



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DA INTERLEUCINA 31 E 17 EM CÃES COM
DERMATITE ATÓPICA SOB TRATAMENTO COM OCLACITINIB OU LOKIVETMAB**

Patrícia Alexandra Mota Lopes

Coimbra, julho 2023



ESCOLA UNIVERSITÁRIA VASCO DA GAMA

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

**ESTUDO DAS CONCENTRAÇÕES SÉRICAS DA INTERLEUCINA 31 E 17 EM CÃES COM
DERMATITE ATÓPICA SOB TRATAMENTO COM OCLACITINIB OU LOKIVETMAB**

Coimbra, julho 2023

Patrícia Alexandra Mota Lopes

Aluna do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Constituição do Júri

Presidente do Júri: Professora Doutora

Maria Eduarda Moreno da Silveira

Arguente: Professora Doutora Carla Sofia

Alves Soares

Orientador: Professora Doutora Anabela

Maduro de Almeida Francisco

Orientador Interno

Professora Doutora Anabela Maduro
de Almeida Francisco

Coorientador Interno

Dr.^a Andreia Freire

Orientador Externo

Dr.^a Filipa Fernandes

Hospital Veterinário de Coimbra

Agradecimentos

Em primeiro lugar, quero agradecer à Escola Universitária Vasco da Gama, à minha orientadora Professora Doutora Anabela Almeida e à minha coorientadora Dr.^a Andreia Freire, por todo o ensinamento, apoio e dedicação para a elaboração desta dissertação.

Ao Hospital Veterinário de Coimbra por me terem recebido tão bem nestes 6 meses de estágio, a todo o corpo clínico pela partilha de conhecimentos, toda a simpatia e confiança que tornou uma excelente experiência vivenciada.

À minha orientadora externa, Dr.^a Filipa Fernandes, por todo o incentivo, confiança e carinho demonstrado ao longo deste período.

À Professora Doutora Ana Catarina pela sua disponibilidade e auxílio na realização deste estudo.

À Dr.^a Diana Ferreira pelo apoio demonstrado ao longo deste período.

Aos meus pais, Célia e Jorge, por acreditarem em mim e no meu sonho e por todo o apoio ao longo destes anos, sem eles nunca seria possível.

À minha irmã, Rita, por toda a ajuda desde sempre, e à minha sobrinha, Laura, por todo o amor e orgulho que me proporciona.

Ao João, o meu namorado e melhor amigo, que esteve sempre comigo ao longos destes anos desafiantes, com uma palavra de incentivo, por ser o meu grande companheiro de todas as horas.

À Maria José e Iva por todas as palavras bonitas, incentivo e motivação.

À Catarina, Beatriz e Beatriz Maria por toda a amizade maravilhosa ao longo destes anos.

Aos meus cães, Snoki e Mike pela companhia nas infinitas horas no escritório. Ao Snoki, que foi a inspiração para a escolha do tema desta dissertação.

Às minha colegas de curso e à minha afilhada de praxe, por toda esta caminhada com altos e baixos, que fizemos juntas.

Índice	
Índice de figuras	vi
Índice de tabelas	vii
Lista de abreviaturas	viii
Resumo	2
Abstract	3
1. Introdução	4
2. Material e métodos	8
2.1. Animais	8
2.2. Desenho do estudo	8
2.3. Determinação analítica	10
2.4. Análise estatística	10
3. Resultados	11
3.1. Caracterização da amostra	11
3.2. Caracterização clínica	12
3.3. Determinação das concentrações séricas de IL-17 e IL-31	16
3.4. Determinação das concentrações séricas de IL-17 e IL-31 nos animais saudáveis	19
3.5. Correlação entre variáveis clínicas e os valores das concentrações séricas das interleucinas	21
4. Discussão	22
5. Conclusões e Considerações finais	25
Agradecimentos	26
Referências bibliográficas	27
ANEXOS	32
Anexo 1 – Consentimento informado assinado pelos tutores	32
Anexo 2 – Critérios de Favrot (mínimo 5 critérios de inclusão)	34
Anexo 3 – Ficha de identificação de pacientes	35
Anexo 4 – Comparação estatística entre as variáveis e os dois grupos de tratamento.	41
Anexo 5 – Registo fotográfico representativo das lesões em T0, T1 e T2 respetivamente.	43
Anexo 6 – Posologia utilizada na terapêutica com lokivetmab (Cytoint®).	44

Índice de figuras

Figura 1 – A: Resposta imunitária após contacto com alergénios, pela via Th2 originando libertação de Imunoglobulina E (IgE), mastócitos, macrófagos, basófilos, eosinófilos e IL-31, que se liga diretamente a recetores específicos neuronais e mediadores de prurido, induzindo-o; B: Resposta imunitária após contacto com alergénios, pela via Th17 originando a libertação de IL-17, que promove o recrutamento de macrófagos, proliferação dos queratinócitos e estimulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando um aumento da inflamação mediado por neutrófilos.	5
Figura 2 – A: Via de indução do prurido ocorre através da ligação da IL-31 ao seu recetor, a enzima tirosina quinase (JAK). O oclacitinib atua após esta ligação, inibindo a transdução de sinal e bloqueando as diversas vias de sinalização. B: O lokivetmab atua antes da ligação da IL-31 ao seu recetor (JAK), ligando-se seletivamente a um epítopo desta interleucina, neutralizando-a e impedindo a sua ligação e consequentemente as vias de sinalização seguintes.	6
Figura 3 – Desenho do estudo: 1ª consulta- apresentação do animal em consulta de dermatologia; 2ª consulta: obtenção do diagnóstico de DAC; 3ª consulta (T0): início da terapêutica, avaliação do animal em relação ao prurido, lesões e 1ª colheita sanguínea; 4ª consulta (T1): 2ª avaliação e 2ª colheita sanguínea; 5ª consulta (T2): 3ª avaliação e 3ª colheita sanguínea.	9
Figura 4 – Variação da escala de prurido em função do tempo e da terapêutica utilizada (n=12 para cada tempo).	14
Figura 5 – Variação da escala de lesões em função do tempo e da terapêutica utilizada (n=12 para cada tempo).	15
Figura 6 – Variação do peso em função do tempo e da terapêutica utilizada (n=12 para cada tempo).	16
Figura 7 – Variação das concentrações séricas de IL-17 em função do tempo e da terapêutica utilizada (n=12 em T0; n=11 em T1 e T2).	18
Figura 8 – Variação das concentrações séricas de IL-31 em função do tempo e da terapêutica utilizada (n=12 em T0; n=10 em T1 e n=9 em T2).	19
Figura 9 – Variação da concentração sérica de IL-17 nos animais saudáveis comparando com os animais com patologia antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib (T0).	20
Figura 10 – Variação da concentração sérica de IL-31 nos animais saudáveis comparando com os animais com patologia antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib (T0).	21

Índice de tabelas

Tabela 1 – Comparação entre as vias de administração, a posologia, as propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e imunológicas, o início da eficácia e os efeitos adversos, do oclacitinib e do lokivetmab.....	7
Tabela 2 – Caracterização dos animais incluídos no estudo.	12
Tabela 3 – Caracterização dos animais saudáveis.	12
Tabela 4 – Resultados obtidos através da aplicação da escala de lesões e de prurido de cada animal, a média e medidas de dispersão.	13
Tabela 5 – Resultados obtidos através da determinação das concentrações séricas (pg/ml) de IL-17 e IL-31 obtidas nos três tempos de avaliação, a média e medidas de dispersão.	17
Tabela 6 – Resultados obtidos através da determinação das concentrações séricas (pg/ml) de IL-17 e IL-31 obtidas nos animais saudáveis, a média e medidas de dispersão.	20
Tabela 7 – Estudos publicados em que foram determinadas as concentrações de IL-17 e IL-31.....	23

Lista de abreviaturas

BID – duas vezes por dia, do latim *bis in die*

CADLI – Índice de lesões da Dermatite Atópica Canina, do inglês *Canine Atopic Dermatitis Lesion Index*

CAMV – Centro de Atendimento Médico-Veterinário

CP – Com patologia

DAC – Dermatite Atópica Canina

DP – Desvio padrão

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

EUVG – Escola Universitária Vasco da Gama

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

HVUC – Hospital Veterinário Universitário de Coimbra

HVC – Hospital Veterinário de Coimbra

HVP – Hospital Veterinário do Porto

IgE – Imunoglobulina E

IL-17 – Interleucina 17

IL-31 – Interleucina 31

JAKs – janus quinase, do inglês *Janus Kinases*

kg – kilograma

mAb – anticorpo monoclonal, do inglês *monoclonal antibody*

mg – miligrama

ml – mililitro

nm – nanómetro

OVH – ovariectomia

pg – picograma

pVAS – Escala visual analógica do prurido, do inglês *Pruritus Visual Analog Scale*

r – rho de Spearman, coeficiente de correlação

rpm – rotações por minuto

SID – uma vez por dia, do latim *semel in die*

SP – Sem patologia

SPSS – do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*

Th2 – T *helper* 2

T0 – tempo antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib

T1 – 30 dias após iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib

T2 – 60 dias após iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib

Estudo das concentrações séricas da interleucina 31 e 17 em cães com dermatite atópica sob tratamento com oclacitinib ou lokivetmab

Patrícia Lopes ^a, Andreia Freire ^{a,b}, Ana Figueira ^{a,b}, Filipa Fernandes ^c, Diana Ferreira ^d, Anabela Almeida ^{a,e}

^a CIVG- Centro de Investigação Vasco da Gama/ EUVG- Escola Universitária Vasco da Gama, Av. José R. Sousa Fernandes 197, Campus Universitário- Bloco B, Lordemão, 3020-210, Coimbra, Portugal (patriciaamlopes6@gmail.com; freire_andreia@hotmail.com; ana.figueira@euv.g.pt; almeidaanabela@gmail.com)

^b Hospital Veterinário Universitário de Coimbra (HVUC), Av. José R. Sousa Fernandes 197, Lordemão, 3020-210 Coimbra, Portugal

^c Hospital Veterinário de Coimbra (HVC), Quinta da Portela - Mondego Residence, Rua O Conimbricense, Lote 21, loja 32/34, 3030-509 Coimbra, Portugal (filipabrizidofernandes@gmail.com)

^d Hospital Veterinário do Porto (HVP), Travessa Silva Porto 174, 4250-475 Porto, Portugal (diana.ferreira@onevetgroup.pt)

^e CIBIT/ICNAS- Instituto de Imagem Biomédica e Investigação Translacional de Coimbra, Universidade de Coimbra, Portugal

Resumo

A dermatite atópica canina (DAC) é uma doença multifatorial de elevada incidência, com patogenia complexa. É definida como um processo inflamatório, pruriginoso que causa lesão, inflamação e alteração da barreira cutânea, promovendo a penetração dos alérgenos ambientais.

O presente estudo teve como objetivos, quantificar e analisar as concentrações séricas da interleucina 17 (IL-17) e 31 (IL-31) em animais diagnosticados com DAC sob terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib, as suas flutuações ao longo do tratamento, a análise das diferenças entre as duas terapêuticas utilizadas e a comparação com o grupo de controlo. Pretendeu-se também, avaliar o prurido e a gravidade de lesões durante a terapêutica, através dos dados recolhidos.

As colheitas sanguíneas, a determinação do grau de prurido (pVAS) e das lesões cutâneas (CADLI) foram realizadas aos doze animais em três momentos distintos (antes de iniciar a terapêutica (T0), 30 dias após o início da terapêutica (T1) e após 60 dias do início da mesma (T2). O grupo de controlo foi constituído por cinco animais saudáveis.

A determinação das concentrações séricas de IL-17 e IL-31 foi realizada através de imunoensaio enzimático (MyBiosource®, Estados Unidos da América), seguindo as indicações do fabricante.

Após análise dos resultados, os valores da concentração IL-17 apresentaram diferenças estatísticas entre T0 e T1 ($p=0,221$), entre T0 e T2 ($p=0,011$). Os valores de IL-31 demonstraram-se estatisticamente diferentes entre o T0 e T1 ($p=0,010$), entre T0 e T2 ($p=0,184$) e entre T1 e T2 ($p=0,855$) não existiram diferenças significativas, determinando uma diminuição inicial da concentração e posteriormente a manutenção ou ligeiro aumento. Comparando a variação das concentrações de IL-17, IL-31 nos dois grupos de tratamento nos diferentes tempos, não houve alterações entre o grupo que utilizou o oclacitinib e o grupo que utilizou o lokivetmab ($p>0,05$) como tratamento. Observou-se uma correlação positiva entre o prurido (T2) e as lesões (T2) e entre a concentração sérica de IL-31 (T0) e o prurido (T0). Verificou-se também uma concentração sérica de IL-17 mais elevada nos animais com DAC, comparando com os animais saudáveis. A variação das lesões e do prurido diminuíram ao longo do tempo, o que demonstra o sucesso da terapêutica utilizada.

Os resultados obtidos mostraram um aumento das concentrações séricas de IL-17 em cães com DAC e a sua diminuição ao longo do período de tratamento em estudo. Considerando estes resultados e o envolvimento da IL-17 na inflamação cutânea na DAC, sugere-se o possível desenvolvimento de novas opções terapêuticas baseadas neste potencial alvo terapêutico.

Palavras-chave: Dermatite atópica canina, interleucinas, lokivetmab, oclacitinib, ELISA

Abstract

Canine atopic dermatitis (CAD) is a multifactorial disease with a high incidence and complex pathogenesis. It is defined as an inflammatory, pruritic process that causes injury, inflammation and alteration of the skin barrier, promoting the penetration of environmental allergens.

The present study aimed to quantify and analyze serum concentrations of interleukin 17 (IL-17) and 31 (IL-31) in animals diagnosed with CAD under therapy with lokivetmab or oclacitinib, their fluctuations throughout treatment, the analysis of differences between the two therapies used and the comparison with the control group. We also aimed to assess pruritus and severity of lesions during therapy using the data collected.

Blood samples, pruritus (pVAS) and skin lesions (CADLI) were collected from twelve animals at three different times (before starting therapy (T0), 30 days after starting therapy (T1) and 60 days after starting therapy (T2). The control group consisted of five healthy animals.

Serum concentrations of IL-17 and IL-31 were determined by enzyme immunoassay (MyBiosource®, United States of America), following the manufacturer's instructions.

After analyzing the results, IL-17 concentration values showed statistical differences between T0 and T1 ($p=0.221$), between T0 and T2 ($p=0.011$). IL-31 values were statistically different between T0 and T1 ($p=0.010$), between T0 and T2 ($p=0.184$) and between T1 and T2 ($p=0.855$) there were no significant differences, determining an initial decrease in concentration and later maintenance or slight increase. Comparing the variation of IL-17, IL-31 concentrations in the two treatment groups at the different times, there were no changes between the group using oclacitinib and the group using lokivetmab ($p>0.05$) as treatment. A positive correlation was observed between pruritus (T2) and lesions (T2) and between serum IL-31 concentration (T0) and pruritus (T0). There was also a higher serum concentration of IL-17 in animals with CAD compared to healthy animals. The variation of lesions and pruritus decreased over time, which demonstrates the success of the therapy used.

The results obtained showed an increase in serum IL-17 concentrations in dogs with CAD and its decrease over the study treatment period. Considering these results and the involvement of IL-17 in cutaneous inflammation in CAD, the possible development of new therapeutic options based on this potential therapeutic target is suggested.

Keywords: canine atopic dermatitis, interleukins, lokivetmab, oclacitinib, ELISA

1. Introdução

A dermatite atópica canina (DAC) é uma patologia alérgica multifatorial de elevada incidência, sendo estimada em aproximadamente 10-15%, com patogenia complexa, que resulta de uma interação de carácter imunológico, da predisposição genética e dos fatores ambientais (Gedon & Mueller, 2018; Outerbridge & Jordan, 2021).

A DAC é definida como um processo inflamatório pruriginoso, causando lesão, inflamação e disbiose do microbioma da barreira cutânea (Bradley et al., 2016; Marsella et al., 2011; Olivry, 2011), promovendo a penetração dos alérgenos ambientais, associados à produção de imunoglobulina E (IgE), originando disfunções no sistema imunitário e na barreira cutânea (Gedon & Mueller, 2018).

Após contacto com o alérgeno, os queratinócitos moldam o tipo de resposta imunitária através de citocinas, que desempenham um papel fundamental no desenvolvimento da doença (van Brussel et al., 2021). Segundo Asahina et al., (2015) existem estudos que indicam que as citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias induzidas por queratinócitos desempenham um papel importante na patogénese da DAC. As citocinas atuam nas células dendríticas alterando a forma de processar os antígenos e a resposta linfocítica que é gerada.

A interleucina 31 (IL-31) foi identificada e descrita na implicação de condições cutâneas pruriginosas, nomeadamente nos sinais característicos de DAC (Gonzales et al., 2013; Marsella et al., 2012). É uma citocina ativada pelos linfócitos T (Figura 1-A) que desencadeia a ativação da janus quinase (JAKs) induzindo o prurido. (Gonzales et al., 2013; Marsella et al., 2012; McCandless et al., 2014; van Brussel et al., 2021).

A interleucina 17 (IL-17) foi caracterizada como uma citocina com propriedades inflamatórias, produzida pelas células Th17 que induzem a ativação dos macrófagos e a proliferação e diferenciação dos queratinócitos (Nakajima et al., 2014; Shiomitsu et al., 2021), produzindo mais citocinas pró inflamatórias (Figura 1-B). A IL-17 como mediador inflamatório (Zenobia & Hajishengallis, 2015), emergiu como um potencial interveniente na patogénese da DAC (Marsella, 2021), na função e inflamação da barreira cutânea e no desenvolvimento da resposta Th2. No entanto, o efeito da IL-17 na patogénese da DAC ainda não foi totalmente compreendido (Asahina et al., 2015).

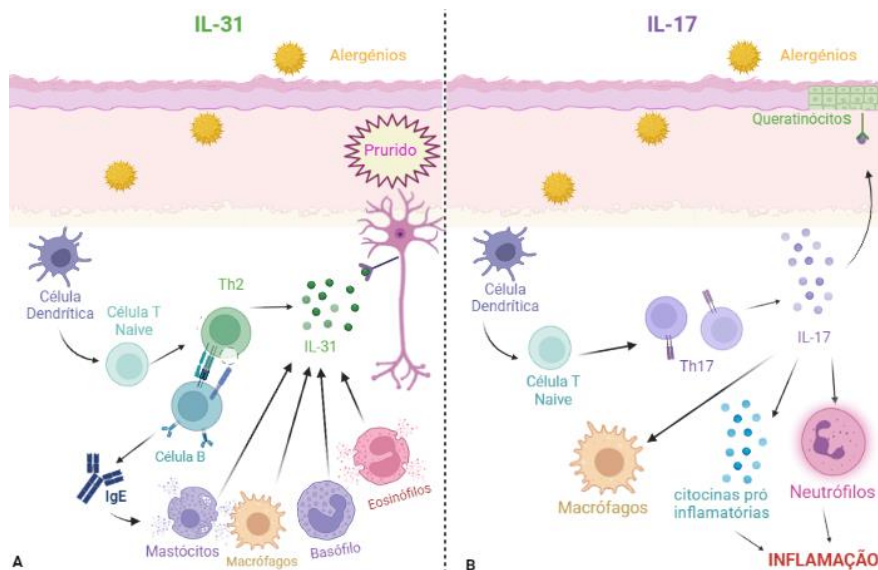


Figura 1 – A: Resposta imunitária após contacto com alérgenos, pela via Th2 originando libertação de Imunoglobulina E (IgE), mastócitos, macrófagos, basófilos, eosinófilos e IL-31, que se liga diretamente a receptores específicos neuronais e mediadores de prurido, induzindo-o; **B:** Resposta imunitária após contacto com alérgenos, pela via Th17 originando a libertação de IL-17, que promove o recrutamento de macrófagos, proliferação dos queratinócitos e estimulação da produção de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando um aumento da inflamação mediado por neutrófilos. Adaptado de (Gonzales et al., 2013; Krautmann et al., 2023; Zenobia & Hajishengallis, 2015).

Nesta patologia, o prurido é o sinal clínico mais comum, precedendo outros sinais como liquenificação, eritema, escoriações, hiperpigmentação, alopecia auto-induzida, representando uma característica chave para o diagnóstico da mesma (Outerbridge & Jordan, 2021). A longo prazo, poderá afetar significativamente a qualidade de vida do cão e do tutor por ser tão fatigante e incómodo (Gonzales et al., 2016), o que justifica a investigação de outras terapêuticas capazes de controlar os sinais clínicos. (Cosgrove, Wren, Cleaver, Walsh, et al., 2013). Consequentemente, surgiram dois fármacos, o oclacitinib em 2013 e o lokivetmab em 2017, que demonstraram eficácia e segurança na abordagem desta patologia, destacando-se por não apresentarem os efeitos adversos descritos com a administração de glucocorticoides ou outros imunossuppressores (Bruet et al., 2022).

O oclacitinib (Apoquel®) é um inibidor seletivo da JAK1 (Figura 2-A) uma tirosina quinase envolvida na transdução de sinal de citocinas mediadoras do prurido e pró-inflamatórias, bem como na sinalização de IL-31 (Banovic et al., 2019; Cosgrove, Wren, Cleaver, Martin, et al., 2013; Gonzales et al., 2014; Visser et al., 2022). Este fármaco atua através do bloqueio da via Th2, inibindo estas vias de sinalização. (Gadeyne et al., 2014; Visser et al., 2022).

O lokivetmab (Cytoint®) foi o primeiro anticorpo monoclonal (mAb) usado em medicina veterinária, ligando-se especificamente à IL-31 circulante, neutralizando-a e assim, impedindo a sua

ligação ao recetor (Figura 2-B), pelo que a via de sinalização do prurido não é desencadeada. (Cosgrove et al., 2015; Fleck et al., 2021; Gober et al., 2022).

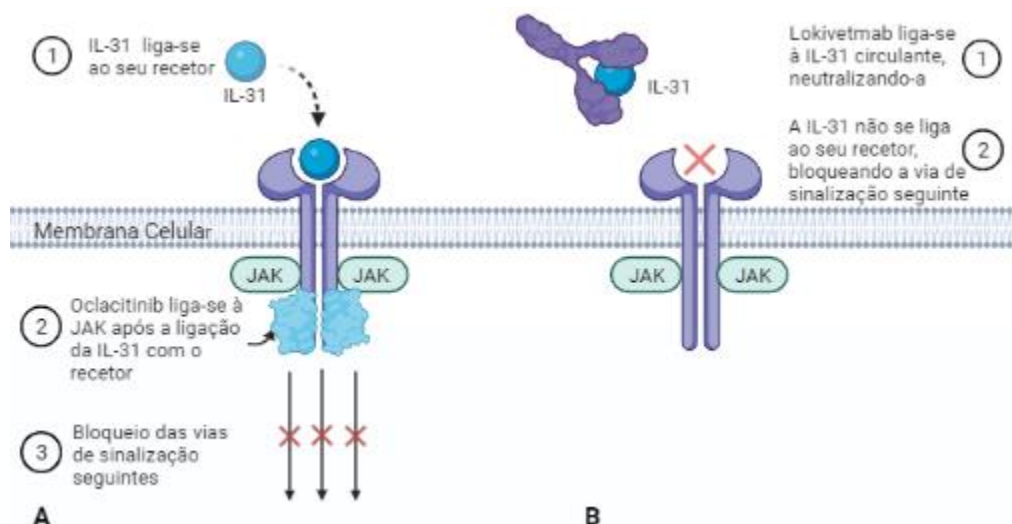


Figura 2 – A: Via de indução do prurido ocorre através da ligação da IL-31 ao seu recetor, a enzima tirosina quinase (JAK). O oclacitinib atua após esta ligação, inibindo a transdução de sinal e bloqueando as diversas vias de sinalização. **B:** O lokivetmab atua antes da ligação da IL-31 ao seu recetor (JAK), ligando-se seletivamente a um epítipo desta interleucina, neutralizando-a e impedindo a sua ligação e consequentemente as vias de sinalização seguintes.

Adaptado de (Gadeyne et al., 2014; Gonzales et al., 2014; Visser et al., 2022; Zoetis, 2020).

Estes dois fármacos apresentam diferenças relevantes, designadamente na posologia e propriedades farmacológicas, que se destacam na Tabela 1.

Tabela 1 – Comparação entre as vias de administração, a posologia, as propriedades farmacodinâmicas, farmacocinéticas e imunológicas, o início da eficácia e os efeitos adversos, do oclacitinib e do lokivetmab.

	Oclacitinib Apoquel®, 2013	Lokivetmab Cytopoint®, 2017
Via de administração	Via oral	Via subcutânea
Posologia	0,4 a 0,6 mg/kg duas vezes por dia durante 15 dias e uma vez por dia para tratamento de manutenção	2 mg/Kg (tabelado) a cada 4-8 semanas
Propriedades farmacodinâmicas	Inibe seletivamente a função de citocinas alvo dependentes da atividade enzimática da JAK, as pró inflamatórias e as mediadoras do prurido	mAb
Propriedades farmacocinéticas	Rapidamente absorvido, tempo de concentração no plasma < 1h e semivida de 3,5h, baixa ligação às proteínas e os principais metabolitos foram identificados no plasma e na urina	Sem metabolização
Propriedades imunológicas	Fármaco convencional sem propriedades imunológicas	Anticorpo monoclonal caninizado com alvo específico para a IL-31, impedindo a ligação ao seu co-recetor
Início da eficácia	4 horas	Até 24 horas
Reações adversas	Diarreia; vômito; anorexia; letargia; polidipsia e diminuição da contagem leucocitária média	Em casos muito raros: vômito e/ou diarreia, (reações de hipersensibilidade) e letargia

IL-31: Interleucina 31; JAK: tirosina quinase; mAb: Anticorpo monoclonal; tabelado: Anexo 6.

Adaptado de (Agência Europeia do Medicamento, 2013, 2017; Cosgrove et al., 2015; Zoetis, 2020).

Assim, pretendeu-se realizar este estudo com o objetivo quantificar e analisar as concentrações séricas da concentração da IL-7 e IL-31 em animais diagnosticados com DAC sob terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib e as suas flutuações ao longo do tratamento, analisar as diferenças entre as duas terapêuticas utilizadas e a comparar com o grupo de controlo. Pretendeu-se também, avaliar o prurido e a gravidade de lesões durante a terapêutica.

2. Material e métodos

2.1. Animais

Este estudo decorreu entre o período de 1 de dezembro de 2022 a 30 de maio de 2023 em três centros de atendimento médico-veterinário (CAMV), são eles: o Hospital Veterinário e Universitário de Coimbra (HVUC), o Hospital Veterinário de Coimbra (HVC) e o Hospital Veterinário do Porto (HVP) que aceitaram participar.

Esta avaliação incluiu animais diagnosticados com DAC, com idades compreendidas entre um a oito anos, com tutor próprio independentemente do género e raça, apresentados em consulta de dermatologia nos três CAMVs. Os animais apresentavam-se com exame físico normal e após diagnóstico foi identificada a necessidade de controlo do prurido, classificado como crónico e não sazonal. O diagnóstico baseou-se na história clínica do animal, na sua apresentação clínica sugestiva, no cumprimento de pelo menos cinco critérios de Favrot (Favrot, 2013; Favrot, Steffan, et al., 2010) (Anexo 2) e na exclusão de diagnósticos diferenciais como dermatite alérgica à picada da pulga, a sarna sarcótica, outros possíveis ectoparasitas e a alergia alimentar, através da dieta de eliminação/provocação (Hensel et al., 2015).

A presença de outra condição patológica com necessidade de controlo farmacológico; o uso de terapêutica imunomoduladora/anti-inflamatória, sistémica e/ou tópica; a administração de antibioterapia nos 30 dias anteriores à inclusão no estudo; a aplicação de algum tratamento tópico como champôs ou antiparasitários não poderá ter sofrido alterações nos últimos 30 dias e o não cumprimento do protocolo terapêutico de forma correta, ou não comparecimento nas consultas de controlo, são critérios de exclusão, invalidando a participação do animal no estudo.

Após aplicação dos critérios, foram incluídos 17 animais, 12 diagnosticados com DAC dos quais quatro utilizaram o protocolo terapêutico com oclacitinib e oito com lokivetmab e cinco saudáveis. Estes cinco animais apresentaram-se para consulta de rotina, entre um a oito anos, com vacinação e desparasitação em dia e sem patologias imunológicas.

O presente estudo aprovado pela Comissão de Ética da Escola Universitária Vasco da Gama (CE-EUVG) (Parecer nº 18/2022) e a participação de todos os animais incluídos foi autorizada por meio de um consentimento informado (Anexo 1), assinado pelos respetivos tutores.

2.2. Desenho do estudo

O estudo foi desenhado de forma a avaliar o animal em três momentos diferentes: antes de iniciar a terapêutica (T0), 30 dias após o início da terapêutica (T1) e após 60 dias do início da mesma (T2). Foi elaborada uma ficha de identificação (Anexo 3) para registo e avaliação da evolução clínica nos três momentos distintos.

Após diagnóstico definitivo de DAC (Figura 3) o animal foi avaliado pelo médico veterinário (T0), através do exame físico, do quadro clínico, da gravidade e descrição lesional com recurso à escala

Canine Atopic Dermatitis Lesion Index (CADLI) (Plant et al., 2012) e o grau de prurido utilizando a Escala Analógica Visual (pVAS), baseada na resposta do tutor (Hill et al., 2007; Rybníček et al., 2009). e registo fotográfico. Para diminuir o grau de subjetividade da resposta do tutor associada à escala pVAS, foram seguidas as indicações do estudo de Young et al., (2019).

Após esta avaliação, foi realizada a colheita de três ml de sangue total, pela veia jugular, metade para um tubo seco e a outra metade para um tubo em EDTA, para a realização de um hemograma. As amostras foram centrifugadas a 2500 rpm durante 10 minutos, a amostra de soro foi colocada em microtubo e armazenado a -20°C até ao momento da análise.

Após recolha sanguínea, foi administrado por via subcutânea na região interescapular uma dose única de um ml de lokivetmab (10 mg, 20 mg, 30 mg ou 40 mg) com duração mensal (Anexo 6) ou iniciado o tratamento com oclacitinib (3,6 mg, 5,4 mg e 16 mg) 0,4 a 0,6 mg/kg por via oral duas vezes por dia (BID) durante 15 dias e posterior diminuição para uma vez ao dia (SID).

Na segunda e terceira visita do animal ao CAMV (T1 e T2 respetivamente) foi realizado novo exame físico pelo médico veterinário, avaliadas as lesões presentes, aferido o grau de prurido, realizada nova colheita sanguínea e administração de lokivetmab ou continuação da terapêutica oral diária de oclacitinib.

Durante o período em estudo, não foi administrada qualquer terapêutica sistémica ou tópica, para além do oclacitinib ou do lokivetmab.

Adicionalmente, foi também monitorizado possíveis efeitos adversos, para avaliação da segurança dos dois fármacos e questionado a presença de outras alterações percecionadas pelo tutor.

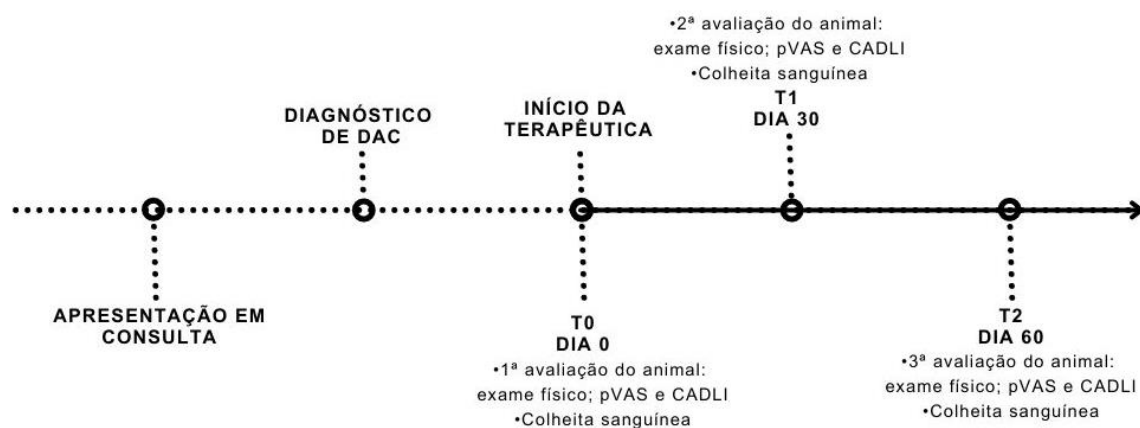


Figura 3 – Desenho do estudo: 1ª consulta- apresentação do animal em consulta de dermatologia; 2ª consulta: obtenção do diagnóstico de DAC; 3ª consulta (T0): início da terapêutica, avaliação do animal em relação ao prurido, lesões e 1ª colheita sanguínea; 4ª consulta (T1): 2ª avaliação e 2ª colheita sanguínea; 5ª consulta (T2): 3ª avaliação e 3ª colheita sanguínea.

T0 - tempo antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib; T1- 30 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib; T2 - 60 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib; pVAS- Escala visual analógica do prurido; CADLI- Índice de lesões da Dermatite Atópica Canina.

2.3. Determinação analítica

A determinação das concentrações séricas de IL-17 e IL-31 foi realizada no laboratório da Escola Universitária Vasco da Gama, com a utilização de dois kits comerciais de ensaio imunoenzimático (ELISA) específicos para cães: *Canine Interleukin 17*: MyBiosource®, Estados Unidos da América e *Canine Interleukin 31*: MyBiosource®, Estados Unidos da América, seguindo as instruções do fabricante.

A análise das concentrações séricas de IL-17 nas amostras de soro, foi realizada através do formato sandwich de duplo anticorpo, com um intervalo de curvas padrão entre 10 a 4000 pg/ml, sensibilidade 5,15 pg/ml. Foram realizadas diluições seriadas de 150 pg/ml, 300 pg/ml, 600 pg/ml, 1200pg/ml e 2400 pg/ml. As amostras foram analisadas em duplicado e a absorvância medida em 450 nm. A curva padrão ($y=0,0027x + 0,0749$, $r^2=0,997$) foi utilizada para obter as concentrações séricas de IL-17, que foram expressas em pg/ml.

A análise das concentrações séricas de IL-31 nas amostras de soro, recorreu ao ELISA direto, com um intervalo de curvas padrão entre 15 a 1000 pg/ml e sensibilidade de 5 pg/ml. Foram realizadas diluições seriadas de 15,6 pg/ml, 31,2 pg/ml, 62,5 pg/ml, 125 pg/ml, 250 pg/ml, 500 pg/ml e 100 pg/ml. As amostras foram analisadas em duplicado e a absorvância medida em 450 nm. Com os valores das amostras padrão, obteve-se a curva padrão ($y = 0,0006x + 0,3564$, $r^2=0,978$) para obtenção das concentrações séricas de IL-31, expressas em pg/ml.

2.4. Análise estatística

A análise foi desenvolvida com recurso ao *Statistical Package for the Social Sciences* (v26.0, SPSS An IBM Company, Chicago, IL), com exceção do traçado dos gráficos onde foi utilizado o *software R Studio* (versão 2023.03.0). A significância estatística assumida foi de $p \leq 0,05$.

Foram inicialmente avaliados os pressupostos à realização de testes paramétricos, nomeadamente, a normalidade dos dados e a homogeneidade de variâncias, com recurso ao teste de Shapiro-Wilk e teste de Levéne respetivamente, e ainda pela inspeção gráfica da homogeneidade da variância e normalidade dos resíduos (Nornadiyah Mohd, 2011; W. Nordstokke, 2010). Desta forma, foram escolhidos os testes não paramétricos para a análise dos dados, uma vez que os dados não cumpriam os requisitos para a utilização de testes paramétricos.

O teste de Friedman (teste não paramétrico para igualdade de medianas de 3 ou mais amostras emparelhadas), foi utilizado para detetar diferenças ao longo de diferentes momentos. Este teste não utiliza os dados numéricos diretamente, mas sim os postos (*ranking*) ocupados por eles após a ordenação feita para cada grupo separadamente (Friedman, 1937). Após a ordenação é testada a hipótese de igualdade da soma do ranking de cada grupo. Nos casos em que o teste de Friedman se demonstrou significativo, foi realizado um teste posthoc para esclarecer quais os momentos que eram diferentes entre si (testes de comparações múltiplas utilizando a correção de Bonferroni). As

comparações múltiplas foram realizadas com o objetivo de investigar as diferenças entre os pares de grupos (momentos) em relação à variável em estudo. Esta abordagem permitiu identificar quais os pares de momentos que apresentaram diferenças estatisticamente significativas, controlando o risco de erro tipo I.

Para a comparação entre os dois medicamentos foi utilizado o teste de Mann-Whitney U Test para amostras independentes, que é um teste não paramétrico aplicado para duas amostras independentes, que compara a mediana entre dois grupos e que está indicado para comparação de dois grupos quando os requisitos para aplicação do teste paramétrico t de Student não são cumpridos (McKnight, 2010).

Por último, foi usada a correlação de Spearman que é uma medida de correlação não paramétrica usada quando os dados não assumem uma distribuição normal. Este coeficiente de correlação mede a força e direção da associação entre duas variáveis classificadas (Myers, 2004). Este coeficiente varia entre -1 e 1, onde 1 representa uma correlação perfeitamente positiva, -1 representa uma correlação perfeitamente negativa e 0 representa a ausência de correlação. Quanto mais próximo o valor estiver de 1, mais forte é a relação positiva entre as variáveis (Schober et al., 2018).

3. Resultados

3.1. Caracterização da amostra

Neste estudo foram incluídos 12 cães, dos quais 66% (8/12) são de raça pura e 33% (4/12) de raça indeterminada; 8% (1/12) são machos e 92% (11/12) fêmeas e 50% (6/12) dos cães castrados. A média de idades é de 4 anos (DP= 2,46) e o peso médio é de 23 kg (DP= 10,1) (Tabela 2).

Tabela 2 – Caracterização dos animais incluídos no estudo.

Animal	Raça	Idade (anos)	Peso (kg)	Sexo	Estado reprodutivo: submetido a OVH/orquiectomia	Terapêutica instituída
1	indeterminada	6	16,0	Fêmea	Não	oclacitinib
2	yorkshire	7	2,7	Fêmea	Sim	lokivetmab
3	weimaraner	3	31,0	Fêmea	Sim	oclacitinib
4	pug	1	11,6	Fêmea	Sim	oclacitinib
5	indeterminada	6	30,4	Fêmea	Sim	oclacitinib
6	yorkshire	8	2,9	Fêmea	Sim	lokivetmab
7	akita inu	1	24,2	Fêmea	Não	lokivetmab
8	bulldog francês	2	12,8	Macho	Não	lokivetmab
9	bulldog francês	4	12,9	Fêmea	Não	lokivetmab
10	cavalier	2	7,6	Fêmea	Não	lokivetmab
11	indeterminada	2	31,8	Fêmea	Não	lokivetmab
12	indeterminada	2	12,2	Fêmea	Sim	lokivetmab
Média± DP		4±2,46	23±10,1			

DP: Desvio padrão; OVH: Ovariohisterectomia.

No grupo de controlo foram incluídos 5 cães, a sua caracterização está descrita na Tabela 3.

Tabela 3 – Caracterização dos animais saudáveis.

Animal	Raça	Idade (anos)	Peso (kg)	Sexo	Estado reprodutivo: submetido a OVH/orquiectomia
C1	indeterminada	4	17,2	Macho	Sim
C2	boxer	5	31,2	Fêmea	Sim
C3	indeterminada	3	23,0	Macho	Sim
C4	teckel	6	18,0	Fêmea	Não
C5	teckel	7	17,0	Macho	Não
Média± DP		5 ±1,58	21,28± 6,06		

3.2. Caracterização clínica

A avaliação das lesões pela escala CADLI (de 0 a 50) e do prurido pela escala pVAS (de 0 a 10) nos diferentes tempos, encontra-se descrita na Tabela 4.

Tabela 4 – Resultados obtidos através da aplicação da escala de lesões e de prurido de cada animal, a média e medidas de dispersão.

Animal	Escala de lesões CADLI			Escala de prurido pVAS		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	35	15	8	8	4	2
2	20	10	4	6	4	2
3	36	21	14	8	6	4
4	25	15	14	6	4	2
5	28	15	8	6	4	2
6	32	16	8	8	4	2
7	22	8	3	6	4	2
8	23	14	11	8	4	2
9	38	24	17	8	4	4
10	24	17	12	6	4	2
11	19	17	10	8	4	2
12	17	10	4	6	4	2
Média ± DP	26,58 ±7,11	15,17 ±4,52	9,40 ±4,42	7,00 ±1,04	4,17 ±0,58	2,30 ±0,78
CV (%)	27	30	47	15	14	34
Min-Máx	17-38	8-21	4-17	6-8	4-6	2-4

DP: Desvio padrão; CV (%): coeficiente de variação; Min-Máx: mínimo e máximo; T0- tempo antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib; T1- 30 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib; T2- 60 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib.

A variação de prurido apresentou diferenças estatisticamente significativas entre T0 e T1 ($p=0,032$) e também entre T0 e T2 ($p<0,001$). Entre T1 e T2 não foram encontradas diferenças significativas ($p=0,074$). A Figura 4 demonstra a diminuição de prurido ao longo do tempo.

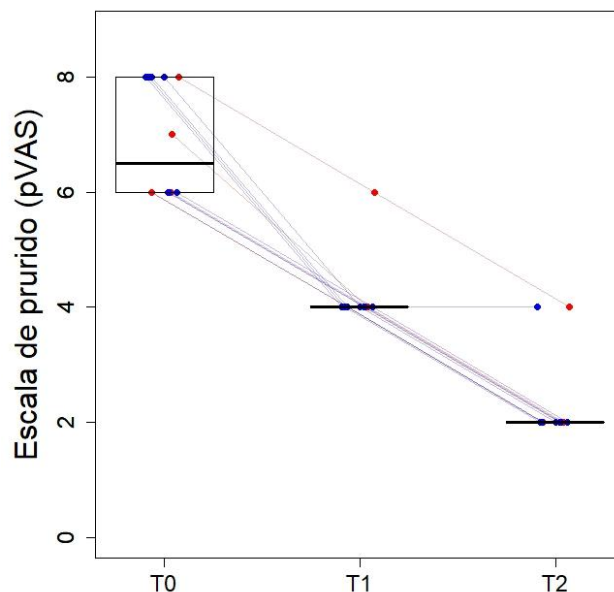


Figura 4 – Variação da escala de prurido em função do tempo e da terapêutica utilizada (n=12 para cada tempo).

A caixa de bigodes representa graficamente os quartis, fornecendo informação visual sobre a mediana, 1º e 3º quartil, a distância interquartil e os extremos. As linhas servem para uma melhor compreensão da variação dos valores ao longo do tempo de estudo. Cor vermelha- terapêutica com oclacitinib; cor azul- terapêutica com lokivetmab; T0- tempo antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib; T1- 30 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib; T2- 60 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib.

No âmbito da escala de avaliação das lesões os resultados obtidos apresentam diferenças significativas entre todos os tempos (T0 vs. T1: $p=0,043$; T0 vs. T2: $p<0,001$ e T1 vs. T2: $p=0,043$). A Figura 5 demonstra a diminuição progressiva das lesões ao longo do tempo.

A título representativo o Anexo 5 demonstra a diminuição das lesões cutâneas presentes no Animal 9, ao longo dos três tempos. São observadas lesões caracterizadas por eritema, escoriação, liquenificação e hiperpigmentação ao nível abdominal ventral e da zona inguinal. Nos membros anteriores verifica-se zonas com eritema, escoriação, erosão e alopecia.

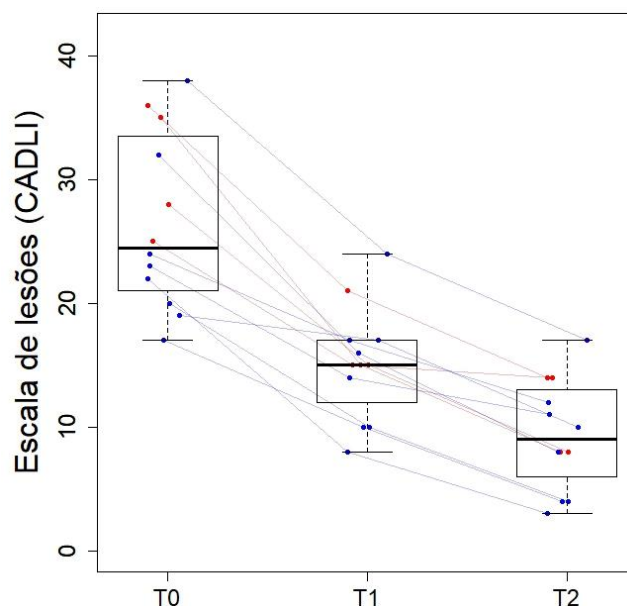


Figura 5 – Variação da escala de lesões em função do tempo e da terapêutica utilizada (n=12 para cada tempo).

A caixa de bigodes representa graficamente os quartis, fornecendo informação visual sobre a mediana, 1º e 3º quartil, a distância interquartil e os extremos. As linhas servem para uma melhor compreensão da variação dos valores ao longo do tempo de estudo. Cor vermelha- terapêutica com oclacitinib; cor azul- terapêutica com lokivetmab; T0- tempo antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib; T1- 30 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib; T2- 60 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib.

Adicionalmente, foi avaliada a variação do peso que demonstrou diferenças significativas entre T0 e T2 ($p < 0,001$). Entre T0 e T1 ($p = 0,096$) e T1 e T2 ($p = 0,377$) não existiram diferenças significativas ($p = 0,074$). Na Figura 6 verificamos os diferentes pesos e a sua ligeira tendência de aumento ao longo do tempo.

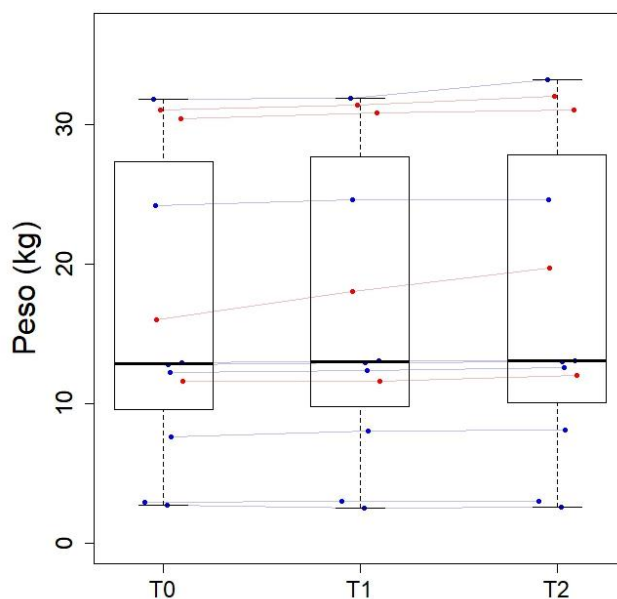


Figura 6 – Variação do peso em função do tempo e da terapêutica utilizada (n=12 para cada tempo).

A caixa de bigodes representa graficamente os quartis, fornecendo informação visual sobre a mediana, 1º e 3º quartil, a distância interquartil e os extremos. As linhas servem para uma melhor compreensão da variação dos valores ao longo do tempo de estudo. Cor vermelha- terapêutica com oclacitinib; cor azul- terapêutica com lokivetmab; T0- tempo antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib; T1- 30 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib; T2- 60 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib.

Foram avaliadas as diferenças das variáveis em estudo entre os dois grupos de tratamento. No que diz respeito à escala de lesões, de prurido e ao peso no momento T0, T1 e T2 não foram significativamente diferentes entre o grupo que fez tratamento com o oclacitinib e o grupo que fez tratamento com o lokivetmab ($p>0,05$) (Anexo 4).

Relativamente aos resultados dos vários parâmetros sanguíneos avaliados pelo hemograma, foram observados desvios decrescentes na contagem leucocitária média (neutrófilos e monócitos) e eosinofílica. A diminuição não foi clinicamente significativa, uma vez que todos os valores permaneceram dentro dos valores laboratoriais de referência.

Quanto aos efeitos adversos, avaliados adicionalmente, não houveram registos dos mesmos, durante a realização deste estudo.

3.3. Determinação das concentrações séricas de IL-17 e IL-31

Os resultados obtidos através da quantificação das concentrações séricas de IL-17 e IL-31 pelo método ELISA encontram-se descritos na Tabela 5.

Tabela 5 – Resultados obtidos através da determinação das concentrações séricas (pg/ml) de IL-17 e IL-31 obtidas nos três tempos de avaliação, a média e medidas de dispersão.

Animal	Concentração IL-17 (pg/ml)			Concentração IL-31 (pg/ml)		
	T0	T1	T2	T0	T1	T2
1	54,48	40,40	34,85	639,00	197,66	608,50
2	92,44	63,55	73,38	1037,00	744,33	700,10
3	50,59	42,44	47,62	825,16	702,67	**
4	23,19	27,44	43,50	642,60	470,16	400,30
5	107,40	53,19	36,50	620,16	280,00	814,00
6	58,37	45,04	35,40	649,00	271,00	**
7	51,80	46,70	18,93	509,30	**	236,80
8	42,40	45,50	35,70	754,30	641,00	650,00
9	61,14	53,70	26,50	775,16	346,00	349,00
10	69,85	55,70	46,10	521,83	181,00	324,00
11	57,62	*	41,00	671,00	*	281,00
12	38,50	42,80	*	383,50	745,16	*
Média ± Desvio padrão	59 ±22,8	47±9,5	40 ±13,9	700 ±176,3	426 ±231,3	485±209,7
CV (%)	39	20	35	25	54	43
Min-Máx	23,19-107,40	27,44-63,55	26,50-73,38	383,50-1037,00	181,00-745,16	236,80-814,00

* ausência de colheita; ** erro analítico; DP: Desvio padrão; CV (%): coeficiente de variação; Min-Máx: mínimo e máximo; T0- tempo antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib; T1- 30 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib; T2- 60 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib

A comparação dos valores obtidos de interleucina 17 entre os tempos T0 e T2 revelaram diferenças significativas ($p=0,011$). Entre o momento T0 e T1 não foram observadas diferenças significativas ($p=0,221$) e entre o momento T1 e T2 também não foram identificadas diferenças ($p=0,791$). A Figura 7 demonstra a diminuição da concentração de IL-17 ao longo do tempo.

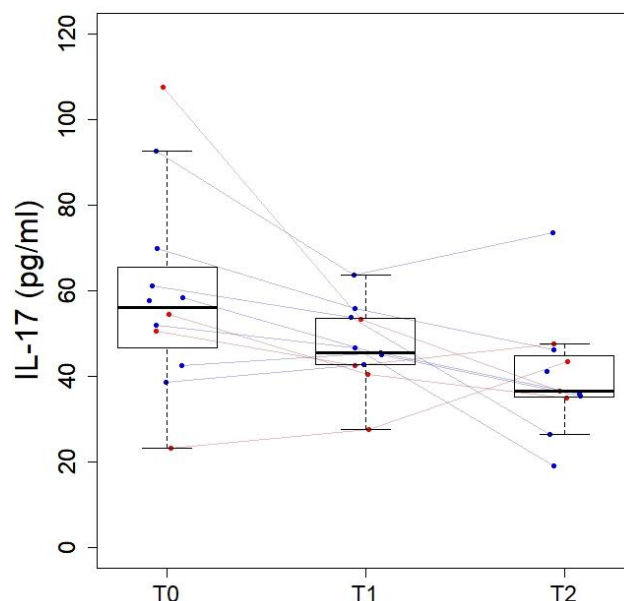


Figura 7 – Variação das concentrações séricas de IL-17 em função do tempo e da terapêutica utilizada (n=12 em T0; n=11 em T1 e T2).

A caixa de bigodes representa graficamente os quartis, fornecendo informação visual sobre a mediana, 1º e 3º quartil, a distância interquartil e os extremos. As linhas servem para uma melhor compreensão da variação dos valores ao longo do tempo de estudo. Cor vermelha- terapêutica com oclacitinib; cor azul- terapêutica com lokivetmab; T0- tempo antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib; T1- 30 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib; T2- 60 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib.

Relativamente aos resultados das concentrações séricas da IL-31, podemos destacar as diferenças significativas observadas entre o T0 e T1 ($p=0,010$). Não se verificaram diferenças significativas quando comparados os momentos T0 e T2 ($p=0,184$), nem entre T1 e T2 ($p=0,855$). Na Figura 8 é possível observar a distribuição das concentrações em função do tempo, demonstrando uma diminuição da concentração de IL-31 entre T0 e T1 e sem alterações significativas entre T1 e T2.

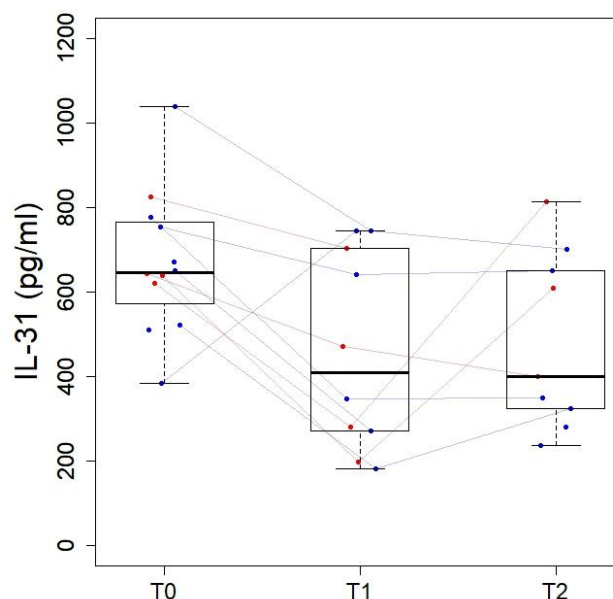


Figura 8 – Variação das concentrações séricas de IL-31 em função do tempo e da terapêutica utilizada (n=12 em T0; n=10 em T1 e n=9 em T2).

A caixa de bigodes representa graficamente os quartis, fornecendo informação visual sobre a mediana, 1º e 3º quartil, a distância interquartil e os extremos. As linhas servem para uma melhor compreensão da variação dos valores ao longo do tempo de estudo. Cor vermelha- terapêutica com oclacitinib; cor azul- terapêutica com lokivetmab; T0- tempo antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib; T1- 30 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib; T2- 60 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib.

Comparando os valores das concentrações de IL-17 e IL-31 nos momentos T0, T1 e T2, estes não foram significativamente diferentes entre o grupo que fez tratamento com o oclacitinib e com o lokivetmab ($p>0,05$) (Anexo 4), contudo é de salientar a reduzida dimensão da amostra dos dois grupos incluídos no estudo.

3.4. Determinação das concentrações séricas de IL-17 e IL-31 nos animais saudáveis

Os resultados da quantificação de IL-17 e IL-31 pelo método de ELISA, na amostragem de controlo estão patentes na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados obtidos através da determinação das concentrações séricas (pg/ml) de IL-17 e IL-31 obtidas nos animais saudáveis, a média e medidas de dispersão.

Animal Controlo	IL-17 (pg/ml)	IL-31 (pg/ml)
C1	46,52	211,83
C2	42,26	466,83
C3	45,41	931,00
C4	23,37	257,67
C5	29,48	823,50
Média ± Desvio padrão	37,41 ±10,37	538,17 ±326,34
CV (%)	28	60
Min-Máx	23,37-46,52	211,83-931,00

C: animal saudável; DP: Desvio padrão; CV (%): coeficiente de variação; Min-Máx: mínimo e máximo.

Apenas foi possível calcular as diferenças para as variáveis IL-17 T0, IL-31 T0, por serem as únicas que estavam disponíveis para o grupo de controlo. A variável IL-17 no T0 apresentou diferenças significativas entre os animais com patologia e os animais saudáveis ($p=0,037$) (Figura 9). A variável IL-31 T0 não apresentou alterações estatisticamente significativas ($p=0,442$) (Figura 10).

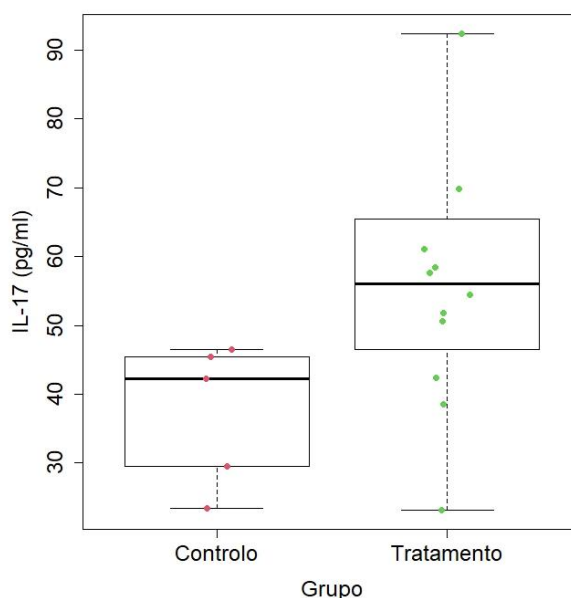


Figura 9 – Variação da concentração sérica de IL-17 nos animais saudáveis comparando com os animais com patologia antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib (T0).

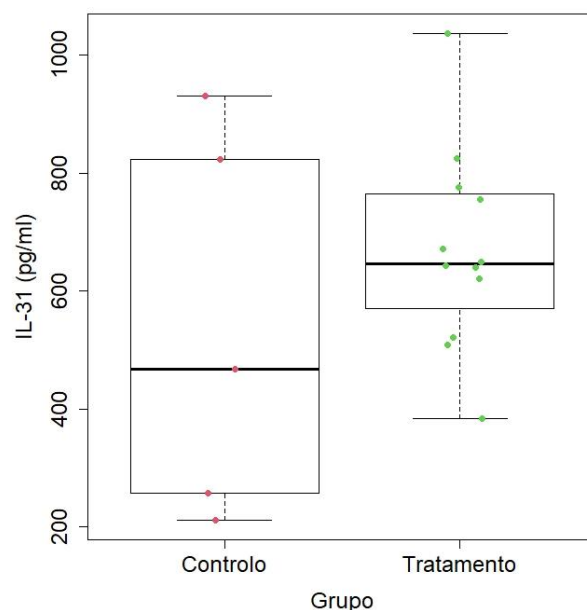


Figura 10 – Variação da concentração sérica de IL-31 nos animais saudáveis comparando com os animais com patologia antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib (T0).

A caixa de bigodes representa graficamente os quartis, fornecendo informação visual sobre a mediana, 1º e 3º quartil, a distância interquartil e os extremos. As linhas servem para uma melhor compreensão da variação dos valores ao longo do tempo de estudo. Cor vermelha- terapêutica com oclacitinib; cor azul- terapêutica com lokivetmab; T0- tempo antes de iniciar a terapêutica com lokivetmab ou oclacitinib; T1- 30 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib; T2- 60 dias após a primeira administração de lokivetmab ou oclacitinib.

3.5 Correlação entre variáveis clínicas e os valores das concentrações séricas das interleucinas

Os valores de prurido em T2 apresentaram correlações fortes com os valores das lesões em T2 (rho de Spearman=0,622, $p=0,031$). Os valores de prurido em T0, têm uma correlação forte (rho de Spearman=0,591, $p=0,043$) com os valores de IL-31 em T0 ($p=0,043$).

As restantes variáveis não apresentaram correlações significativas. Também foram analisadas as variáveis, idade e estado reprodutivo, não apresentando diferenças significativas neste estudo.

4. Discussão

As concentrações séricas de IL-17 e IL-31 no soro de 12 cães, diagnosticados com dermatite atópica canina, foram avaliadas ao longo da terapêutica utilizada.

Os animais foram diagnosticados com DAC através das *guidelines* (Hensel et al., 2015), utilizando os critérios de Favrot, os quais apresentam sensibilidade de 80% a 85% e especificidade 79% a 85% na descrição das lesões dos animais (Favrot et al., 2010).

Para a descrição de lesões foi escolhida a escala CADLI, por ser adequada quer no contexto de investigação clínica como na prática clínica em virtude da sua simplicidade, comparando com outras escalas (Plant et al., 2012).

No presente estudo as lesões avaliadas em T0 apresentaram um valor médio de 26,58 comparativamente a T1 que apresentou 15,17 e em T2 9,4 sendo esta variável a única que apresentou diferenças significativas entre os três momentos. Os valores obtidos indicam uma diminuição das lesões ao longo do tempo após instituição da terapêutica, corroborando os estudos de Cosgrove, Wren, Cleaver, Walsh, et al., (2013) e Michels et al., (2016).

Para a descrição do prurido foi escolhida a escala pVAS, validada para a avaliação através da percepção do tutor (Hill et al., 2007 Rybníček et al., 2009). Para colmatar a subjetividade associada a este tipo de avaliação o tutor foi informado da pontuação atribuída na consulta anterior, tal como preconiza o estudo de Young et al., (2019). Neste estudo, verificou-se uma diminuição do prurido ao longo do tempo, com valores médio de 7; 4,17 e 2,3 respetivamente em T0, T1 e T2. Verificou-se também, uma correlação forte em T2 entre o valor do prurido e o valor das lesões em T2 (ρ de Spearman=0.622, $p=0.031$). Assim, estes resultados apontam para uma diminuição do prurido após introdução da terapêutica, independentemente do fármaco, corroborando o estudo de Souza et al. (2018); Van Brussel et al. (2021).

Sabe-se que a administração de IL-31 em modelo experimental induz prurido em cães (Gonzales et al., 2016) e que está presente em cães diagnosticados com DAC (Gonzales et al., 2013), sendo detetada entre os valores de 13 e 1000 pg/ml e apenas 4% dos animais a cima de 1000 pg/ml, com sensibilidade de 13 pg/ml (Gonzales et al., 2013). A sensibilidade no presente estudo foi de 5 pg/ml. Os valores médios de IL-31 foram de 700 pg/ml em T0, de 426 pg/ml em T1 e de 485 pg/ml em T2, os quais foram superiores aos reportados por Michels et al., (2016). De salientar que neste estudo apenas foi avaliada a concentração sérica antes do início da terapêutica.

A diminuição da concentração sérica de IL-31, de T0 para T1, demonstra a eficácia da terapêutica, como seria espectável. A comparação dos valores entre T1 e T2 revelou um ligeiro aumento da concentração. Contudo, esse aumento poderá ser explicado, potencialmente pelo facto do T2 se encontrar nos meses de abril a maio, em que a quantidade de alérgenos é significativamente maior, comparando com os outros meses do ano. É de notar que existe uma maior variabilidade em T1 (CV=54%) e em T2 (CV=43%).

A IL-31 também está aumentada em reações agudas por sensibilização a ácaros do pó (Marsella et al., 2018; Olivry et al., 2016; Tamamoto-Mochizuki et al., 2019; Tamamoto-Mochizuki &

Olivry, 2021) havendo uma correlação positiva ($r=0,6738$; $p=0,004$) entre esta interleucina e o quadro lesional (Marsella et al., 2018). Neste estudo a correlação foi verificada entre o prurido (T0) e a concentração sérica de IL-31 (T0) (ρ de Spearman= $0,591$; $p=0,043$), corroborando o estudo de Chaudhary et al., (2019) ($r=0,396$; $p<0,007$), o que demonstra o papel desta interleucina na manifestação do prurido.

No que concerne à IL-17 nos animais com DAC observou-se uma diminuição das concentrações séricas de IL-17 ao longo do tempo (T0=59 pg/ml; T1=47 pg/ml; T2=40 pg/ml). Estes resultados corroboram os estudos que indicam um aumento das células Th2 no sangue periférico e a associação desta interleucina (Früh et al., 2020 Tamamoto-Mochizuki & Olivry, 2021).

As concentrações médias de IL-17 no momento T0 foram de 59 pg/ml, comparativamente ao valor médio observado nos animais saudáveis (37,41 pg/ml), este perfil de resultados é corroborado por Chaudhary et al., (2019).

Os resultados poderão apontar para a possível associação desta interleucina e o desenvolvimento da DAC e o seu efeito na inflamação da pele.

Recentemente desenvolveram-se investigações sobre o aumento desta interleucina associado à inflamação noutras patologias como a anemia hemolítica imunomediada (Cuq et al., 2021) e a asma (Margelidon-Cozzolino et al., 2022), no entanto a sua patogénese ainda requer mais investigação (Figura 11).

Tabela 7 – Estudos publicados em que foram determinadas as concentrações de IL-17 e IL-31.

Patologia	Métodos de determinação de interleucina	Avaliação clínica	[IL-31]		[IL-17]		Efeito IL-31 no score	
			CP	SP	CP	SP		
DAC	ELISA (13 pg/ml)	vídeo	13 a 1000 pg / ml >1000 pg/ml (4%)	NA	NA	NA	↓	(Gonzales et al., 2013)
HDM	ELISA (1pg/ml)	CADESI-03	8 pg/ml a 128 pg/ml	NA	NA	NA	↓	(Marsella et al., 2018)
DAC	ND	VAS score e CADESI-03	20 a 3100 pg/ml, média 270 pg/ml	NA	NA	NA	↓	(Michels et al., 2016)
DAC	ELISA	CADLI e pVAS	6,79 a 177,14 pg/ml	10,49 a 80,78 pg/ml	10,22 a 149,93 pg/ml	9,62 a 56,27 pg/ml	↓	(Chaudhary et al., 2019)
IMHA	ELISA	NA	NA	NA	19,52 pg/mL	10,52 pg/mL	NA	(Cuq et al., 2021)

CP: Com patologia; NA: Não aplicável, SP: Sem patologia

Em animais com DAC a integridade da barreira cutânea está diminuída, aumentando o risco de contacto com o alérgénio (Früh et al., 2020). Segundo Marsella, (2021) a terapêutica antiprurítica restaura essa barreira cutânea, diminuindo o contacto com o alérgénio, inibindo a resposta imunitária e diminuindo a predisposição para infeções secundárias (Rynhoud et al., 2022). Neste estudo foi avaliada a terapêutica antiprurítica com lokivetmab e oclacitinib, verificando-se uma diminuição do prurido entre T0 e T1 e entre T0 e T2, das lesões em todos os tempos e das IL-17 e IL-31 entre T0 e T2 e entre T0 e T1, respetivamente. Atualmente não existem estudos que comparem diretamente as duas terapêuticas, no entanto o estudo de Souza et al., (2018) descreve uma resposta parcial ou nula à terapêutica com oclacitinib e posteriormente quando administrado lokivetmab uma resposta favorável na atenuação do prurido. Após a comparação dos resultados dos dois grupos de tratamento, conclui-se que não existem alterações significativas nas lesões, nem em nenhuma das outras variáveis em estudo, entre o grupo que utilizou o oclacitinib como terapêutica e o grupo que utilizou o lokivetmab.

Quanto à segurança, comparando os dois fármacos, o lokivetmab segundo estudos já realizados (Fleck et al., 2021; Krautmann et al., 2023; Michels et al., 2016; Souza et al., 2018; Van Brussel et al., 2021) demonstraram que apenas em casos muito raros foram descritos sinais gastrointestinais e quadro de de letargia. Tratando-se de um mAb anti-IL-31 altamente seletivo, não sofre metabolização e ligando-se apenas ao seu alvo, um epítipo da IL-31, justifica a menor ocorrência de efeitos adversos, não intencionais. No caso do oclacitinib estão descritas alterações gastrointestinais, letargia, polidipsia e diminuição da contagem leucocitária média (Briet et al., 2022; Cosgrove et al., 2015; Cosgrove, Wren, Cleaver, Martin, et al., 2013; Little et al., 2015).

Neste estudo verificou-se um aumento de peso ao longo do tempo, demonstrado também por Cosgrove et al., (2013). Comparando esta variável nos dois grupos de tratamento não existem diferenças, podendo ser descrito como o único efeito adverso reportado neste estudo. Uma possível explicação para este efeito poderá ser o impacto do tratamento no bem-estar animal e na relação do tutor e do animal, influenciando a sua apetência alimentar (Favrot, Linek, et al., 2010; Linek & Favrot, 2010). Para além do presente estudo, os estudos sobre a IL-17 e a DAC são escassos (Chaudhary et al., 2019; Olivry et al., 2016; Shiomitsu et al., 2021).

Uma das limitações deste estudo é o facto de não existir um grupo com placebo, não tendo sido realizado devido às questões éticas e de bem-estar animal, tendo-se utilizado um grupo de animais saudáveis para comparação. A reduzida dimensão da amostra foi outro fator limitante. A adesão do tutor é fulcral neste tipo de estudos, designadamente na avaliação do prurido, mas também em todo o processo, essencial para a conclusão do estudo longitudinal.

A vantagem deste estudo é a avaliação em três tempos diferentes, durante um período de 60 dias, da variação das lesões, do prurido e das concentrações séricas de IL-17 e IL-31 e a comparação destas variáveis entre as duas terapêuticas utilizadas, o oclacitinib e o lokivetmab. A comparação entre as duas terapêuticas, o oclacitinib e o lokivetmab é uma mais valia, na medida em que compara diretamente a evolução clínica e imunológica dos animais. A quantificação das concentrações de IL-17 em animais com DAC enriquece este estudo, podendo determinar o seu envolvimento na inflamação cutânea.

5. Conclusões e Considerações finais

O presente estudo pretende ser um contributo para esclarecer as alterações clínicas e imunológicas associadas à DAC, sobretudo da IL-17 ao longo do tempo. Os dois fármacos utilizados são uma opção de terapêutica em animais com esta patologia, atenuando a sua sintomatologia, melhorando o prurido e as lesões cutâneas. As interleucinas estudadas possuem um papel determinante na patogénese da doença, a IL-31 correlacionada com a existência de prurido e a IL-17 associada à inflamação da pele.

Os resultados deste estudo permitiram observar a diminuição do prurido e das lesões em função da terapêutica utilizada, identificando-se uma diminuição da concentração de IL-17 durante o período de tempo estudado e a diminuição da concentração de IL-31 após os primeiros 30 dias de terapêutica. Aferiu-se também que os animais saudáveis demonstraram concentrações de IL-17 mais baixas, em comparação com os animais com DAC. Salienta-se também, que não foram observadas alterações significativas nas variáveis em estudo, entre os animais do grupo tratado com oclacitinib e com lokivetmab. Por fim, observou-se que o aumento do peso foi o único efeito adverso descrito ao longo do tratamento.

A DAC é uma patologia complexa, de elevada incidência, com resposta individual variada e que afeta negativamente a vida do animal e do seu tutor. Exige uma terapêutica adequada e adaptada a cada animal e durante um longo período de tempo.

Os resultados obtidos mostraram um aumento das concentrações séricas de IL-17 em cães com DAC e a sua diminuição ao longo do período de tratamento em estudo. Considerando estes resultados e o envolvimento da IL-17 na inflamação cutânea na DAC, sugere-se o possível desenvolvimento de novas opções terapêuticas baseadas neste potencial alvo terapêutico.

Agradecimentos

Este estudo foi financiado pela Associação Cognitória Vasco da Gama/ Escola Universitária Vasco da Gama, através da atribuição de Bolsa de Estágio Curricular, no âmbito da candidatura do ano letivo 2022-2023.

Os autores agradecem a participação do Hospital Veterinário Universitário de Coimbra, do Hospital Veterinário de Coimbra e do Hospital Veterinário do Porto. Um especial agradecimento à Professora Doutora Ana Catarina Figueira, à Dr.^a Diana Ferreira e à Dr.^a Filipa Fernandes pelo apoio na concretização deste estudo.

Referências bibliográficas

- Agência Europeia do Medicamento. (2013). *Resumo das características do medicamento*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/apoquel-epar-product-information_pt.pdf
- Agência Europeia do Medicamento. (2017). *Resumo das características do medicamento*. https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/cytopoint-epar-product-information_pt.pdf
- Asahina, R., Kamishina, H., Kamishina, H., & Maeda, S. (2015). Gene transcription of pro-inflammatory cytokines and chemokines induced by IL-17A in canine keratinocytes. *Veterinary Dermatology*, 26(6), 426-e100. <https://doi.org/10.1111/vde.12244>
- Banovic, F., Tarigo, J., Gordon, H., Barber, J. P., & Gogal, R. M. (2019). Immunomodulatory in vitro effects of oclacitinib on canine T-cell proliferation and cytokine production. *Veterinary Dermatology*, 30(1), 17-e6. <https://doi.org/10.1111/vde.12698>
- Bradley, C. W., Morris, D. O., Rankin, S. C., Cain, C. L., Misic, A. M., Houser, T., Mauldin, E. A., & Grice, E. A. (2016). Longitudinal Evaluation of the Skin Microbiome and Association with Microenvironment and Treatment in Canine Atopic Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(6), 1182–1190. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.01.023>
- Bruet, V., Mosca, M., Briand, A., Bourdeau, P., Pin, D., Cochet-Faivre, N., & Cadiergues, M.-C. (2022). Clinical Guidelines for the Use of Antipruritic Drugs in the Control of the Most Frequent Pruritic Skin Diseases in Dogs. *Veterinary Sciences*, 9(4), 149. <https://doi.org/10.3390/vetsci9040149>
- Chaudhary, S. K., Singh, S. K., Kumari, P., Kanwal, S., Soman, S. P., Choudhury, S., & Garg, S. K. (2019). Alterations in circulating concentrations of IL -17, IL -31 and total IgE in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 30(5), 383. <https://doi.org/10.1111/vde.12762>
- Cosgrove, S. B., Cleaver, D. M., King, V. L., Gilmer, A. R., Daniels, A. E., Wren, J. A., & Stegemann, M. R. (2015). Long-term compassionate use of oclacitinib in dogs with atopic and allergic skin disease: safety, efficacy and quality of life. *Veterinary Dermatology*, 26(3), 171. <https://doi.org/10.1111/vde.12194>
- 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(5), 479. <https://doi.org/10.1111/vde.12047>
- Cosgrove, S. B., Wren, J. A., Cleaver, D. M., Walsh, K. F., Follis, S. I., King, V. I., Tena, J. S., & Stegemann, M. R. (2013). A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the Janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel ®) in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 24(6), 587. <https://doi.org/10.1111/vde.12088>
- Cuq, B., Blois, S. L., Bédard, C., Wood, R. D., Abrams-Ogg, A. C., Beauchamp, G., & Wood, G. A. (2021). Serum interleukin 17 concentrations in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 35(1), 217–225. <https://doi.org/10.1111/jvim.15977>
- Favrot, C. (2013). Clinical Signs of Canine Atopic Dermatitis. In *Veterinary Allergy* (pp. 65–69). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118738818.ch9>

- Favrot, C., Linek, M., Mueller, R., & Zini, E. (2010). Development of a questionnaire to assess the impact of atopic dermatitis on health-related quality of life of affected dogs and their owners. *Veterinary Dermatology*, 21(1), 64–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00781.x>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00758.x>
- Fleck, T. J., Norris, L. R., Mahabir, S., Walters, R. R., Martinon, O., Dunham, S. A., & Gonzales, A. J. (2021a). Onset and duration of action of lokivetmab in a canine model of IL-31 induced pruritus. *Veterinary Dermatology*, 32(6), 681. <https://doi.org/10.1111/vde.12943>
- Fleck, T. J., Norris, L. R., Mahabir, S., Walters, R. R., Martinon, O., Dunham, S. A., & Gonzales, A. J. (2021b). Onset and duration of action of lokivetmab in a canine model of IL-31 induced pruritus. *Veterinary Dermatology*, 32(6), 681. <https://doi.org/10.1111/vde.12943>
- Friedman, M. (1937). The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variance. In *Journal of the American Statistical Association* (20th ed., Vol. 32, pp. 675–701).
- Früh, S. P., Saikia, M., Eule, J., Mazulis, C. A., Miller, J. E., Cowulich, J. M., Oyesola, O. O., Webb, L. M., Peng, S. A., Cubitt, R. L., Danko, C. G., Miller, W. H., & Tait Wojno, E. D. (2020). Elevated circulating Th2 but not group 2 innate lymphoid cell responses characterize canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 221, 110015. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2020.110015>
- 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. <https://doi.org/10.1111/vde.12166>
- Gedon, N. K. Y., & Mueller, R. S. (2018). Atopic dermatitis in cats and dogs: a difficult disease for animals and owners. *Clinical and Translational Allergy*, 8(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s13601-018-0228-5>
- Gober, M., Hillier, A., Vasquez-Hidalgo, M. A., Amodie, D., & Mellencamp, M. A. (2022). Use of Cytoint in the Allergic Dog. *Frontiers in Veterinary Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.909776>
- Gonzales, A. J., Bowman, J. W., Fici, G. J., Zhang, M., Mann, D. W., & Mitton-Fry, M. (2014). Oclacitinib is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 37(4), 317–324. <https://doi.org/10.1111/jvp.12101>
- Gonzales, A. J., Fleck, T. J., Humphrey, W. R., Galvan, B. A., Aleo, M. M., Mahabir, S. P., Tena, J., 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. <https://doi.org/10.1111/vde.12280>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01098.x>

- Hensel, P., Santoro, D., Favrot, C., Hill, P., & Griffin, C. (2015). Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 196. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0515-5>
- Hill, P. B., Lau, P., & Rybníček, J. (2007). Development of an owner-assessed scale to measure the severity of pruritus in dogs. *Veterinary Dermatology*, 18(5), 301–308. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2007.00616.x>
- Krautmann, M., Walters, R. R., King, V. L., Esch, K., Mahabir, S. P., Gonzales, A., Dominowski, P. J., Sly, L., Mwangi, D., Foss, D. L., Rai, S., Messamore, J. E., Gagnon, G., Schoell, A., Dunham, S. A., & Martinon, O. M. (2023a). Laboratory safety evaluation of lokivetmab, a canine anti-interleukin-31 monoclonal antibody, in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 258. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2023.110574>
- Krautmann, M., Walters, R. R., King, V. L., Esch, K., Mahabir, S. P., Gonzales, A., Dominowski, P. J., Sly, L., Mwangi, D., Foss, D. L., Rai, S., Messamore, J. E., Gagnon, G., Schoell, A., Dunham, S. A., & Martinon, O. M. (2023b). Laboratory safety evaluation of lokivetmab, a canine anti-interleukin-31 monoclonal antibody, in dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 258, 110574. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2023.110574>
- Linek, 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), 456–462. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2010.00899.x>
- Little, P. R., King, V. L., Davis, K. R., Cosgrove, S. B., & Stegemann, M. R. (2015). A blinded, randomized clinical trial comparing the efficacy and safety of oclacitinib and ciclosporin for the control of atopic dermatitis in client-owned dogs. *Veterinary Dermatology*, 26(1), 23. <https://doi.org/10.1111/vde.12186>
- Margelidon-Cozzolino, V., Tscopoulos, A., Chenivresse, C., & de Nadai, P. (2022). Role of Th17 Cytokines in Airway Remodeling in Asthma and Therapy Perspectives. *Frontiers in Allergy*, 3. <https://doi.org/10.3389/falgy.2022.806391>
- Marsella, R. (2021). Advances in our understanding of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 32(6), 547. <https://doi.org/10.1111/vde.12965>
- 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. <https://doi.org/10.1111/vde.12500>
- Marsella, R., Olivry, T., & Carlotti, D.-N. (2011). Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 22(3), 239–248. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2011.00967.x>
- Marsella, R., Sousa, C. A., Gonzales, A. J., & Fadok, V. A. (2012). Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 241(2), 194–207. <https://doi.org/10.2460/javma.241.2.194>
- McCandless, E. E., Rugg, C. A., Fici, G. J., Messamore, J. E., Aleo, M. M., & Gonzales, A. J. (2014). Allergen-induced production of IL-31 by canine Th2 cells and identification of immune, skin, and neuronal target cells. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 157(1–2), 42–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2013.10.017>

- McKnight, P. E. ; J. N. (2010). Mann-Whitney U Test. In *The Corsini encyclopedia of psychology* .
- Michels, G. M., Ramsey, D. S., Walsh, K. F., Martinon, O. M., Mahabir, S. P., Hoevers, J. D., Walters, R. R., & Dunham, S. A. (2016). A blinded, randomized, placebo-controlled, dose determination trial of lokivetmab, a caninized, anti-canine IL -31 monoclonal antibody in client owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 27(6), 478. <https://doi.org/10.1111/vde.12376>
- Myers, L. ; M. J. ; S. (2004). Spearman correlation coefficients, differences between. In *Encyclopedia of statistical sciences* (Vol. 12).
- Nakajima, S., Kitoh, A., Egawa, G., Natsuaki, Y., Nakamizo, S., Moniaga, C. S., Otsuka, A., Honda, T., Hanakawa, S., Amano, W., Iwakura, Y., Nakae, S., Kubo, M., Miyachi, Y., & Kabashima, K. (2014). IL-17A as an Inducer for Th2 Immune Responses in Murine Atopic Dermatitis Models. *Journal of Investigative Dermatology*, 134(8), 2122–2130. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.51>
- Nornadiyah Mohd, R. Y. B. W. (2011). Power comparisons of Shapiro-Wilk, Kolmogorov-Smirnov, Lilliefors and Anderson-Darling tests. *Journal of Statistical Modeling and Analytics*, 2, 21–33.
- Olivry, T. (2011). Is the skin barrier abnormal in dogs with atopic dermatitis? *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(1–2), 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2011.07.014>
- Olivry, T., Mayhew, D., Paps, J. S., Linder, K. E., Peredo, C., Rajpal, D., Hofland, H., & Cote-Sierra, J. (2016). Early Activation of Th2/Th22 Inflammatory and Pruritogenic Pathways in Acute Canine Atopic Dermatitis Skin Lesions. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(10), 1961–1969. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.05.117>
- Outerbridge, C. A., & Jordan, T. J. M. (2021). Current Knowledge on Canine Atopic Dermatitis. *Advances in Small Animal Care*, 2, 101–115. <https://doi.org/10.1016/j.yasa.2021.07.004>
- Plant, J. D., Gortel, K., Kovalik, M., Polissar, N. L., & Neradilek, M. B. (2012). Development and validation of the Canine Atopic Dermatitis Lesion Index, a scale for the rapid scoring of lesion severity in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 23(6), 515-e103. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01113.x>
- 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), 115–122. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2008.00728.x>
- Rynhoud, H., Croton, C., Henry, G., Meler, E., Gibson, J. S., & Soares Magalhaes, R. J. (2022). The effects of oclacitinib treatment on antimicrobial usage in allergic dogs in primary practice: an Australia wide case-control study. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 151. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03255-y>
- Schober, P., Boer, C., & Schwarte, L. A. (2018). Correlation Coefficients: Appropriate Use and Interpretation. *Anesthesia & Analgesia*, 126(5), 1763–1768. <https://doi.org/10.1213/ANE.0000000000002864>
- Shiomitsu, S., Gillen, J., Frasca, S., & Santoro, D. (2021a). Evaluation of the cutaneous expression of IL-17, IL-22, IL-31, and their receptors in canine atopic dermatitis. *Research in Veterinary Science*, 136, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.12.015>
- Shiomitsu, S., Gillen, J., Frasca, S., & Santoro, D. (2021b). Evaluation of the cutaneous expression of IL-17, IL-22, IL-31, and their receptors in canine atopic dermatitis. *Research in Veterinary Science*, 136, 74–80. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2020.12.015>

- Souza, C. P., Rosychuk, R. A. W., Contreras, E. T., Schissler, J. R., & Simpson, A. C. (2018). A retrospective analysis of the use of lokivetmab in the management of allergic pruritus in a referral population of 135 dogs in the western USA. *Veterinary Dermatology*, 29(6), 489-e164. <https://doi.org/10.1111/vde.12682>
- Tamamoto-Mochizuki, C., & Olivry, T. (2021). IL-31 and IL-31 receptor expression in acute experimental canine atopic dermatitis skin lesions. *Veterinary Dermatology*, 32(6), 631. <https://doi.org/10.1111/vde.13034>
- Tamamoto-Mochizuki, C., Paps, J. S., & Olivry, T. (2019). Proactive maintenance therapy of canine atopic dermatitis with the anti- IL-31 lokivetmab. Can a monoclonal antibody blocking a single cytokine prevent allergy flares? *Veterinary Dermatology*, 30(2), 98-e26. <https://doi.org/10.1111/vde.12715>
- van Brussel, L., Moyaert, H., Escalada, M., Mahabir, S. P., & Stegemann, M. R. (2021). A masked, randomised clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to saline control in client-owned dogs with allergic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 32(5), 477. <https://doi.org/10.1111/vde.12984>
- Visser, M., Walsh, K., King, V., Sture, G., & Caneva, L. (2022). Acceptance of oclacitinib maleate (Apoquel®) chewable tablets in client-owned dogs with allergic and atopic dermatitis. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 103. <https://doi.org/10.1186/s12917-022-03210-x>
- W. Nordstokke, D. D. Z. B. (2010). A New Nonparametric Levene Test for Equal Variances. *Psicológica*, 31, 401–430.
- Young, A. J., Torres, S. M. F., Koch, S. N., Eisenschenk, M. N. C., & Rendahl, A. K. (2019). Canine Pruritus Visual Analog Scale: how does it capture owners' perception of their pet's itching level? *Veterinary Dermatology*, 30(5), 377. <https://doi.org/10.1111/vde.12761>
- Zenobia, C., & Hajishengallis, G. (2015). Basic biology and role of interleukin-17 in immunity and inflammation. *Periodontology*, 69(1), 142–159. <https://doi.org/10.1111/prd.12083>
- Zoetis. (2020). *About Cytopoint*. <https://www.cytopoint.com/about-cytopoint>

ANEXOS

Anexo 1 – Consentimento informado assinado pelos tutores

ANEXO 1: CONSENTIMENTO INFORMADO

Caro Proprietário(a),

O presente documento serve para solicitar a sua participação num estudo realizado no âmbito da dissertação do Estágio Curricular do Ciclo de Estudos Integrado Conducente ao Grau de Mestre em Medicina Veterinária, na Escola Universitária Vasco da Gama, em parceria com o Hospital Veterinário Universitário de Coimbra, Hospital Veterinário de Coimbra e o Hospital Veterinário do Porto.

O objetivo principal é avaliar os efeitos das interleucinas 17 e 31 em cães com dermatite atópica sob tratamento com oclacitinib e lokivetmab, para avaliar a eficácia destes dois fármacos nesta patologia. A realização deste estudo constituirá um importante contributo, quer para um melhor conhecimento da doença, quer para o desenvolvimento de novas terapêuticas.

Neste sentido solicitamos a sua colaboração através da autorização para que sejam realizadas análises sanguíneas, sem qualquer custo. A análise de sangue é um procedimento que consiste na recolha de 3 ml sangue que se destinam à realização de um hemograma de controlo e para análise das concentrações de interleucina 17 e 31 para correlação com a resposta ao tratamento.

Esta análise será realizada em 3 momentos distintos, antes do início do tratamento, 1 mês após o início do tratamento e dois meses após o início do tratamento.

Este procedimento não representa qualquer risco para o seu animal.

Mais solicitamos a sua colaboração no preenchimento deste consentimento, bem como alguns dados que se destinam exclusivamente aos fins académicos explicitados, sendo que a confidencialidade e anonimato dos mesmos é assegurada.

É de referir que poderá, em qualquer momento, retirar o seu animal do estudo. Agradecemos pela sua colaboração.

Este estudo será realizado sob orientação científica da Prof. Dra. Anabela Almeida, da Dra. Andreia Freire e da Dra. Diana Ferreira.

O Orientador:

Prof. Dra. Anabela Almeida

Assinado por: **Anabela Maduro de Almeida**
Francisco

Num. de identificação: B109638781

Data: 2022.12.12 17:43:59+00'00'

O Investigador/Estudante:

Patrícia Lopes



Patrícia Alexandra Melo Lopes

(Estudante de Medicina Veterinária, EUVG)

Procedimento: Análises Sanguíneas	
Responsáveis do Estudo:	
Patrícia Lopes (Estudante de Medicina Veterinária, EUVG)	
CAMV:	MV responsável:
Animal:	Tutor:
Declaro e asseguro ser o tutor (ou representante autorizado) do animal e ter lido e compreendido este documento, bem como os objetivos do estudo. Foi-me garantida a possibilidade de, em qualquer altura, recusar participar neste estudo. Desta forma, autorizo a participação neste estudo e permito a utilização dos dados que de forma voluntária forneço, confiando em que apenas serão utilizados para propósitos de estudos relevantes, sem que, em momento algum, tais dados sejam tratados de forma individual. Serão sempre representativos de um grupo, enquanto amostra. Por favor, leia com atenção todo o conteúdo deste documento. Não hesite em solicitar mais informações ao Médico Veterinário. Indique o primeiro e último nome: _____ Indique o seu e-mail (opcional): _____ @ _____ Indique o seu número de telemóvel (opcional): _____ Data: ____/____/____ Assinatura conforme C.C/ B.I: _____	

Anexo 2 – Critérios de Favrot (mínimo 5 critérios de inclusão)

1. Início dos sinais clínicos antes dos 3 anos de idade
2. Cães indoor maioritariamente
3. Prurido responsivo a glucocorticoides
4. Prurido como sinal inicial
5. Membros anteriores afetados
6. Pavilhões auriculares afetados
7. Margens dos pavilhões auriculares não afetados
8. Área dorso-lombar não afetada

Anexo 3 – Ficha de identificação de pacientes

Identificação do paciente nº _____

Nome: _____ Idade (1 a 8A): _____ Macho Fêmea

1. Anamnese:

Exame físico dentro dos parâmetros normais

Estado mental- Alerta

Temperatura- <39,2

Mucosas rosadas

Frequência respiratória e cardíaca normal

2. Critérios de inclusão:

Desparasitação externa Princípio ativo _____

Dieta hipoalergénica/caseira

Apresentação clínica sugestiva (Critérios de Favrot)

(mínimo 5 critérios de inclusão, selecionar com x)

1. Início dos sinais clínicos antes dos 3 anos de idade	
2. Cães indoor maioritariamente	
3. Prurido responsivo a glucocorticoides	
4. Prurido como sinal inicial	
5. Membros anteriores afetados	
6. Pavilhões auriculares afetados	
7. Margens dos pavilhões auriculares não afetados	
8. Área dorso-lombar não afetada	

Não foi submetido a terapêutica anti-inflamatória/imunomoduladora, sistémica e/ou tópica no mês anterior

Não tem outra condição patológica que requer controlo farmacológico

Não alterou no último mês o tratamento tópico como a aplicação de champôs, antiparasitários e ASIT

Consentimento assinado

Observações: _____

T0 - Primeira consulta

Exame físico dentro dos parâmetros normais

CADLI: índice de lesões da dermatite atópica canina

Adquirir pontuação a cada indicador, integrando a severidade e extensão da lesão. 0=nada; 1= suave; 2,3=moderado; 4,5= severo a extensas lesões

Região do corpo	Eritema Escoriação Erosão 0-5	Alopecia Liquenificação Hiperpigmentação 0-5
Cabeça e pavilhões auriculares		
Membros anteriores		
Membros posteriores		
Tórax ventral e zonas axilares		
Abdómen ventral e zona inguinal		
Subtotal 0-25		
Total 0-50		

- Escala analógica visual do prurido:

10/9- Prurido extremo (Severo e continuo prurido) - O cão não para de se coçar independentemente do sítio e precisa de ser impedido de coçar-se	
8/7- Prurido severo (Episódios prolongados) - O prurido interrompe o cão de dormir, comer, brincar, passear, ou seja, continua mesmo quando o cão está distraído.	
6/5- Prurido moderado (Episódios frequentes) - O cão coça-se periodicamente, mas não quando está a comer, brincar, passear ou está distraído. Quando observado ocorre à noite.	
3/4 – Prurido suave (Episódios semi-frequentes) - O cão não se coça quando está a comer, brincar, passear ou está distraído.	
1/2 – Prurido muito suave (Episódios ocasionais) - O cão coça-se pouco, que tutor considera normal.	
0- Cão normal, prurido não é um problema.	

Registo fotográfico

Recolha de sangue: Hemograma e armazenamento 1,5 ml soro a -20°C

Início do tratamento com oclacitinib durante 1 mês **dose:**_____

Início do tratamento com lokivetmab mensal _ _____ **mg**

Observações: _____

T1 - Segunda consulta: reavaliação 1 mês após T0

Exame físico dentro dos parâmetros normais

CADLI: índice de lesões da dermatite atópica canina

Adquirir pontuação a cada indicador, integrando a severidade e extensão da lesão. 0=nada; 1= suave; 2,3=moderado; 4,5= severo a extensas lesões

	Eritema Escoriação	Alopecia Liquenificação
--	-------------------------------	------------------------------------

Região do corpo	Erosão 0-5	Hiperpigmentação 0-5
Cabeça e pavilhões auriculares		
Membros anteriores		
Membros posteriores		
Tórax ventral e zonas axilares		
Abdómen ventral e zona inguinal		
Subtotal 0-25		
Total 0-50		

- Escala analógica visual do prurido:

10/9- Prurido extremo (Severo e continuo prurido) - O cão não para de se coçar independentemente do sítio e precisa de ser impedido de coçar-se	
8/7- Prurido severo (Episódios prolongados) - O prurido interrompe o cão de dormir, comer, brincar, passear, ou seja, continua mesmo quando o cão está distraído.	
6/5- Prurido moderado (Episódios frequentes) - O cão coça-se periodicamente, mas não quando está a comer, brincar, passear ou está distraído. Quando observado ocorre à noite.	
3/4 – Prurido suave (Episódios semi-frequentes) - O cão não se coça quando está a comer, brincar, passear ou está distraído.	
1/2 – Prurido muito suave (Episódios ocasionais) - O cão coça-se pouco, que tutor considera normal.	
0- Cão normal, prurido não é um problema.	

Registo fotográfico

Recolha de sangue: Hemograma e armazenamento 1,5 ml soro a -20°C

Continuação do tratamento com oclacitinib durante 1 mês dose: _____

Continuação do tratamento com lokivetmab mensal _____ mg

Observações: _____

T2 – Terceira consulta: reavaliação 2 meses após T0

Exame físico dentro dos parâmetros normais

CADLI: índice de lesões da dermatite atópica canina

Adquirir pontuação a cada indicador, integrando a severidade e extensão da lesão. 0=nada; 1= suave; 2,3=moderado; 4,5= severo a extensas lesões

Região do corpo	Eritema Escoriação Erosão 0-5	Alopecia Liquenificação Hiperpigmentação 0-5
Cabeça e pavilhões auriculares		
Membros anteriores		
Membros posteriores		
Tórax ventral e zonas axilares		
Abdómen ventral e zona inguinal		
Subtotal 0-25		
Total 0-50		

- Escala analógica visual do prurido:

10/9- Prurido extremo (Severo e continuo prurido) - O cão não para de se coçar independentemente do sítio e precisa de ser impedido de coçar-se	
8/7- Prurido severo (Episódios prolongados) - O prurido interrompe o cão de dormir, comer, brincar, passear, ou seja, continua mesmo quando o cão está distraído.	
6/5- Prurido moderado (Episódios frequentes) - O cão coça-se periodicamente, mas não quando está a comer, brincar, passear ou está distraído. Quando observado ocorre à noite.	
3/4 – Prurido suave (Episódios semi-frequentes) - O cão não se coça quando está a comer, brincar, passear ou está distraído.	
1/2 – Prurido muito suave (Episódios ocasionais) - O cão coça-se pouco, que tutor considera normal.	
0- Cão normal, prurido não é um problema.	

Registo fotográfico

Recolha de sangue: Hemograma e armazenamento 1,5 ml soro a -20°C

Observações: _____

Anexo 4 – Comparação estatística entre as variáveis e os dois grupos de tratamento.

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Peso T0 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,283 a	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of Peso T1 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,570 a	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of Peso T2 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,683 a	Retain the null hypothesis.
4	The distribution of Prurido T0 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,808 a	Retain the null hypothesis.
5	The distribution of Prurido T1 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,570 a	Retain the null hypothesis.
6	The distribution of Prurido T2 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,808 a	Retain the null hypothesis.
7	The distribution of Lesões T0 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,109 a	Retain the null hypothesis.
8	The distribution of Lesões T1 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,683 a	Retain the null hypothesis.

9	The distribution of Lesões T2 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,461 a	Retain the null hypothesis.
10	The distribution of IL 17 T0 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,683 a	Retain the null hypothesis.
11	The distribution of IL 17 T1 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,073 a	Retain the null hypothesis.
12	The distribution of IL 17 T2 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,648 a	Retain the null hypothesis.
13	The distribution of IL 31 T0 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	1,00 0 ^a	Retain the null hypothesis.
14	The distribution of IL 31 T1 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,762 a	Retain the null hypothesis.
15	The distribution of IL 31 T2 is the same across categories of Medicação usada 0-oclacitinib 1-lokivetmab.	Independent-Samples Mann-Whitney U Test	,262 a	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is ,050.

a. Exact significance is displayed for this test.

Anexo 5 – Registo fotográfico representativo das lesões em T0, T1 e T2 respetivamente.



As figuras **A, B e C**: representam o T0, T1 e T2, respetivamente do Animal 9. Observa-se a diminuição das lesões, caracterizadas por eritema, escoriação, liquenificação e hiperpigmentação ao nível abdominal ventral e da zona inguinal.

As figuras **D, E e F**: representam o T0, T1 e T2, respetivamente do Animal 9. Observa-se a diminuição das lesões nas zonas com eritema, escoriação, erosão e alopecia dos membros anteriores.

Anexo 6 – Posologia utilizada na terapêutica com lokivetmab (Cytoint®).

Peso do cão em kg	Apresentação de CYTOPOINT			
	10 mg	20 mg	30 mg	40 mg
2,3 a 4,5	1 frasco			
4,6 a 9,1		1 frasco		
9,2 a 13,6			1 frasco	
13,7 a 18,1				1 frasco
18,2 a 22,7	1 frasco +			1 frasco
22,8 a 27,2		1 frasco +		1 frasco
27,3 a 31,7			1 frasco +	1 frasco
31,8 a 36,3				2 frascos
36,4 a 40,8	1 frasco +			2 frascos
40,9 a 45,4		1 frasco +		2 frascos

Retirado de (Zoetis, 2020).