA	NA
7	6	2	4.5	2
8	8	3	3	1
9	7	6.5	5.5	4.5
10	5	2.5	5	2.5
11	7	1	1	1
12	6	3	6	NA
13	2.5	2.5	3	2
14	9.5	5	5.5	8
15	8	3	2.5	3
16	3	2	2	NA
17	6	3.5	3	1.5
18	4.5	3	1.5	NA
19	7	3.5	7	5
20	3	3	1	NA
21	7	NA	NA	NA
Número (n)	21	19	18	14
Média	6.45	3.16	3.53	2.82
Desvio Padrão	2.21	1.76	1.96	2.04

Gráfico 2. Evolução do teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) ao longo das consultas no grupo de cães com DAC.

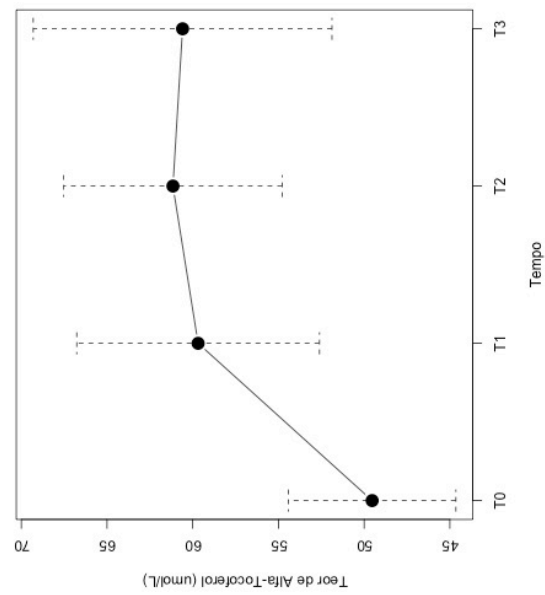


Gráfico 3. Evolução da classificação do CADESI-04 ao longo das consultas no grupo de cães com DAC.

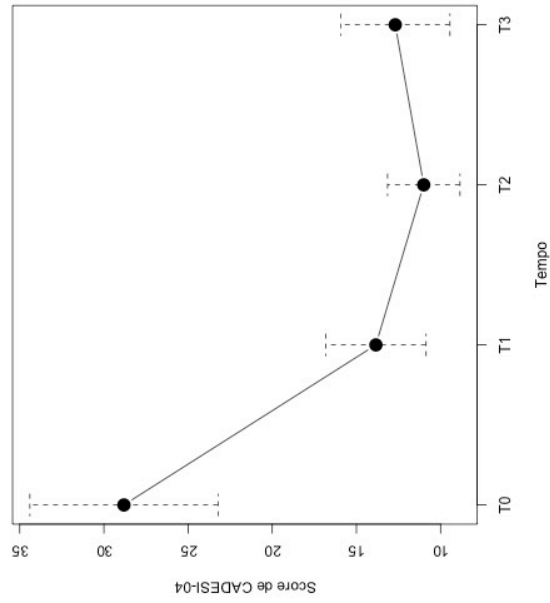
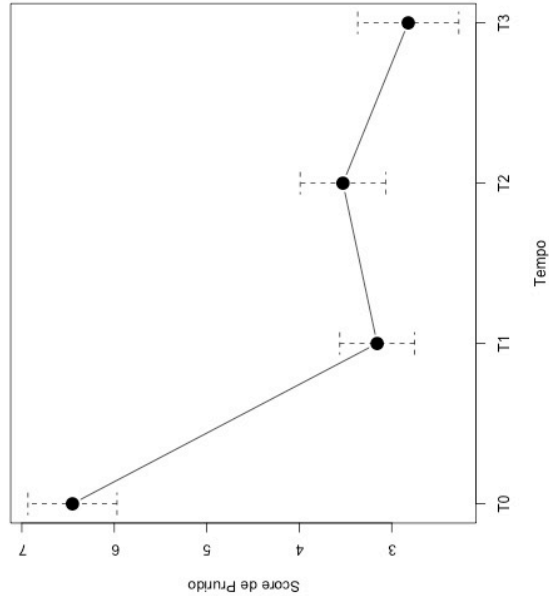


Gráfico 4. Evolução da classificação do prurido ao longo das consultas no grupo de cães com DAC.



4.5. Teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) e CADESI-04

Sendo o CADESI-04 um método validado de monitorização da DAc, procurou-se relacionar a classificação do CADESI-04 e o teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) obtido no mesmo momento. Assim, com base nas tabelas acima selecionou-se o momento em que o valor obtido no CADESI-04 foi máximo e mínimo e verificou-se o teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$), elaborando-se a tabela 15. Não foram detetadas diferenças significativas entre o teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) correspondente aos momentos em que o CADESI-04 foi máximo e mínimo, $Z = -1,71$, $p = 0,09$.

Tabela 15. Teor de α -tocoferol nos momentos em que o valor do CADESI-04 obtido foi máximo e mínimo.

ID	CADESI-04 máximo			CADESI-04 mínimo		
	Tempo	CADESI-04	α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$)	Tempo	CADESI-04	α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$)
1	T0	52	98,65	T2	19	48,59
2	T0	95	51,68	T3	9	118,18
3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	T0	29	29,46	T2	0	46,18
5	T0	45	32,67	T3	2	36,66
6	T0	27	34,73	T1	9	38,98
7	T0	25	25,26	T1	6	60,97
8	T0	18	49,78	T3	2	63,89
9	T0	49	25,86	T2	22	23,38
10	T0	27	40,77	T1	10	108,05
11	T0	20	32,62	T3	7	28
12	T0	6	27,09	T2	0	43,53
13	NA	NA	NA	NA	NA	NA
14	T1	34	54,07	T2	9	52,38
15	T0	10	51,01	T1	3	69,72
16	T0	63	71,97	T2	23	70,49
17	NA	NA	NA	NA	NA	NA
18	NA	NA	NA	NA	NA	NA
19	T0	31	98,74	T3	18	84,33
20	T0	10	55,88	T2	2	64,78
21	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Média		33,81	48,77		8,81	59,88
σ		22,85	23,55		7,77	26,50

4.6. Teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) e o prurido

Sendo a classificação do prurido um método validado de monitorização da DAC, procurou-se relacionar o valor de CP indicado pelos tutores com o teor de α -tocoferol obtido no mesmo momento. Assim, com base nas tabelas acima selecionou-se o momento em que o valor obtido na CP foi máximo e mínimo e verificou-se o teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$), elaborando-se a tabela 16. Detetou-se que existia uma diferença significativa entre o teor de α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$) obtido nos momentos em que a CP foi máxima e mínima $Z = -2,43$, $p = 0,01$.

Tabela 16. Teor de α -tocoferol nos momentos em que a CP obtida foi máxima e mínima.

ID	CP máxima			CP mínima		
	Tempo	Valor CP	α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$)	Tempo	Valor CP	α -tocoferol ($\mu\text{mol/L}$)
1	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	T0	10	51,68	T3	2	118,18
3	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	T0	9	29,46	T3	0	21,82
5	T0	10	32,67	T3	3	36,66
6	T0	7	34,73	T1	1	38,98
7	T0	6	25,26	T3	2	66,94
8	T0	8	49,78	T3	1	63,89
9	T0	7	25,86	T3	4,5	17,85
10	T0	5	40,77	T3	2,5	45,88
11	T0	7	32,62	T3	1	28
12	T0	6	27,09	T1	3	31,02
13	NA	NA	NA	NA	NA	NA
14	T0	9,5	54,84	T1	5	54,07
15	T0	8	51,01	T2	2,5	64,31
16	NA	NA	NA	NA	NA	NA
17	T0	6	21,71	T3	1,5	43,49
18	T0	4,5	59,46	T2	1,5	91,8
19	T0	7	98,74	T1	3,5	140,28
20	T0	3	55,88	T2	1	64,78
21	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Média		7,06	43,22		2,19	58,00
σ		1,99	19,42		1,36	34,13

5. Discussão

Na nossa opinião, no presente estudo destacam-se três dados como mais relevantes. Em primeiro lugar foram observadas diferenças significativas entre o teor de α -tocoferol de cães saudáveis e o mesmo indicador em cães com DAc. Segundo, não existem diferenças significativas entre o teor de α -tocoferol de animais com DAc que se encontrem a fazer terapêutica com ciclosporina e animais saudáveis, logo após 3 semanas do início da terapêutica, mesmo quando se sabe que este fármaco pode ainda não estar a funcionar em pleno, aproximando-se mesmo os níveis de teor de α -tocoferol de cães com DAc de valores normais. Por fim, é ainda de salientar que se encontrou uma associação entre a diminuição da classificação do prurido e o aumento plasmático de α -tocoferol ao longo da terapêutica com ciclosporina.

- Teor de α -tocoferol em cães saudáveis e em cães com dermatite atópica

Como mencionámos anteriormente, no presente estudo foram encontradas diferenças significativas entre o teor de α -tocoferol em cães saudáveis, quando comparados com cães com DAc. Por outro lado, não existem diferenças significativas entre o teor de α -tocoferol do grupo controlo e o teor de α -tocoferol do grupo com DAc determinado após o início da toma da CsA, em qualquer um dos momentos em avaliação (3, 6 ou 9 semanas após o início da terapêutica). Este resultado poderá indicar que os valores de α -tocoferol são superiores em cães saudáveis, quando comparados com cães com DAc, o que está de acordo com a bibliografia consultada (Kapun et al., 2012). A ausência de diferenças significativas entre o teor de α -tocoferol do grupo controlo e o teor de α -tocoferol do grupo de cães com DAc após o início da terapêutica indica que, quando o *stress* oxidativo é controlado, parece resultar na aproximação dos valores de α -tocoferol à normalidade logo após as 3 semanas do início da toma de ciclosporina. Tal como anteriormente referido, a ciclosporina é um antialérgico pouco específico e com um grande número de mecanismos de ação, atuando a nível do prurido e com muitos outros efeitos, como a sua ação sobre a expressão de genes, a inibição da ativação de células imunitárias e a inibição de mediadores inflamatórios. Considera-se que este efeito muito abrangente, de alguma forma, terá contribuído para a redução do *stress* oxidativo, bem como das necessidades antioxidantes tissulares.

Também uma anomalia num mecanismo metabólico da VE poderia justificar a diferença de valores entre cães saudáveis e com DAc, como uma anomalia na síntese de quilomícrons que impediria a VE de ser secretada, uma alteração na α -TTP ou a presença de um síndrome de mal-absorção lipídica (Kayden & Traber, 1993). No entanto, não foi encontrada qualquer associação entre estas anomalias e a DA na bibliografia consultada.

- Teor de α -tocoferol e classificação do prurido

No presente estudo foi, como já dissemos, encontrada uma associação entre a diminuição da classificação do prurido e o aumento plasmático de α -tocoferol.

Observando-se que o prurido está controlado, não existindo alterações na dieta, a única razão para o aumento dos níveis de α -tocoferol está relacionada com o menor consumo no local, o que transparece um maior controlo no *stress* oxidativo.

O processo inflamatório característico das fases da DAC, conduz à presença de sintomas como o prurido, que se manifesta através de coçar, esfregar, morder, lambear e/ou abanar da cabeça, o que, por sua vez, origina lesões cutâneas. A interrupção da barreira cutânea consequente permite uma maior entrada de alérgenos, agentes pro-oxidantes, bem como aumenta a suscetibilidade à entrada e ao desenvolvimento de infeções bacterianas e fúngicas. Em resposta, o sistema imunitário perpetua a resposta inflamatória, que é propícia à maior produção de radicais livres, que consequentemente levam ao maior número de lesões oxidativas (Valko et al., 2007; Briganti & Picardo, 2003), e sabe-se ainda que o *stress* oxidativo promove a inflamação tissular através da regulação de genes que codificam citocinas pro-inflamatórias (Li & Ji, 2016). Esta resposta inflamatória e oxidativa leva uma vez mais ao aumento do prurido, o que permite que o ciclo recomece. Com o início da terapêutica com ciclosporina, que se conhece como muito eficaz no tratamento da DAC e no controlo das manifestações sintomatológicas da doença, houve uma diminuição da classificação do prurido. A interrupção deste ciclo, permite restabelecer a barreira cutânea e consequentemente controlar a entrada de agentes exógenos. A ciclosporina regula também a resposta mediada por células e diminui a produção de citocinas pro-inflamatórias (White et al., 2018), o que controla o processo inflamatório e, em resposta, diminui o *stress* oxidativo associado. A diminuição das necessidades antioxidantes a nível dos tecidos, permite que haja uma menor mobilização da VE presente em circulação, observando-se assim que o teor de α -tocoferol sérico aumente à medida que a CP diminui.

- Teor de α -tocoferol e CADESI-04

Apesar da expectável relação entre o teor de α -tocoferol e o CADESI-04, não se verificou que existissem diferenças significativas entre os valores de α -tocoferol obtidos nos momentos em que o valor de CADESI-04 foi máximo e mínimo. Sugere-se que a ausência de relação possa estar relacionada com o facto do CADESI-04 avaliar também a presença de lesões crónicas e, dado o período de renovação cutânea, o acompanhamento dos cães em estudo não foi feito durante o período necessário à reversão de todas as lesões, apesar da eficácia da terapêutica com ciclosporina ter sido evidente.

Alguns cães incluídos no presente estudo apresentavam um CADESI-04 na primeira avaliação de grau ligeiro. Estes, apesar de não manifestarem um CADESI-04 representativo

de gravidade de doença correspondente a um nível moderado ou grave, tratavam-se de cães com elevada recorrência de crises e/ou com uma classificação de prurido elevada. Para que todos os critérios de inclusão fossem cumpridos (como o tempo de privação farmacológica estabelecida), cães que estivessem medicados ou precisassem de medicação de suporte adicional à prevista não foram incluídos no presente estudo.

Ainda assim, é possível considerar que um animal que apresente uma redução das manifestações clínicas do seu quadro lesional em 50% nas primeiras 4 semanas após o início da terapêutica é altamente responsivo à mesma, sendo possível que a redução lesional a curto prazo (1 mês de tratamento) possa prever a resposta a longo prazo (Steffan et al., 2006). Neste estudo, os pontos de avaliação entre as 3 e as 6 semanas demonstraram que na maioria dos cães houve a redução de 50% ou mais na classificação do CADESI-04, pelo que poderia prever-se uma boa continuação da resposta à terapêutica. A existência de eventos agravantes do quadro clínico pode então justificar que o decurso da doença não tenha seguido o esperado, sendo que seria também interessante verificar se a classificação do CADESI-04 seria compatível com o teor de α -tocoferol a longo prazo.

- α -Tocoferol como método de monitorização para estudos em DAC

Atualmente, os métodos de monitorização da DAC mais utilizados e internacionalmente aceites e validados são a escala de prurido e o CADESI-04, pelo que foram os métodos considerados como *gold standard* e com os quais foi comparado o teor de α -tocoferol. Contudo, estes dois métodos são subjetivos e não isentos de variação interpessoal como já foi demonstrado. A utilização de escalas de prurido já evidenciou a presença de discrepâncias face à utilização de um método objetivo com monitores colocados no pulso de pacientes com DAh (Rees, 2004). Na aplicação do CADESI-04 foi descrita uma elevada fiabilidade da comparação de valores obtidos por diferentes operadores (Olivry et al., 2014). No entanto, estes têm que ser altamente treinados de forma a conseguir-se obter esse grau de uniformização entre operadores, o que exige também dedicação e tempo, não sendo muito viável fora de um cenário mais académico. Neste âmbito, a utilização de um método de monitorização objetivo poderia ser uma mais valia, principalmente no que toca à monitorização da DA em estudos clínicos, sendo que o presente estudo sugere que a avaliação do teor de α -tocoferol poderia ser um método a considerar, dado que o objetivo terapêutico é obter conforto e qualidade de vida para o cão afetado e o teor de α -tocoferol acompanhou a melhoria da principal manifestação clínica da doença – o prurido.

- Teor de α -tocoferol em cães com dermatite atópica ao longo da terapêutica com ciclosporina

O valor médio do teor de α -tocoferol aumentou entre a avaliação realizada antes do início da toma da ciclosporina e 3 semanas após a implementação da terapêutica, bem como aumentou entre este último momento e 6 semanas após o início da toma de ciclosporina. Apenas não se assistiu a um aumento do valor médio do teor de α -tocoferol entre o momento de avaliação T2 e T3, talvez por já se ter obtido o potencial de aumento. Apesar destas observações, não foram encontradas diferenças significativas entre as avaliações dos vários intervalos. Desta forma, julga-se que o período de tempo do presente estudo, possa não ter sido suficiente para se verificarem alterações significativas a nível das necessidades antioxidantes dos tecidos.

Também se verificou que, sendo pacientes reais, existiram alguns casos de agravamento devido a situações imprevistas (tal como a presença de pulgas) ao longo do período de acompanhamento. É ainda de salientar que, tratando-se de cães de consulta de referência, poderá existir uma maior dificuldade em estabilizar o seu quadro clínico.

- Terapêutica com vitamina E

Pensamos que a inclusão de VE no plano terapêutico multimodal da DAC poderá ser uma medida a ponderar, ainda que deva ser objeto de maior investigação, uma vez que foi encontrado um valor significativamente mais elevado do teor de α -tocoferol em cães saudáveis quando comparado com cães com DAC, bem como foram encontradas evidências neste estudo de que animais com DAC estão sujeitos a um maior nível de *stress* oxidativo. Ademais, sabe-se que a VE é uma substância segura e pouco dispendiosa. Esta ideia vem reforçada do facto de literatura recente demonstrar ainda uma redução das manifestações dos sinais clínicos da DAC com a administração de VE (Kapun et al., 2014).

A diminuição do teor plasmático de α -tocoferol em cães com DAC poderá ser justificado pela sua mobilização cutânea para redução da peroxidação lipídica. O aumento do *stress* oxidativo está relacionado com a patogénese da doença, sendo uma das causas responsáveis pela lesão tissular, sendo que também foi já confirmado que o *stress* oxidativo, bem como os níveis de peroxidação lipídica estão aumentados em pacientes com a doença. Dado o elevado nível de *stress* oxidativo e a necessidade de mobilização de agentes antioxidantes, julga-se que a suplementação com antioxidantes, como a VE, poderia ajudar oferecendo mais ferramentas para o controlo do *stress* oxidativo.

- Seleção e caracterização da amostra

Na seleção da amostra não foram aplicados critérios de exclusão com base em raça ou género e, no que toca à idade, apenas foi estipulado o limite inferior de 1 ano, de forma a

que a amostra fosse o mais representativa possível da população atópica que se apresenta habitualmente no cenário clínico real. Desta forma, a todos os cães que se apresentassem à consulta em que fosse feito o diagnóstico de DAc ou confirmado o mesmo e a quem fosse aconselhada a toma de ciclosporina, com análise da evolução da doença e manifestações clínicas, foi proposta a inclusão no presente estudo. Dado que foi feito um acompanhamento dos cães em estudo ao longo do tempo, considerou-se adequada a seleção de 21 animais tendo em conta também as limitações temporais.

- **Análise estatística**

Ao analisar estatisticamente os dados, observou-se que existia uma grande variabilidade entre os indivíduos, o que poderá ter que ver com os diferentes graus iniciais da doença, a cronicidade da doença, a idade do animal, com as diferenças na alimentação e com a individualidade da resposta à terapêutica, no entanto, nos testes estatísticos utilizados, esta variabilidade foi tida em consideração, tendo-se optado por testes estatísticos adequados, tal como o teste estatístico ANOVA para medidas repetidas, que é usado quando existem 3 ou mais medidas repetidas em análise nos mesmos indivíduos, tal como o que se verifica no presente estudo. A aplicação deste teste estatístico tem em consideração a variabilidade individual dos dados e assimila-a como uma variação sistemática.

- **Marcadores de *stress* oxidativo**

Apesar de existirem vários marcadores de *stress* oxidativo, a sua escolha como parâmetro de medição na bibliografia consultada não tem sido conclusiva. Não foram encontradas diferenças significativas entre cães com DAc e animais saudáveis no que toca aos marcadores TAC, GPX e SOD, ainda que tenha sido demonstrada uma correlação entre o CADESI-03 e o marcador MDA (Kapun et al., 2012). Num outro estudo, com suplementação de VE, não foram encontradas diferenças significativas nos marcadores SOD, GPX e MDA entre o grupo placebo e o grupo a que foi administrada VE (Kapun et al., 2013).

- **Monitorização da doença – classificação do prurido e CADESI-04**

Apesar de ter sido demonstrado que as escalas numéricas influenciam os tutores para a escolha de números inteiros ou divididos igualmente, resultando na perda de capacidade de gerar informação contínua, este fator apenas tem maior relevância para a análise estatística de dados (Rybníček et al., 2009). De forma a apoiar a utilização de escalas numéricas, foi demonstrado que, quando o mesmo animal foi avaliado por duas pessoas diferentes, o grau de concordância entre duas respostas foi maior com a utilização de escalas numéricas e com descritivos relacionados com a gravidade, ao invés de descritivos relacionados com alterações comportamentais e escalas visuais analógicas (Hill et al., 2007). Desta forma, foi

usada uma escala numérica de 0 a 10 em conjunto com uma outra escala de avaliação – CADESI-04, tal como recomendado (Torrance, Feeny & Furlong, 2001). A escala fez-se acompanhar de descrições indicativas do nível de gravidade, frequência e alterações comportamentais. Como os valores indicados correspondem à percepção do tutor e não a um dado objetivo (Hill et al., 2007; Rybníček et al., 2009), foi solicitado que fosse o mesmo membro da família a realizar a avaliação (Plant, 2007). É também de assinalar que existe sempre aversão à utilização dos valores mais extremos da escala por parte do avaliador (Torrance et al., 2001), sendo esta maior aquando da utilização de escalas analógicas (Hill et al., 2007), não tendo sido esta a opção utilizada. Também é de referir que o prurido é um sintoma manifestado de forma intermitente, com gravidade também inconsistente e através de comportamentos extremamente variáveis (Plant, 2007).

O CADESI-04 foi aplicado sempre pelo mesmo elemento do corpo clínico, sendo que a Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço é também a médica veterinária mais experiente do Hospital Escolar da FMV-UL na aplicação deste método de monitorização. Assim, procurou-se reduzir discrepâncias relacionadas com variabilidade interindividual e ausência de experiência na aplicação do CADESI-04.

6. Limitações do estudo e algumas considerações

A VE é obtida através da alimentação. Desta forma, uma das limitações do presente estudo tem que ver com a uniformização da alimentação dos cães em análise. Dado tratarem-se de pacientes reais, não seria viável que todos realizassem a mesma alimentação, pelo que foi solicitado aos tutores que não fizessem qualquer alteração na alimentação do animal no curso do ensaio clínico, de forma a que a concentração sérica de VE obtida possa ser comparada ao longo do tempo. Foi ainda solicitado que não fosse realizada qualquer suplementação, como com ácidos gordos ou VE. Esta questão poderá levar a que exista uma maior variabilidade de resultados obtidos entre estudos e entre animais, limitando a sua comparação direta e a obtenção de um intervalo de referência para a concentração sérica de VE em cães saudáveis ou com DAC. Apesar disto, os autores Esterbauer et al. (1992) defendem que não existem diferenças significativas na concentração sérica de VE de cães a consumir diferentes rações comercializadas, pelo que não foram aplicados, neste estudo, outros critérios condicionantes associados a esta questão.

O número de cães a incluir no estudo foi também limitado aos cães presentes em consulta da especialidade de dermatologia no Hospital da FMV-UL, diagnosticados com DAC e que cumprissem a privação farmacológica estabelecida. Outras premissas tinham de ser cumpridas, tais como tratarem-se de animais saudáveis, com exceção da doença referida e demonstrarem disponibilidade para uma monitorização a cada três semanas. Dado que a população de cães com DAC é muito elevada, acreditando-se que represente 10 a 15% da

população canina, o presente estudo trata-se de um estudo preliminar, não sendo possíveis extrapolações para a população canina em geral.

Idealmente, o grupo controlo a utilizar seria emparelhado no que toca a género, raça e idade com os cães pertencentes ao grupo com DAC e de número equivalente. No entanto, de forma a cumprir os restritos critérios estabelecidos para inclusão o grupo controlo e também cumprindo os prazos previstos, reduzindo os custos laboratoriais e por uma questão deontológica, foram apenas incluídos seis cães saudáveis. Noutros estudos com análise do teor de α -tocoferol também detetámos a seleção de grupos controlo com 10 ou menos cães (Kasamatsu et al., 2009; Winter et al., 2009; Kirkegaard et al., 2010; Raila, Rohn, Schweigert & Abraham, 2011; Finotello et al., 2014; Barks & Williams, 2018).

Uma vez que não existem valores de referência para o teor de α -tocoferol, a utilização de um grupo controlo é essencial à análise criteriosa de dados. A consulta da bibliografia permitiu verificar que os valores de α -tocoferol obtidos em cães saudáveis são díspares, sendo que a maioria se encontra entre o valor de 29,70 $\mu\text{mol/L}$ (DV=5,80) e 128 $\mu\text{mol/L}$ (DV=21,3) (Johnston, Knox, Gettinby & Griffiths, 2001; McLellan et al., 2002; Tran, Horvath, Krammer, Höller & Zentek, 2007; Winter et al., 2009; Kasamatsu et al., 2009; Kirkegaard et al., 2010; Raila et al., 2011; Galler et al., 2012; Kapun et al., 2013; Karayannopoulou et al., 2013; Ferreira et al., 2014; Finotello et al., 2014; Reimann et al., 2017). É de referir que no presente estudo, o grupo controlo apresentou valores superiores aos indicados. Esta discrepância de valores pode ser justificada pela metodologia utilizada.

Dado que foram incluídos no presente estudo pacientes reais, para que fosse possível ter a maior adesão possível dos tutores e por uma questão de cumprimento dos prazos previstos para a recolha de amostras, estabeleceu-se que o acompanhamento dos cães em estudo seria feito até às 9 semanas após o início da toma de ciclosporina. Tendo em consideração que a ciclosporina se encontra em pleno funcionamento entre as 3 e as 6 semanas após o início da sua toma, considerou-se que até às 9 semanas seria possível obter os resultados de uma ação em pleno deste fármaco. Foram determinadas avaliações a cada três semanas, de forma a monitorizar a evolução clínica da doença, adaptação à terapêutica com ciclosporina e determinação da concentração sérica de VE. Contudo, o acompanhamento durante o período de 9 semanas e esta frequência de visita constituíram uma dificuldade no cumprimento do estabelecido, dado que nem sempre foi possível que os tutores se apresentassem em consulta em datas compatíveis com o plano agendado. Também os efeitos secundários experienciados por alguns dos cães no início da terapêutica com ciclosporina, como vômito, náusea, perda de apetite e letargia se revelaram uma dificuldade, pois testaram a adesão dos tutores à terapêutica.

É também de referir que, para a avaliação da classificação do prurido, é importante inquirir sempre o mesmo tutor, de forma a obter um valor comparável ao longo do tempo, o que se pode revelar uma dificuldade, dado que nem sempre o mesmo tutor acompanha o animal à

consulta. Apesar de estar estudado que existe alguma aversão por parte dos tutores na escolha dos valores 0 e 10 da escala de CP, neste estudo esta não foi notada dado que os tutores indicaram facilidade na escolha dos vários valores da escala pela compreensão da descrição comportamental e de gravidade que a acompanhou.

7. Conclusões e perspectivas futuras

O presente estudo permitiu concluir que existem diferenças significativas entre o teor de α -tocoferol de cães saudáveis e o mesmo indicador em cães com DA. Decorridas 3 semanas após o início da terapêutica com ciclosporina não existe diferença significativa entre o teor de α -tocoferol de cães saudáveis e o mesmo indicador em cães com DA. Estes resultados indicam que este fármaco reduz os eventos que contribuem para o aumento do *stress* oxidativo e, como tal, reduzem-se as necessidades antioxidantes no tecido, levando ao aumento sérico do teor de α -tocoferol.

Também se encontrou uma associação entre a diminuição da classificação do prurido e o aumento do teor de α -tocoferol ao longo da terapêutica com ciclosporina, refletindo que um maior controlo do prurido com recurso à terapêutica com ciclosporina contribui para a interrupção do ciclo do prurido e permite restabelecer a barreira cutânea, resultando no controlo do processo inflamatório e na diminuição do *stress* oxidativo associado.

Sugere-se que o teor de α -tocoferol possa ser um método de monitorização objetiva da evolução da doença, o que pode ser particularmente importante se aplicado em estudos de monitorização clínica.

A elaboração do presente estudo permitiu explorar, mesmo que a uma pequena escala, a importância do *stress* oxidativo na DA, sendo este um tema que tem suscitado cada vez maior interesse na comunidade científica e ainda permitiu refletir sobre a potencial utilização de VE para fins terapêuticos.

Estudos futuros poderão permitir avaliar se estes achados são também verificados quando aplicados a outros métodos terapêuticos, incluindo aqueles de resposta mais rápida como, por exemplo, o oclacitinib ou o lokivetmab. Também no caso da utilização de uma amostra maior, poder-se-ia verificar se a monitorização e utilização terapêutica da VE deveriam ser ajustadas relativamente à gravidade inicial de manifestações clínicas da doença. Seria interessante conduzir este mesmo estudo durante mais tempo, sendo que, nesse caso, seria de esperar que fosse possível relacionar o teor de α -tocoferol com o CADESI-04, dado que seria dado mais tempo à recuperação das lesões representativas de inflamação crónica na pele.

BIBLIOGRAFIA

- Ames, B.N. (1986). Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. *Progress in Clinical and Biology Research*: 206, 3-32.
- Antille, C., Sorg, O., Lübbecke, J. & Saurat, J. (2002). Decreased oxidative state in non-lesional skin of atopic dermatitis. *Dermatology*: 204(1), 69-71.
- Arlan, L.G., Platts-Mills, T.A.E. (2001). The biology of house dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*: 107, S406-13.
- Bangert, C., Brunner, P.M. & Stingi, G. (2011). Immune functions of the skin. *Clinics in Dermatology*: 29(4), 360-76.
- Barks, P.C. & Williams, D.A. (2018). Serum concentrations of lipid-soluble vitamins in dogs with exocrine pancreatic insufficiency treated with pancreatic enzymes. *Journal of Veterinary Internal Medicine*: 15292.
- Baskin, C., Hinchcliff, K., DiSilvestro, R., Reinhart, G., Hayek, M., Chew, B., Burr, J. & Swenson, R. (2000). Effects of dietary antioxidant supplementation on oxidative damage and resistance to oxidative damage during prolonged exercise in sled dogs. *American Journal of Veterinary Research*: 61(8), 886-91.
- Beccati, M., Martini, V., Comazzi, S., Fanton, N. & Cornegliani, L. (2016). Lymphocyte subpopulations and Treg cells in dogs with atopic dermatitis receiving ciclosporin therapy: a prospective study. *Veterinary Dermatology*: 27(1), 17-e5.
- Beco, L., Guaguère, E., Lorente Méndez, C., Noli, C., Nuttall, T. & Vroom, M. (2013). Suggested guidelines for using systemic antimicrobials in bacterial skin infections: part 2 – antimicrobial choice, treatment regimens and compliance. *Veterinary Record*: 172(6), 156-6.
- Bendich, A. & Machlin, L.J. (1988). Safety of oral intake of vitamin E. *American Journal of Clinical Nutrition*: 48, 612-619.
- Bensignor, E. & Carlotti, D.N. (2002). Sensitivity patterns to house dust mites and forage mites in atopic dogs: 150 cases. *Veterinary Dermatology*: 13(1), 37-42.
- Bensignor, E., Pin, D. & Bourdeau, P. (2013). A multicentric randomised controlled single blinded study to evaluate the value of a new protocol with a shampoo and a foam to treat canine allergic dermatitis (in French). *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*: 48, 49-55.
- Bhalla, D.K. (1999). Ozone-induced lung inflammation and mucosal barrier disruption: toxicology, mechanisms, and implications. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part B. Critical Reviews*: 2(1), 31-86.
- Bieber, T. (2010). Atopic dermatitis. *Annals of Dermatology*: 22(2), 125-37.
- Bieber, T. & Novak, N. (2009). Pathogenesis of atopic dermatitis: new developments. *Current Allergy and Asthma Reports*: 9(4), 291-4.
- Bizikova P., Papich, M.G., Olivry, T. (2008). Hydroxyzine and cetirizine pharmacokinetics and pharmacodynamics after oral and intravenous administration of hydroxyzine to healthy dogs. *Veterinary Dermatology*: 19, 348-57.

- Blaskovic, M., Rosenkrantz, W., Neuber, A., Sauter-Louis, C. & Mueller, R.S. (2014). The effect of a spot-on formulation containing polyunsaturated fatty acids and essential oils on dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Journal*: 199, 39-43.
- Bond, R., Lamport, A.I. & Lloyd, D.H. (2000). Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. *Research in Veterinary Science*: 68, 291-293.
- Bond, R., Saijonmaa-Koulumies, L.E. & Lloyd, D.H. (1995). Population sizes and frequency of *Malassezia pachydermatis* at skin and mucosal sites on healthy dogs. *Journal of Small Animal Practice*: 36, 147-150.
- Borrego, L.M., Rosa, S., Alguero, C., Trindade, H & Rosado Pinto, J. (2007). Regulatory cells. *Revista Portuguesa de Pneumologia*: 13(3), 365-76.
- Bourdeau P., Bruet, V. & Gremillet, C. (2007). Evaluation of phytosphingosine-containing shampoo and microemulsion spray in the clinical control of allergic dermatoses in dogs: preliminary results of a multicentre study (abstract). *Veterinary Dermatology*: 18, 177-8.
- Bourguignon, E., Favarato, E.S., Guimarães, L.D. & Ferreira, T.S. (2013). Dermatology in Dogs and Cats. In *Insights from Veterinary Medicine*. (pp. 3-34). INTECH Open Access Publisher. Acedido em Jun 6, 2018, em <http://dx.doi.org/10.5772/53660>.
- Bousquet, J., Lockey, R. & Malling, H. (1998). Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*: 102, 558-62.
- Bridgett, C. & Norén, P. (2017). Stress and Atopic Dermatitis. In França K. & Jafferany M. (Eds.) *Stress and Skin Disorders: Basic and Clinical Aspects*. Suíça: Springer.
- Briganti, S. & Picardi, M. (2003). Antioxidant activity, lipid peroxidation and skin diseases. What's new. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*: 17(6), 663-9.
- Brigelius-Flohé, R. & Traber, M. (1999). Vitamin E: function and metabolism. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal*: 13, 1145-1155.
- Bruet, V., Bourdeau, P.J., Roussel, A., Imparato, L. & Desfontis, J.C. (2012). Characterization of pruritus in canine atopic dermatitis, flea bite hypersensitivity and flea infestation and its role in diagnosis. *Veterinary Dermatology*: 23(6), 487-e493.
- Bunnell, R.H., Keating, J., Quaresimo, A. & Parman, G. K. (1965). Alpha-tocopherol content of foods. *American Journal of Clinical Nutrition*: 17, 1-10.
- Cadot, P., Hensel, P., Bensignor, E., Hadjaje, C., Marignac, G., Beco, L., Fontaine, J., Jamet, J.F., Georgescu, G., Campbell, K., Cannon, A., Osborn, S.C., Messinger, L., Gogny-Goubert, M., Dubreuil, P., Moussy, A. & Hermine, O. (2011). Masitinib decreases signs of canine atopic dermatitis: a multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Veterinary Dermatology*: 22, 554-64.
- Caraffa, A.L., Varvara, G., Spinasi, E., Kritas, S.K., Lessiani, G., Ronconi, G., Saggini, A., Antinolfi, P., Frydas, I., De Tommaso Morrison, M.C. & Conti, P. (2016). Is vitamin E an anti-allergic compound? (abstract). *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*: 30(1), 11-5.
- Carlotti, D.N., Gribeauval, C., Costargent, F.A., Ganiayre, J. & Viaud, S.E. (2013). A retrospective survey of the results of allergen-specific immunotherapy in 205 atopic

dogs in Aquitaine, France (1989–2001). *Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*: 48, 41-7.

- Casimiro, T. (2017). Caracterização do fenótipo do Cão de Água Português com Dermatite Atópica Canina. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade de Lisboa.
- Chen, T.A. & Hill, P.B. (2005). The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Veterinary Dermatology*: 16(1), 4-26.
- Chesney, C. (2011). Canine atopy - inside out, or outside in? *Veterinary Record*: 168(20), 533-4.
- Chryssantou, E., Broberger, U. & Petrini, B. (2001). *Malassezia pachydermatis* fungaemia in a neonatal intensive care unit. *Acta Paediatrica*: 90, 323-327.
- Clark, R. & Kupper, T. (2005). Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. *Journal of Investigative Dermatology*: 125(4):629-37.
- Comporti, M. (1989). Three models of free radical-induced cell injury. *Chemico-Biological Interactions*: 72(1-2),1-56.
- Cosgrove, S.B., Wren, J.A., Cleaver, D.M., Martin, D.D., Walsh, K.F., Harfst, J.A., Follis, S.L., King, V.L., Boucher, J.F. & Stegemann, M.R. (2013). Efficacy and safety of oclacitinib for the control of pruritus and associated skin lesions in dogs with canine allergic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 24,479-e114.
- De Benedetto, A., Agnihothrei, R., McGirt, L.Y., Bankova, L.G. & Beck, L.A. (2009). Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *Journal of Investigative Dermatology*: 129(1),14-30.
- De Vos, C., Maleux, M.R., Baltes, E. & Gobert, J. (1987). Inhibition of histamine and allergen skin wheal by cetirizine in four animal species. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*: 59, 278-82.
- DeBoer, D.J. & Hillier, A. (2001a). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 81(3-4), 271-6.
- DeBoer, D.J., Hillier, A. (2001b). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVI): laboratory evaluation of dogs with atopic dermatitis with serum-based “allergy” tests. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 81, 277-87.
- DeBoer, D.J., & Marsella, R. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 81(3-4), 239-249.
- DeBoer, D.J., Schafer, J.H., Salsbury, C.S., Blum, J.R., Beale, K.M., Vitale, C.B., Muse, R., Moriello, K.A., Garfield, R.A., Keefe, T.J. & McArthur, T.R. (2002). Multiple-center study of reduced-concentration triamcinolone topical solution for the treatment of dogs with known or suspected allergic pruritus. *American Journal of Veterinary Research*: 63, 408-13.
- DeBoer, D.J., Verbrugge, M. & Morris, M. (2010). Clinical and serological response of dust mite-sensitive dogs with atopic dermatitis to sublingual immunotherapy (abstract). *Allergo Journal International*: 19, 317.

- Deliconstantinos, G., Villiotou, V. & Stavrides, J.C. (1996). Nitric oxide and peroxynitrite released by ultraviolet B-irradiated human endothelial cells are possibly involved in skin erythema and inflammation. *Experimental Physiology*: 81(6), 1021-33.
- Dell, D.L., Griffin, C.E., Thompson, L.A. & Griffies, J.D. (2012). Owner assessment of therapeutic interventions for canine atopic dermatitis: a long-term retrospective analysis. *Veterinary Dermatology*: 23, 228-e47.
- Devriese, L.A., Vancanneyt, M., Baele, M., Vaneechoutte, M., De Graef, E., Snauwaer, C., Cleenwerck, I., Dawyndt, P., Swings, J., Decostere, A. & Haesebrouck, F. (2005). *Staphylococcus pseudintermedius* sp. Nov. A coagulase-positive species from animals. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*: 55(Pt4), 1569-1573.
- Dip, R., Carmichael, J., Letellier, I., Strehlau, G., Roberts, E., Bensignor, E. & Rosenkrantz, W. (2013). Concurrent short-term use of prednisolone with cyclosporine A accelerates pruritus reduction and improvement in clinical scoring in dogs with atopic dermatitis. *BMC Veterinary Research*: 9, 173.
- Eichenseer, M., Johansen, C. & Mueller, R.S. (2013). Efficacy of dimetinden and hydroxyzine/chlorpheniramine in atopic dogs: a randomised, controlled, double-blinded trial. *Veterinary Record*: 173, 423-6.
- Elias, P. (2018). Primary Role of Barrier Dysfunction in the Pathogenesis of Atopic Dermatitis. *Experimental Dermatology*: 27(8), 847-851.
- Elias, P. M., & Schmuth, M. (2009). Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Current allergy and asthma reports*: 9(4), 265-272.
- Evelson, P., Ordóñez C.P., Llesuy, S. & Boveris, A. (1997). Oxidative stress and in vivo chemiluminescence in mouse skin exposed to UVA radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*: 38(2-3), 215-9.
- Fanton, N., Santoro, D., Cornegliani, L. & Marsella, R. (2017). Increased filaggrin-metabolizing enzyme activity in atopic skin: a pilot study using a canine model of atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 28(5), 479-e111.
- Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W., & Picco, F. (2010). A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary dermatology*: 21(1), 23-31.
- Fernholz, E. (1938). On the constitution of alpha-tocopherol. *Journal of the American Chemical Society*: 60, 700-705.
- Ferreira, C.S., Vasconcellos, R.S., Pedreira, R.S., Silva, F.L., Sá, F.C., Kroll, F.S., Maria, A.P., Venturini, K.S. & Carciofi, A.C. (2014). Alterations to oxidative stress markers in dogs after a short-term stress during transport. *Journal of Nutritional Science*: 25, 3:e27.
- Finotello, R., Pasquini, A., Meucci, V., Lippi, I., Rota, A., Guidi, G., Marchetti, V. (2014). Redox status evaluation in dogs affected by mast cell tumour. *Veterinary and Comparative Oncology*: 12(2), 120-9.
- Fischer, J.R., Harkin, K.R. & Freeman, L.C. (2002). Concurrent administration of water-soluble vitamin E can increase the oral bioavailability of cyclosporine A in healthy dogs. *Veterinary Therapeutics*: 3(4), 465-73.

- Forsythe, P. & Paterson, S. (2014). Ciclosporin 10 years on: indications and efficacy. *Veterinary Record*: 174(Suppl 2): 13-21.
- Friedl, H.P., Till, G.O., Trentz, O. & Ward, P.A. (1989). Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. *American Journal of Pathology*: 135(1), 203-17.
- Fujimura, M. (2011). The study of canine atopic dermatitis involving the isolation of dogs. *Polish Journal of Veterinary Sciences*: 14, 273-7.
- Furue, M., Yamamura, K., Kido-Nakahara, M., Nakahara, T. & Fukui, Y. (2018). Emerging role of interleukin-31 and interleukin-31 receptor in pruritus in atopic dermatitis. *Allergy*: 73(1), 29-36.
- Gadeyne, C., Little, P., King, V.L., Edwards, N., Davis, K. & Stegemann, M.R. (2014). Efficacy of oclacitinib (Apoquel®) compared with prednisolone for the control of pruritus and clinical signs associated with allergic dermatitis in client-owned dogs in Australia. *Veterinary Dermatology*: 25(6), 512–8, e86.
- Gaga, M., Frew, A.J., Varney, V.A. & Kay, A.B. (1991). Eosinophil activation and T lymphocyte infiltration in allergen-induced late phase skin reactions and classical delayed-type hypersensitivity. *Journal of Immunology*: 147(3), 816-22.
- Galler, A., Tran, J.L., Krammer-Lukas, S., Höller, U., Thalhammer, J.G., Zentek, J. & Willmann, M. (2012). Blood vitamin levels in dogs with chronic kidney disease. *Veterinary Journal*: 192(2), 226-31.
- Gambineri, E., Torgerson, T.R., Ochs, H.D. (2003). Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Current Opinion in Rheumatology*: 15(4), 430-5.
- Gill, C., McEwan, N., McGarry, J. & Nuttall, T. (2011). House dust and storage mite contamination of dry dog food stored in open bags and sealed boxes in 10 domestic households. *Veterinary Dermatology*: 22, 162-72.
- Ginsburg, I. (1998). Could synergistic interactions among reactive oxygen species, proteinases, membrane-perforating enzymes, hydrolases, microbial hemolysins and cytokines be the main cause of tissue damage in infectious and inflammatory conditions? *Medical Hypotheses*: 51(4), 337-46.
- Gonzales, A.J., Fleck, T.J., Humphrey, W.R., Galvan, B.A., Aleo, M.M., Mahabir, S.P., Tena, J.K., Greenwood, K.G. & McCall, R.B. (2016). IL-31-induced pruritus in dogs: a novel experimental model to evaluate anti-pruritic effects of canine therapeutics. *Veterinary Dermatology*: 27(1), 34-e10.
- Gonzales, A.J., Humphrey, W.R., Messamore, J.E., Fleck, T.J., Fici, G.J., Shelly, J.A., Teel, J.F., Bammert, G.F., Dunham, S.A., Fuller, T.E. & McCall, R.B. (2013). Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 24(1), 48-53.
- Griffin, C.E. & DeBoer, D.J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 81(3-4), 255-69.

- Griffin, C.E. & Hillier, A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 81, 363-84.
- Gross, T.L., Walder, E.J. & Ihrke, P.J. (1997). Subepidermal bullous dermatosis due to topical corticosteroid therapy in dogs. *Veterinary Dermatology*: 8, 127-31.
- Guaguère, R., Steffan, J. & Olivry, T. (2004). Cyclosporin A: a new drug in the field of canine dermatology. *Veterinary Dermatology*: 15, 61-74.
- Halliwell, R., (2006). Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 114, 2007-2008.
- Halliwell, R. (2009). The immunopathogenesis of allergic skin diseases in dogs and cats. *European Journal of Companion Animal Practice*: 19(3), 209-21.
- Harman, D. (1956). Aging: a theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of Gerontology*: 11(3), 298-300.
- Harman, D. (1972). Free radical theory of aging: dietary implications. *American Journal of Clinical Nutrition*: 25(8), 839-43.
- Heaton, P., Reed, C., Mann, S., Ransley, R., Stevenson, J., Charlton, C., Smith, B., Harper, E. & Rawlings, J. (2002). Role of dietary antioxidants to protect against DNA damage in adult dogs. *Journal of Nutrition*: 132(6 Suppl 2), 1720S-4S.
- Henderson, W. & Kaliner, M. (1978). Immunologic and nonimmunologic generation of superoxide from mast cells and basophils. *Journal of Clinical Investigation*: 61, 187-96.
- Hibberson, C.E. & Vogelnest, L.J. (2014). Storage mite contamination of commercial dry dog food in south-eastern Australia. *Australian Veterinary Journal*: 92, 219-24.
- Hill, P.B. & DeBoer, D.J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 81, 159-68.
- Hill, P.B., Lau, P. & Rybnicek, J. (2007). Development of an owner-assessed scale to measure the severity of pruritus in dogs. *Veterinary Dermatology*: 18(5), 301-8.
- Hill, P.B. & Olivry, T. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (V): biology and role of inflammatory cells in cutaneous allergic reactions. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 81(3-4), 187-98.
- Hillier, A. & DeBoer, D.J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 81, 289-304.
- Hillier, A. & Griffin, C.E. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (X): is there a relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions? *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 81(3-4), 227-31.
- Hillier, A., Lloyd, D.H., Weese, J.S., 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), 163-75.

- Hobi, S. & Mueller, R.S. (2014). Efficacy and safety of rush immunotherapy with alum-precipitated allergens in canine atopic dermatitis. *Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere*: 42, 167-73.
- Holman, R.L. (1947). Prevention of experimental arteritis in dogs by vitamin E. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*: 66(2), 307-9.
- Holt, P.G. (2000). Parasites, atopy, and the hygiene hypothesis: resolution of a paradox? *Lancet*: 356(9243), 1699-1701.
- Hozyasz, K., Chelchowska, M., Laskowska-Klita, T., Ruszkowska, L. & Milanowski, A. (2004). Low concentration of alpha-tocopherol of atopic dermatitis patients. *Medycyna wieku rozwojowego*: 8(4 Pt 1), 963-9.
- Inman, A.O., Olivry, T., Dunston, S.M., Monteiro-Riviere, N.A. & Gatto, H. (2001). Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids in normal and atopic dogs. *Veterinary Pathology*: 38(6), 720-3.
- Iwasaki, T. & Hasegawa, A. (2006). A randomized comparative clinical trial of recombinant canine interferon-gamma (KT-100) in atopic dogs using antihistamine as control. *Veterinary Dermatology*: 17, 195-200.
- Jaeger, K., Linek, M., Power, H.T., Bettenay, S.V., Zabel, S., Rosychuk, R.A.W., & Mueller, R.S. (2010). Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Veterinary dermatology*: 21(1), 118-122.
- Javanbakht, M.H., Keshavarz, S.A., Djalali, M., Siassi, F., Eshraghian, M.R., Firooz, A., Seirafi, H., Ehsani, A.H., Chamari, M. & Mirshafiev, A. (2011). Randomized controlled trial using vitamins E and D supplementation in atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Treatment*: 22(3), 144-50.
- Jewell, D.E., Toll, P.W., Wedekind, K.J. & Zicker, S.C. (2000). Effect of increasing dietary antioxidants on concentrations of vitamin E and total alkenals in serum of dogs and cats. *Veterinary Therapeutics*: 1(4), 264-72.
- Ji, H. & Li, X.K. (2016). Oxidative Stress in Atopic Dermatitis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*: 2016, 2721469.
- Johnston, P.E., Knox, K., Gettinb, G. & Griffiths, I.R. (2001). Serum alpha-tocopherol concentrations in German shepherd dogs with chronic degenerative radiculomyelopathy. *Veterinary Record*: 148(13), 403-7.
- Kapun, A.P., Salobir, J., Levart, A., Kotnik, T. & Svete, A.N. (2012). Oxidative stress markers in canine atopic dermatitis. *Research in Veterinary Science*: 92, 469-70.
- Kapun, A.P., Salobir, J., Levart, A., Tavčar Kalcher, G., Nemeč Svete, A., & Kotnik, T. (2013). Plasma and skin vitamin E concentrations in canine atopic dermatitis. *Veterinary Quarterly*: 33(1), 2-6.
- Kapun, A.P., Salobir, J., Levart, A., Tavčar Kalcher, G., Nemeč Svete, A. & Kotnik, T. (2014). Vitamin E supplementation in canine atopic dermatitis: improvement of clinical signs and effects on oxidative stress markers. *Veterinary Record*: 175, 560.
- Karayannopoulou, M., Fytianou, A., Assaloumidis, N., Psalla, D., Constantinidis, T.C., Kaldrymidou, E. & Koutinas, A.F. (2013). Markers of lipid peroxidation and α -

tocopherol levels in the blood and neoplastic tissue of dogs with malignant mammary gland tumors. *Veterinary Clinical Pathology*: 42(3), 323-8.

- Kasamatsu, M., Kawauchi, R., Tsunokawa, M., Ueda, K., Uchida, E., Oikawa, S., Higuchi, H., Kawajiri, T., Uchida, S. & Nagahata, H. (2009). Comparison of serum lipid compositions, lipid peroxide, alpha-tocopherol and lipoproteins in captive marine mammals (bottlenose dolphins, spotted seals and West Indian manatees) and terrestrial mammals. *Research in Veterinary Science*: 86(2), 216-22.
- Kayder, H.J. & Traber, M.G. (1993). Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *The Journal of Lipid Research*: 34(3), 343-58.
- Kenner, J. & Lapidot, T. (2001). The stomach as a bioreactor: dietary lipid peroxidation in the gastric and the effect of plant derived antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*: 31, 1388-1395.
- Kennis, R.A., Rosser Jr., E.J., Olivier, N.B. & Walker, R.W. (1996). Quantity and distribution of *Malassezia* organisms on the skin of clinically normal dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*: 208, 1048-1051.
- Kim, H.J., Cronin, M., Ahrens, K., Papastavros, V., Santoro, D. & Marsella, R. (2016). A comparative study of epidermal tight junction proteins in a dog model of atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 27(1), 40-e11.
- Kimura, T. & Doi, K. (1999). Dorsal skin reactions of hairless dogs to topical treatment with corticosteroids. *Toxicologic Pathology*: 27, 528-35.
- Kirkegaard, M., Sonne, C., Jakobsen, J., Jenssen, B.M., Letcher, R.J. & Dietz, R. (2010). Organohalogens in a whale-blubber-supplemented diet affects hepatic retinol and renal tocopherol concentrations in greenland sled dogs (*Canis familiaris*). *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*: 73(12), 773-86.
- Klinger, C., Hobi, S., Johansen, C., Koch, H., Weber, K. & Mueller, R. (2018). Vitamin D shows in vivo efficacy in a placebo-controlled, double-blinded, randomised clinical trial on canine atopic dermatitis. *Veterinary Record*: 182(14), 406.
- Kohen, R., Fanberstein, D. & Tirosh, O. (1997). Reducing equivalents in the aging process. *Archives of Gerontology and Geriatrics*: 24(2), 103-23.
- Kohen, R. & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology*: 30(6), 620-50.
- Kovalik, M., Taszkun, I., Pomorski, Z., Kozak, M., Pomorska, D., Szczepanik, M, Wilkolek, P., Palenik, L., Shaw, D.J., van den Broek, A.H. & Thoday, K.L. (2011). Evaluation of a human generic formulation of ciclosporin in the treatment of canine atopic dermatitis with in vitro assessment of the functional capacity of phagocytic cells. *Veterinary Record*: 168, 537-42.
- Lambert, N.H. (1947). Cardiac disease in dogs and cats treated with vitamin E. *Veterinary Record*: 59(27), 355.
- Leung, D.Y., Harbeck, R., Bina, P., Reiser, R.F., Yang, E., Norris, D.A., Hanifin, J.M., Sampson, H.A. (1993). Presence of IgE antibodies to staphylococcal exotoxins on the skin of patients with atopic dermatitis. Evidence for a new group of allergens. *Journal of Clinical Investigation*: 92(3), 1374-80.

- Little, P.R., King, V.L., Davis, K.R., Cosgrove, S.B. & Stegemann, M.R. (2015). A blinded, randomized clinical trial comparing the efficacy and safety of oclacitinib and ciclosporin for the control of atopic dermatitis in client-owned dogs. *Veterinary Dermatology*: 26, 23-30.
- Lin, Y.T., Shau, W.Y., Wang, L.F., Yang, Y.H., Hwang, Y.W., Tsai, M.J., Tsao, P.N. & Chiang, B.L. (2000). Comparison of serum specific IgE antibodies to staphylococcal enterotoxins between atopic children with and without atopic dermatitis. *Allergy*: 55(7), 641-6.
- Link, M. & Favrot, C. (2010). Impact of canine atopic dermatitis on the health-related quality of life of affected dogs and quality of life of their owners. *Veterinary Dermatology*: 21(5), 456-62.
- Loewenstein, C. & Mueller, R.S. (2009). A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Veterinary Dermatology*: 20, 84–98.
- Löflath, A., von Voigts-Rhetz, A., Jaeger, K., Schmid, M., Kuechenhoff, H. & Mueller, R.S. (2007). The efficacy of a commercial shampoo and whirlpooling in the treatment of canine pruritus – a double-blinded, randomized, placebo- controlled study. *Veterinary Dermatology*: 18, 427-31.
- Loser, K. & Beissert, S. (2012). Regulatory T cells: banned cells for decades. *Journal of Investigative Dermatology*: 132(3 Pt 2), 864-71.
- Lourenço-Martins, A.M. (2011). Contribuição para o estudo da dermatite atópica canina na área metropolitana de Lisboa. Tese de Doutoramento em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Lourenço-Martins, A.M., Delgado, E., Neto, I., Peleteiro, M.C., Morais-Almeida, M. & Correia, J.H.D. (2011). Allergic conjunctivitis and conjunctival provocation tests in atopic dogs. *Veterinary ophthalmology*: 14(4), 248-256.
- Lourenço, A. M., Schmidt, V., São Braz, B., Nóbrega, D., Nunes, T., Duarte-Correia, J. H., Matias, D., Maruhashi, E., Rème, C. A. & Nuttall., T. (2016). Efficacy of proactive long-term maintenance therapy of canine atopic dermatitis with 0.0584% hydrocortisone aceponate spray: a double-blind placebo controlled pilot study. *Veterinary Dermatology*: 27-2, 88-e25.
- Lushchak, V.I. (2014). Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chemico-Biological Interactions*: 224, 164-75.
- Machlin, L.J. (1989). Use and safety of elevated dosages of vitamin E in adults. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*: 30, 56-68.
- Marsella, R. (2013a). Does filaggrin expression correlate with severity of clinical signs in dogs with atopic dermatitis? *Veterinary Dermatology*: 24(2), 266-e59.
- Marsella, R. (2013b). Fixing the skin barrier: past, present and future – man and dog compared. *Veterinary Dermatology*: 24(1), 73-6.
- Marsella, R., Ahrens, K. & Sanford, R. (2018). Investigation of the correlation of serum IL-31 with severity of dermatitis in an experimental model of canine atopic dermatitis using beagle dogs. *Veterinary Dermatology*: 29(1), 69-e28.
- Marsella, R., Genovese, D., Gilmer, L., Ahrens, K., Gatto, H. & Navarro, C. (2013b). Investigations on the effects of a topical ceramides-containing emulsion (Allerderm

- Spot on) on clinical signs and skin barrier function in dogs with atopic dermatitis: a double-blinded randomized controlled study. *Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*: 11, 110-6.
- Marsella, R. & Girolomoni, G. (2009). Canine models of atopic dermatitis: a useful tool with untapped potential. *Journal of Investigative Dermatology*: 129, 2351-2357.
- Marsella, R., Nicklin, C. & Lopez, J. (2006). Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Veterinary Dermatology*: 17(5), 306-12.
- Marsella, R., & Olivry, T. (2003). Animal models of atopic dermatitis. *Clinics in Dermatology*: 21(2), 122-133.
- Marsella, R., & Samuelson, D. (2009). Unravelling the skin barrier: a new paradigm for atopic dermatitis and house dust mites. *Veterinary Dermatology*: 20(5-6), 533-540.
- Marsella, R., Santoro, D., Ahrens, K. & Thomas, A.L. (2013a). Investigation of the effect of probiotic exposure on filaggrin expression in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 24, 260-e57.
- Marsella, R., & Saridomichelakis, M.N. (2010). Environmental and oral challenge with storage mites in beagles experimentally sensitized to *Dermatophagoides farinae*. *Veterinary dermatology*: 21(1), 105-111.
- Marsh, K.A., Ruedisueli, F.L., Coe, S.L. & Watson, T.G.D. (2008). Effects of zinc and linoleic acid supplementation on the skin and coat quality of dogs receiving a complete and balanced diet. *Veterinary Dermatology*: 11, 1365-3164.
- Mason, I.S., Mason, K.V., Lloyd, D.H. (1996). A review of the biology of canine skin with respect to the commensals *Staphylococcus intermedius*, *Demodex canis* and *Malassezia pachydermatis*. *Veterinary Dermatology*: 7, 119-32.
- Mates, J., Perez-Gomez, C. & Blanca, M. (2000). Chemical and biological activity of free radical scavengers in allergic disease. *Clinica Chimica Acta*: 296, 1-15.
- McEwan, N.A. (2000). Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine keratinocytes in atopic dermatitis. *Research in Veterinary Science*: 68(3), 279-283.
- McLellan, G.J., Elks, R., Lybaert, P., Watté, C., Moore, D.L. & Bedford, P.G. (2002). Vitamin E deficiency in dogs with retinal pigment epithelial dystrophy. *Veterinary Record*: 151(22), 663-7.
- Merryman-Simpson, A.E., Wood, S.H., Fretwell, N., Jones, P.G., McLaren, W.M., McEwan, N.A., Clements, D.N., Carter, S.D., Ollier, W.E. & Nuttall, T. (2008). Gene (mRNA) expression in canine atopic dermatitis: microarray analysis. *Veterinary Dermatology*: 19, 59-66.
- Michels, G., Ramsey, D., Walsh, Martinon, O, Mahabir, S., Hoevers, J., Walters, R. & Dunham, S.A. (2016b). A blinded, randomized, placebo-controlled, dose determination trial of lokivetmab (ZTS-00103289), a caninized, anti-canine IL-31 monoclonal antibody in client owned dogs with atopic dermatitis *Veterinary Dermatology*: 27(6), 478-e129.
- Michels, G., Walsh, K., Kryda, K., Mahabir, S., Walters, R., Hoevers, J. & Martinon, O. (2016a). A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the safety of lokivetmab

(ZTS-00103289), a caninized anti-canine IL-31 monoclonal antibody in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 27(6), 505-e136.

- Miller, W.H., Griffin, C.E., Campbell, K.L. & Marsella, R. (2013). Hypersensitivity disorders: canine atopic dermatitis. In Scott, W., Miller, W.H. & Griffin, C.E. *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology* (7^a edição). (pp. 365-388). St. Louis, Missouri: Saunders, Elsevier.
- Morris, D.O., Loeffler, A., Davis, M.F., Guardabassi, L. & Wiese, J.S. (2017). Recommendations for approaches to meticillin-resistant staphylococcal infections of small animals: diagnosis, therapeutic considerations and preventative measures. Clinical Consensus Guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. *Veterinary Dermatology*: 28(3), 304-e69.
- Mullin, J., Carter, S., Williams, N., McEwan, N., & Nuttall, T. (2012). Transcription of canine toll-like receptor 2, β -defensin 1 and β -defensin 103 in infected atopic skin, non-infected atopic skin, healthy skin and the CPEK cell line. *Veterinary microbiology*: 162(2-4), 700-6.
- Nachbar, F. & Korting, H. (1995). The role of vitamin E in normal and damaged skin. *Journal of Molecular Medicine*: 73, 7-17.
- Nagata, M., Sedgwick, J.B., Bates, M.E., Kita, H. & Busse, W.W. (1995). Eosinophil adhesion to vascular cell adhesion molecule-1 activates superoxide anion generation. *Journal of Immunology*: 155(4), 2194-202.
- Naito, Y., Yoshikawa, T., Yoshida, N. & Kondo, M. (1998). Role of oxygen radical and lipid peroxidation in indomethacin-induced gastric mucosal injury. *Digestive Diseases and Sciences*: 43(9 Suppl), 30S-34S.
- Nam, E.H., Park, S.H., Jung, J.Y., Han, S.H., Youn, H.Y., Chae, J.S. & Hwang, C.Y. (2012). Evaluation of the effect of a 0.0584 % hydrocortisone aceponate spray on clinical signs and skin barrier function in dogs with atopic dermatitis. *Journal of Veterinary Science*: 13(2), 187-91.
- Nardoni, S., Dini, M., Taccini, F. & Mancianti, F. (2007). Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. *Veterinary Microbiology*: 122, 172-177.
- Negre, A., Bensignor, E. & Guillot, J. (2009). Evidence-based veterinary dermatology: asystematic review of interventions for *Malassezia* dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*: 20(1), 1-12.
- Nishifuji, K. (2015). Contributions of Histopathology and Molecular Biology for the Discovery of Genodermatoses in Animals: Break the Codes! *Veterinary Pathology*: 52(4), 605-6.
- Nishifuji, K. & Yoon, J.S. (2013). The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. *Veterinary Dermatology*: 24(1), 60-72.
- Nissen, D., Pedersen, L.J., Skov, P.S., Vejlsgaard, G.L., Poulsen, L.K., Jarløv, J.O., Karlsmark, T. & Nolte, H. (1997). IgE-binding components of staphylococcal enterotoxins in patients with atopic dermatitis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*: 79(5), 403-8.
- Niwa, Y., Sumi, H., Kawahira, K., Terashima, T., Nakamura, T. & Akamatsu, H. (2003). Protein oxidative damage in the stratum corneum: evidence for a link between

- environmental oxidants and the changing prevalence and nature of atopic dermatitis in Japan. *British Journal of Dermatology*: 149, 248-254.
- Nødtvedt, A., Egenvall, A., Bergvall, K., & Hedhammar, A. (2006). Incidence of and risk factors for atopic dermatitis in a Swedish population of insured dogs. *The Veterinary Record*: 159(8), 241-246.
- Nuttall, T.J., Hill, P.B., Bensignor, E., Willemsse, T & Members of the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis (2006). House dust and forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 17(4), 223-35.
- Nuttall, T.J., Knight, P.A., McAleese, S.M., Lamb, J.R. & Hill, P.B. (2002). Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Allergy*: 32(5), 789-95.
- Nuttall, T., Mueller, R., Bensignor, E., Verde, M., Noli, C., Schmidt, V. & Rème, C. (2009). Efficacy of a 0.0584% hydrocortisone aceponate spray in the management of canine atopic dermatitis: a randomised, double blind, placebo-controlled trial. *Veterinary Dermatology*: 20, 191-8.
- Ogg, G. (2009). Role of T cells in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinical & Experimental Allergy*: 39(3), 310-6.
- Oh, S., Bae, B., Park, C., Noh, J. Park, I., Wu, W. & Lee, K. (2010). Association of stress with symptoms of atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica*: 90(6), 582-8.
- Olivry, T. & Bizikova, P. (2013). A systematic review of randomized controlled trials for prevention or treatment of atopic dermatitis in dogs: 2008-2011 update. *Veterinary Dermatology*: 24, 97-e26.
- Olivry, T. Dean, G.A, Tompkins, M.B, Dow, J.L. & Moore, P.F. (1999). Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Experimental Dermatology*: 8(3), 204-11.
- Olivry, T., DeBoer, D.J., Favrot, C., Jackson, H.A., Mueller, R.S., Nuttall, T., Prélaud, P. & The International Task Force on Canine Atopic Dermatitis (2010a). Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 21, 233-48.
- Olivry T., DeBoer D.J., Favrot, C., Jackson, H.A., Mueller, R.S., Nuttall, T., Prélaud, P. & International Committee on Allergic Diseases of Animals. (2015a). Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Veterinary Research*: 11, 210.
- Olivry, T., Foster, A.P., Mueller, R.S., McEwan, N.A., Chesney, C. & Williams, H.C. (2010b). Interventions for atopic dermatitis in dogs: a systematic review of randomized controlled trials. *Veterinary Dermatology*: 21, 4-22.
- Olivry, T. & Hill, P.B. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IX): the controversy surrounding the route of allergen challenge in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 81(3-4), 219-25.
- Olivry, T., Marsella, R. & Hillier, A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIII): are essential fatty acids effective? *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 81, 347-62.

- Olivry, T., Moore, P.F, Affolter, V.K. & Naydan, D.K. (1996). Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Archives of Dermatological Research*: 288(10), 579-85.
- Olivry, T. & Mueller, R.S. (2003). Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of the pharmacotherapy of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 14,121-46.
- Olivry, T. & Mueller R.S. (2017). Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (3): prevalence of cutaneous adverse food reactions in dogs and cats. *BMC Veterinary Research*: 13, 51.
- Olivry, T., Mueller, R. & Prélud, P. (2015b). Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (1): duration of elimination diets. *BMC Veterinary Research*: 11, 225.
- Olivry, T., Saridomichelakis, M., Nuttall, T., Bensignor, E., Griffin, C.E., Hill, P.B. & International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). (2014). Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*: 25(2), 77-85, e25.
- Omata, N., Tsukahara, H., Ito, S., Ohshima, Y., Yasutomi, M., Yamada, A., Jiang, M., Hiraoka, M., Nambu, M., Deguchi, Y. & Mayumi, M. (2001). Increased oxidative stress in childhood atopic dermatitis. *Life Sciences*: 69, 223-228.
- Ong, P. Y., Patel, M., Ferdman, R. M., Dunaway, T & Church, J. A. (2008). Association of staphylococcal superantigen-specific immunoglobulin e with mild and moderate atopic dermatitis. *J Pediatr*. 153(6):803-6.
- Ornoy, A., Zaken, V., Kohen, R. (1999). Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes-induced anomalies in rat embryos in vitro: reduction in antioxidant enzymes and low-molecular-weight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology*: 60(6), 376-86.
- Owczarek-Lipska, M., Lauber, B., Molitor, V., Meury, S., Kierczak, M., Tengvall, K., Webster, M.T., Jagannathan, V., Schlotter, Y., Willemsse, T., Hendricks, A., Bergvall, K., Hedhammar, A., Andersson, G., Lindblad-Toh, K., Favrot, C., Roosje, P., Marti, E. & Leed, T. (2012). Two loci on chromosome 5 are associated with serum IgE levels in Labrador retrievers. *PLoS ONE*: 7, e39176.
- Park, S.H., Kim, S.A., Shin, N.S. & Hwang, C.Y. (2016). Elevated cortisol content in dog hair with atopic dermatitis. *Japanese Journal of Veterinary Research*: 64(2), 123-9.
- Parreira, D. (2013). Validação de um método de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC) para doseamento da vitamina D em géneros alimentícios. Aplicação do método em diferentes matrizes alimentares. Tese de Mestrado em Engenharia Química e Biológica. Lisboa: Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.
- Pentland, A.P. (1994). Active oxygen mechanisms of UV inflammation. *Advances in Experimental Medicine and Biology*: 366, 87-97.
- Picco, F., Zini, E., Nett, C., Naegeli, C., Bigler, B., Rüfenacht, S., Roosje, P., Gutzwiller, M.E., Wilhelm, S., Pfister, J., Meng, E. & Favrot, C. (2008). A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Veterinary Dermatology*: 19, 150-155.

- Piekutowska, A., Pin, D., Rème, C.A., Gatto, H. & Haftek, M. (2008). Effects of a topically applied preparation of epidermal lipids on the stratum corneum barrier of atopic dogs. *Journal of Comparative Pathology*: 138, 197-203.
- Plant, J.D. (2007). Repeatability and reproducibility of numerical rating scales and visual analogue scales for canine pruritus severity scoring. *Veterinary Dermatology*: 18(5), 294-300.
- Plant, J.D., Neradelik, M.B., Polissar, N.L., Fadok, V.A. & Scott, B.A (2014). Agreement between allergen-specific IgE assays and ensuing immunotherapy recommendations from four commercial laboratories in the USA. *Veterinary Dermatology*: 25, 15-e6.
- Plevnik, A., Kobal, S., Domanjko-Petric, A. & Kotnik, T. (2009). The efficacy of antihistamine fexofenadine versus methylprednisolone in the treatment of atopic dermatitis in dogs. *Slovenian Veterinary Research*: 46, 5-11.
- Podda, M., Traber, M.G., Weber, C., Yan, L.J. & Packer, L. (1998). UV-irradiation depletes antioxidants and causes oxidative damage in a model of human skin. *Free Radical Biology & Medicine*: 24(1), 55-65.
- Polla, B.S., Ezekowitz, R.A. & Leung, D.Y. (1992). Monocytes from patients with atopic dermatitis are primed for superoxide production. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*: 89(2), 545-51.
- Popa, I., Pin, D., Remoué, N., Osta, B., Callejon, S., Videmont, E. Gatto, H., Portoukalian, J. & Haftek, M. (2011). Analysis of epidermal lipids in normal and atopic dogs, before and after administration of an oral omega-6/omega-3 fatty acid feed supplement. A pilot study. *Veterinary Research Communications*: 35, 501-9.
- Popa, I., Remoue, N., Osta, B., Pin, D., Gatto, H., Haftek, M. & Portoukalian, J. (2012). The lipid alterations in the stratum corneum of dogs with atopic dermatitis are alleviated by topical application of a sphingolipid-containing emulsion. *Clinical and Experimental Dermatology*: 37, 665-71.
- Postlethwaite, A.E., Holness, M.A., Katai, H. & Raghov, R. (1992). Human fibroblasts synthesize elevated levels of extracellular matrix proteins in response to interleukin 4. *Journal of Clinical Investigation*: 90(4), 1479-85.
- Raffan, E., Lawrence, H., Henderson, T., Nelson, S., Isherwood, D., McArdie, C. & Nuttall, T. (2005). Prevalence of the group 1 Dermatophagoides allergens Der p 1 and Der f 1 in homes with no dogs, healthy dogs and Dermatophagoides-sensitized atopic dogs in Liverpool. *Veterinary Dermatology*: 16, 253-60.
- Raila, J., Rohn, S., Schweigert, F. & Abraham, G. (2011). Increased antioxidant capacity in the plasma of dogs after a single oral dosage of tocotrienols. *British Journal of Nutrition*: 106 Suppl 1:S116-9.
- Rees, J.L. (2004). Measurement of itch using actigraphy in pediatric and adult populations. *Journal of the American Academy of Dermatology*: 51, 893-898.
- Reimann, M.J., Häggström, J., Møller, J.E., Lykkesfeldt, J., Falk, T. & Olsen, L.H. (2017). Markers of Oxidative Stress in Dogs with Myxomatous Mitral Valve Disease are Influenced by Sex, Neuter Status, and Serum Cholesterol Concentration. *Journal of Veterinary Internal Medicine*: 31(2), 295-302.

- Reiter, L.V., Torres, S.M. & Wertz, P.W. (2009). Characterization and quantification of ceramides in the nonlesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared with controls. *Veterinary Dermatology*: 20(4), 260-6.
- Renert-Yuval, Y. & Guttman-Yassky, E. (2017). Systemic therapies in atopic dermatitis: The pipeline. *Clinics in Dermatology*: 35, 387-397.
- Richter, C. (1995). Oxidative damage to mitochondrial DNA and its relationship to ageing. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*: 27(7), 647-53.
- Richtsmeier, A.J., Spooner, M. & Meyer, O.O. (1947). Report of failure of alfa-tocopherol to prevent diethylstilbestrol-induced purpura in dogs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*: 65(2), 298-301.
- Rook, G.A.W., & Brunet, L.R. (2005). Old friends for breakfast. *Clinical & Experimental Allergy*: 35(7), 841-842.
- Roque, J.B., O'Leary, C.A., Duffy, D.L., Kyaw-Tanner, M., Latter, M., Mason, K., Vogelnest, L. & Shipstone, M. (2011b). IgE responsiveness to *Dermatophagoides farinae* in West Highland white terrier dogs is associated with region on CFA35. *Journal of Heredity*: 102(Suppl 1), S74-S80.
- Roque, J.B., O'Leary, C.A., Kyaw-Tanner, M., Gharanhkhani, G., Vogelnest, L. Mason, K., Shipstone, M. & Latter, M. (2012). Atopic dermatitis in West Highland white terriers is associated with a 1.3-Mb region on CFA 17. *Immunogenetics*: 64, 209–217.
- Roque, J.B., O'Leary, C.A., Kyaw-Tanner, M., Duffy, D.L. & Slipstone, M. (2011). Real-time PCR quantification of the canine filaggrin orthologue in the skin of atopic and non-atopic dogs: a pilot study. *BMC Research Notes*: 21, 4:554.
- Roudebush, P., Bloom, P.B. & Jewell, D.J. (1997). Consumption of essential fatty acids in selected commercial dog foods compared to dietary supplementation. *13th Proceedings of AAVD/ACVD Meetings*. Acedido em Jun 6, 2018, em www.clinicaltrialssequipment.com/documents/consumption.doc
- Rybníček, J., Lau-Gillard, P.J., Harvey, R. & Hill, P.B. (2009). Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Veterinary Dermatology*: 20(2), 115-22.
- Saevik, B.K., Bergvall, K., Holm, B.R., Saijonmaa-Koulumies, L.E., Hedhammar, A., Larsen, S. & Kristensen, F.A. (2004). A randomized, controlled study to evaluate the steroid sparing effect of essential fatty acid supplementation in the treatment of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 15, 137-45.
- Salzmann, C., Olivry, T., Nielsen, D., Paps, J., Harris, T. & Olby, N. (2011). Genome-wide linkage study of atopic dermatitis in West Highland White Terriers. *BMC Genetics*: 12, 37-42.
- Santoro, D., Marsella, R., Ahrens, K., Graves, T.K & Bunick, D. (2013). Altered mRNA and protein expression of filaggrin in the skin of a canine animal model for atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 24(3), 329-36.
- Saridomichelakis, M.N., Koutinas, A.F., Gioulekas, D., & Leontidis, L. (1999). Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 69(1), 61–73.

- Saridomichelakis, M.N., Marsella, R., Lee, K.W., Esch, R.E., Farmaki, R., & Koutinas, A.F. (2008). Assessment of cross-reactivity among five species of house dust and storage mites. *Veterinary Dermatology*: 19(2), 67-76.
- Schallreuter, K.U. & Wood, J.M. (1989). Free radical reduction in the human epidermis. *Free Radical Biology & Medicine*: 6(5), 519-32.
- Scheynius, A., Johansson, C., Buentke, E., Zargari, A. & Linder, M.T. (2002). Atopic eczema/dermatitis syndrome and *Malassezia*. *International Archives of Allergy and Immunology*: 127, 161-9.
- Schmölz, L., Birringer, M., Lorkowski, S. & Wallet, M. (2016). Complexity of vitamin E metabolism. *World Journal of Biological Chemistry*: 7(1), 14-43.
- Schnabl, B., Bettenay, S.V., Dow, K. & Mueller, R.S. (2006). Results of allergen-specific immunotherapy in 117 dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Record*: 158, 81-5.
- Schneider, C. (2005) Chemistry and biology of vitamin E. *Molecular Nutrition & Food Research*: 49, 7-30.
- Scott, W., Miller, W.H. & Griffin, C.E. (2001). Skin immune system and allergic skin disease. In Scott, W., Miller, W.H. & Griffin, C.E. *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology*, (6ª edição). (pp.543-666). Philadelphia: W. B. Saunders.
- Shadyro, O.I., Yurkova, I.L. & Kisel, M.A. (2002). Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane. *International Journal of Radiation Biology*: 78(3), 211-7.
- Shaw, S.C., Wood, J.L., Freeman, J., Littlewood, J.D. & Hannant, D. (2004). Estimation of heritability of atopic dermatitis in Labrador and Golden Retrievers. *American Journal of Veterinary Research*: 65(7), 1014-20.
- Shimada, K., Yoon, J.S., Yoshihara, T., Iwasaki, T. & Nishifuji, K. (2009). Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 20(5-6), 541-6.
- Simic, M.G. (1992). Urinary biomarkers and the rate of DNA damage in carcinogenesis and anticarcinogenesis. *Mutation Research*: 267(2), 277-90.
- Simou, C., Thoday, K.L., Forsythe, P.J., & Hill, P.B. (2005). Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. *Veterinary Dermatology*: 16(6), 385-391.
- Sivaranjani, N., Rao, S.V. & Rajeev, G. (2013). Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*: 7(12), 2683-5.
- Sivaranjani, N., Venkata Rao, S. & Rajeev, G. (2013). Role of reactive oxygen species and antioxidants in atopic dermatitis. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*: 7, 2683-5.
- Sousa, C.A. & Marsella, R. (2001) The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetic factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 81, 153-7.
- Stahl, J., Paps, J., Bäumer, W., Olivry, T. (2012). *Dermatophagoides farinae* house dust mite allergen challenges reduce stratum corneum ceramides in an experimental dog model of acute atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 23(6), 497-e97.

- Steffan, J., Alexander, D., Brovedani, F. & Fisch, R.D. (2003). Comparison of cyclosporine A with methylprednisolone for treatment of canine atopic dermatitis: a parallel, blinded, randomized controlled trial. *Veterinary Dermatology*: 14, 11-22.
- Steffan, J., Favrot, C. & Mueller, R. (2006). A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of cyclosporin for the treatment of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*: 17, 3-16.
- Strachan, D.P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*: 299(6710), 1259-60.
- Suárez, A., Feramisco, J., Koo, J. & Steinhoff, M. (2013). Psychoneuroimmunology of Psychological Stress and Atopic Dermatitis: Pathophysiologic and Therapeutic Updates. *Acta Dermato-Venereologica*: 92(1), 7-15.
- Sundburg, C.R., Belanger, J.M., Bannasch, D.L., Famula, T.R. & Oberbauer, A.M. (2016). Gonadectomy effects on the risk of immune disorders in the dog: a retrospective study. *BMC Veterinary Research*: 12, 278.
- Swinnen, C. & Vroom, M. (2004): The clinical effect of environmental control of house dust mites in 60 house dust mite-sensitive dogs. *Veterinary Dermatology*: 15, 31-6.
- Tarpataki, N., Pápa, K., Reiczigel, J., Vajdovich, P. & Vörösi, K. (2006). Prevalence and features of canine atopic dermatitis in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*: 54(3), 353-366.
- Taszkun, I. (2010). 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*: 13, 681-8.
- Tengvall, K., Kierczak, M., Bervall, K., Olsson, M., Frankowiack, M., Farias, F.H., Pielberg, G., Carlborg, Ö., Leeb, T., Andersson, G., Hammarström, L., Hedhammar, Å. & Lindblad-Toh, K. (2013). Genome-wide analysis in German shepherd dogs reveals association of a locus on CFA 27 with atopic dermatitis. *PLoS Genetics*: 9(5), e1003475.
- Thiele, J. (2001). Oxidative targets in stratum corneum. A new basis for antioxidative strategies. *Skin Pharmacology and Applicative Skin Physiology*: 14, 87-91.
- Thiele, J., Schroeter, C., Hsieh, S., Podda, M. & Packer, L. (2001). The antioxidant network of the stratum corneum. *Current Problems in Dermatology*: 29, 26-42.
- Thiele, J., Weber, S. & Packer, L. (1999). Sebaceous gland secretion is a major physiologic route of vitamin E delivery to skin. *Journal of Investigative Dermatology*: 113, 1006-10.
- Torrance, G.W., Feeny, D., Furlong, W. (2001). Visual analog scales: do they have a role in the measurement of preferences for health states? *Medical Decision Making*: 21(4), 329-34.
- Traber, M.G. & Atkinson, J. (2007). Vitamin E, antioxidante and nothing more. *Free Radical Biology & Medicine*: 43(1), 4-15.
- Tran, J.L., Horvath, C., Krammer, S., Höller, U. & Zentek, J. (2007). Blood vitamin concentrations in privately owned dogs fed non-standardized commercial diets and after intake of diets with specified vitamin concentrations. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*: 91(1-2), 40-7.

- Tsourelis-Nikita, E., Hercogova, J., Lotti, T. & Menchini, G. (2002). Evaluation of dietary intake of vitamin E in the treatment of atopic dermatitis: a study of the clinical course and evaluation of the immunoglobulin E serum levels. *International Journal of Dermatology*: 41(3), 146-50.
- Tsuboi, H., Kouda, K., Takeuchi, H., Takigawa, M., Masamoto, Y., Takeuchi, M. & Ochi, H. (1998). 8-hydroxydeoxyguanosine in urine as an index of oxidative damage to DNA in the evaluation of atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology*: 138, 1033-1035.
- Tsukahara, H., Shibata, R., Ohshima, Y., Todokori, Y., Sato, S., Ohta, N., Nikaoka, M., Yoshida, A., Nishima, S. & Mayumi, M. (2003). Oxidative stress and altered antioxidant defenses in children with acute exacerbation of atopic dermatitis. *Life Sciences*: 72, 2509-2516.
- Valko, M., Liebfriz, D., Moncol, J., Cronin, M., Mazur, M. & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*: 39, 44-48.
- Wedekind, K.J., Zicker, S., Lowry, S. & Paetau-Robinson, I. (2002). Antioxidant status of adult beagles is affected by dietary antioxidant intake. *Journal of Nutrition*: 132(6 Suppl 2), 1658S-60S.
- White, A., Santoro, D., Ahrens, K. & Marsella, R. (2018). Single blinded, randomized, placebo-controlled study on the effects of ciclosporin on cutaneous barrier function and immunological response in atopic beagles. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 197, 93-101.
- Widmer, G., Ferrer, L., Favrot, C., Paps, J., Huynh, K. & Olivry, T. (2018). Glucocorticosteroids and ciclosporin do not significantly impact canine cutaneous microbiota. *BMC Veterinary Research*: 14, 51.
- Wilhem, S., Kovalik, M. & Favrot, C. (2011). Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 22(2), 143-9.
- Wilson, L.S., Rosenkrantz, W.S. & Roycroft, L.M. (2011). Zinc-carnosine and vitamin E supplementation does not ameliorate gastrointestinal side effects associated with ciclosporin therapy of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*: 22(1), 53-60.
- Winter, J., Barber, L., Freeman, L., Griessmayr, P., Milbury, P. & Blumberg, J. (2009). Antioxidant status and biomarkers of oxidative stress in dogs with lymphoma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*: 23(2), 311-6.
- Wolf, R., Wolf, D. & Ruocco, V. (1998). Vitamin E: the radical protector. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*: 10, 103-117.
- Wood, S.H., Clements, D.N., Ollier, W.E., Nuttall, T., McEwan, N. A. & Carter, S.D. (2009a). Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores. *Journal of Dermatological Science*: 55(1), 27-33.
- Wood, S.H., Ke, X., Nuttall, T., McEwan, N., Ollier, W.E. & Carter, S.D. (2009b). Genome-wide association analysis of canine atopic dermatitis and identification of disease related SNPs. *Immunogenetics*: 61, 765-772.
- Wood, S.H., Ollier, W.E., Nuttall, T., McEwan, N.A. & Carter, S.D. (2010). Despite identifying some shared gene associations with human atopic dermatitis the use of multiple dog breeds from various locations limits detection of gene associations in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*: 138(3), 193-7.

- Yasukawa, K., Saito, S., Kubo, T., Shibasaki, Y., Yamaoka, K., Hachimura, H., Kuyama, T., Amimoto, A., Kumata, T., Kitahara, Y., Takenaka, M., Matsumura, H., Uno, T., Uchino, T., Takehara, K., Nishida, K., Kadoya, M., Sato, M., Kato, K., Matsumoto, K., Saito, S., Shimoda, T. (2010). Low-dose recombinant canine interferon-gamma for treatment of canine atopic dermatitis: an open randomized comparative trial of two doses. *Veterinary Dermatology*: 21, 41-8.
- Zur, G., Ihrke, P.J., White, S.D., & Kass, P.H. (2002a). Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Veterinary Dermatology*: 13(2), 89-102.
- Zur, G., White, S.D, Ihrke, P.J., Kass, P.H. & Toebe, N. (2002b). Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 169 cases examined at the University of California, Davis, 1992–1998. Part II. Response to hyposensitization. *Veterinary Dermatology*: 13, 103-11.
- Zwickl, L., Joekel, D., Fischer, N., Rostaher, A., Thamsborg, K., Deplazes, P. & Favrot, C. (2018). Total and *Toxocara canis* larval excretory/secretory antigen- and allergen-specific IgE in atopic and non-atopic dogs. *Veterinary Dermatology*: 29(3), 222-e80.

ANEXO 1 – Tabela de classificação do CADESI-04

CADESI-04 (Olivry et al., 2014)

CADESI-04 (ICADA)		Eritema	Liquenificação	Escoriações e/ou Alopecia	TOTAL
Região perilabial (esquerda e direita)		1			
Pavilhão Auricular	Esq.	2			
	Dto.	3			
Axilas	Esq.	4			
	Dta.	5			
Extremidades podais dianteiras (faces dorsal e palmar)	Esq.	6			
	Dta.	7			
Extremidades podais traseiras (faces dorsal e plantar)	Esq.	8			
	Dta.	9			
Flexor ulnar do carpo (dobras do cotovelo)	Esq.	10			
	Dto.	11			
Face palmar metacárpica (desde a almofada cárpica à metacárpica)	Esq.	12			
	Dta.	13			
Flancos	Esq.	14			
	Dto.	15			
Região inguinal (virilhas)	Esq.	16			
	Dta.	17			
Abdômen		18			
Períneo (desde a vulva/escroto até ao ânus)		19			
Face ventral da cauda (proximal)		20			
Classificar cada região e lesão com: ausente - 0; ligeiro - 1; moderado - 2; grave - 3.		CLASSIFICAÇÃO TOTAL (20 x 3 x 3 = 180)			

Dta. – Direita; Dto. – Direito; Esq. – Esquerdo/a.

ANEXO 2 – Materiais e método para determinação do teor de α -tocoferol (16 amostras)

Materiais

- Hidróxido de potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Água miliQ;
- Etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Ácido ascórbico (VWR, Alfragide, Portugal);
- Azoto (Linde, Lisboa, Portugal);
- N-hexano para HPLC (VWR Alfragide, Portugal);
- BHT (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Sulfato de sódio anidro (Merck, Darmstadt, Alemanha);
- Caneta de acetato;
- 32 Tubos de ensaio com tampa de 16 ml;
- 16 Vials âmbar para HPLC;
- Agitador magnético (Thermolyne Nuova II, Sybron, Estados Unidos da América);
- Pinça;
- Íman;
- Gobelé de 150 ml;
- Balão de Erlenmeyer de 100 ml;
- Balança (E42, Gibertini, Milão, Itália);
- Gobelé de 50 ml;
- Espátula;
- Vórtex (VV3, VWR, Alfragide, Portugal);
- Banho-maria (1083, GFL, Burgwedel, Alemanha);
- Suporte para tubos;
- Suporte para vials;
- Centrífuga (Labofuge 400, Heraeus Instruments, Hanau, Alemanha);
- Pipetas de Pasteur;
- Micropipetas.

Método

Saponificação

1. Identificar os tubos de ensaio e os vials com o número da amostra.
2. Preparar a solução de saponificação (extemporânea).
 - a. Dissolver 11 g de hidróxido de potássio (Merck, Darmstadt, Alemanha) em 45 ml de água miliQ, com recurso ao agitador (Thermolyne Nuova II, Sybron,

Estados Unidos da América). De seguida, diluir a solução, através da adição de 55 ml de etanol absoluto (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3. Adicionar 0,20 g de ácido ascórbico (VWR, Alfragide, Portugal) a 16 tubos de ensaio de 16 ml.
4. Adicionar 200 μ L, 150 μ L ou 100 μ L de amostra (consoante disponibilidade) para os tubos de ensaio onde foi colocado o ácido ascórbico.
5. Adicionar a cada tubo 5,5 ml de solução de saponificação.
6. Agitar os tubos de imediato com recurso ao vórtex (VV3, VWR, Alfragide, Portugal).
7. Substituir o ar dos tubos por azoto (Linde, Lisboa, Portugal) e tapá-los bem.
8. Agitar os tubos no vórtex (VV3, VWR, Alfragide, Portugal).
9. Aquecer em banho-maria (1083, GFL, Burgwedel, Alemanha) 80°C, durante 15 minutos, a 200 rotações por minuto.

Extração

1. Arrefecer os tubos em água fria durante 1 minuto.
2. Aos tubos onde foram utilizados 200 μ L de amostra, adicionar 0,6 ml de água miliQ. Aos tubos onde foram utilizados 150 μ L de amostra, adicionar 0,45 ml de água miliQ. Aos tubos onde foram utilizados 100 μ L de amostra, adicionar 0,3 ml de água miliQ.
3. De seguida, aos tubos onde foram utilizados 200 μ L de amostra, adicionar 1,2 ml de n-hexano (VWR Alfragide, Portugal). Aos tubos onde foram utilizados 150 μ L de amostra, adicionar 0,9 ml de n-hexano (VWR Alfragide, Portugal). Aos tubos onde foram utilizados 100 μ L de amostra, adicionar 0,6 ml de n-hexano (VWR Alfragide, Portugal).
4. Agitar vigorosamente no vórtex (VV3, VWR, Alfragide, Portugal) durante dois minutos.
5. Centrifugar (Labofuge 400, Heraeus Instruments, Hanau, Alemanha) a 2500 rotações por minuto, durante 5 minutos.
6. Adicionar aos outros 16 tubos 0,25 g de sulfato de sódio (Merck, Darmstadt, Alemanha).
7. Aspirar as fases do n-hexano (superiores) para os tubos com sulfato de sódio.
8. Agitar no vórtex (VV3, VWR, Alfragide, Portugal) durante 10 segundos.
9. Centrifugar (Labofuge 400, Heraeus Instruments, Hanau, Alemanha) a 2500 rotações por minuto, durante 2 minutos.
10. Colocar uma alíquota das fases do n-hexano (superiores) em frascos âmbar de 1,5 ml com recurso à utilização de pipetas de Pasteur.