

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
ÁREA DO CONHECIMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL**

MÔNICA CABRAL CARDOSO

**USO ORAL DE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG ASSOCIADO A OCLACITINIB EM CÃES COM
DERMATITE ATÓPICA CANINA**

CAXIAS DO SUL

2024

MÔNICA CABRAL CARDOSO

**USO ORAL DE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG ASSOCIADO AO OCLACITINIB EM CÃES COM
DERMATITE ATÓPICA CANINA**

Dissertação apresentada à Universidade de
Caxias do Sul – Programa de Pós-Graduação em
Saúde Animal, para obtenção do Título de
Mestre em Saúde Animal.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador(a):

Prof. MSc PhD André Felipe Streck

CAXIAS DO SUL

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
Sistema de Bibliotecas UCS - Processamento Técnico

C268u Cardoso, Mônica Cabral

Uso oral de *Lactobacillus rhamnosus* GG associado ao oclacitinib em cães com dermatite atópica canina [recurso eletrônico] / Mônica Cabral Cardoso. – 2024.

Dados eletrônicos.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal, 2024.

Orientação: André Felipe Streck.

Modo de acesso: World Wide Web

Disponível em: <https://repositorio.ucs.br>

1. Cães - Doenças. 2. Dermatite atópica. 3. Alergia. 4. Probióticos. I. Streck, André Felipe, orient. II. Título.

CDU 2. ed.: 591.619:636.7

Catalogação na fonte elaborada pela(o) bibliotecária(o)
Carolina Machado Quadros - CRB 10/2236

MÔNICA CABRAL CARDOSO

**USO ORAL DE LACTOBACILLUS RHAMNOSUS GG ASSOCIADO AO OCLACITINIB EM CÃES COM
DERMATITE ATÓPICA CANINA**

Dissertação apresentada à Universidade de
Caxias do Sul – Programa de Pós-Graduação em
Saúde Animal, para obtenção do Título de
Mestre em Saúde Animal.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. MSc PhD André Felipe Streck
Universidade de Caxias do Sul

Aprovado em _____ de _____ de 20 _____

Banca Examinadora

Prof(a). MSc PhD Flávia Clare Goulart de Carvalho
UNIFAA – Centro Universitário de Valença

Prof. MSc. Gustavo Brambatti
Universidade de Caxias do Sul

Prof(a). MSc. Rita de Cássia Carmona de Castro
Filiação: Universidade Anhembi Morumbi

Dedico essa pesquisa a todos os cães e gatos que durante esses quinze anos de profissão, auxiliaram-me a identificar o real propósito da minha vida profissional. Hoje entendo que além de cuidar desses seres incríveis, estou aqui nesta vida para buscar respostas. Encontrar alternativas que devolvam a qualidade de vida através de terapias ainda não identificadas ou comprovadas cientificamente, para todas as espécies. Minha gratidão a todos os meus pacientes.

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido Ramon, os mais sinceros agradecimentos por todo amor, apoio e paciência. Seu entusiasmo e estímulo para o meu crescimento foram fundamentais para que reconhecesse quem realmente sou. Em muitos momentos você acreditou mais em mim do que eu mesma. Jamais esquecerei suas palavras que diziam: você precisa fazer um Mestrado! Hoje estamos colhendo juntos os frutos de um grande projeto, graças a nós dois. Este título também é seu meu amor.

A minha querida família: Pai, Mãe, Mari e Thi meu agradecimento por sempre apoiarem meus sonhos e por entenderem minha ausência em alguns momentos.

A todos os meus Pets: Gato Preto, Pipita, Rebeca, Amanda, Pipoca, Myrthes boy, Gisele e Gaspar, por me ensinarem desde muito cedo o que é amor incondicional.

Ao querido orientador Professor André, meu agradecimento pela confiança e por toda a sua dedicação e carinho comigo nestes dois anos, eu não poderia ter um orientador melhor.

Obrigada aos membros da banca, professores e colegas queridos MSc PhD Flávia, MSc Rita e MSc Gustavo que aceitaram com alegria fazer parte deste dia e contribuir com este estudo. Vocês são grandes referências para mim e sinto-me honrada em tê-los comigo.

As queridas Marina Cabral, Thamiris Lopes e Cristiane Deon pelo apoio neste trabalho e de muitas outras publicações que fizemos e faremos em conjunto, eu vejo um futuro promissor para todas nós.

Aos 40 pacientes e 40 tutores que fizeram parte deste estudo, minha eterna gratidão pela amizade, confiança e carinho.

As empresas Formula Bichos®, Soft Care®, Vetlog distribuidora® e Zoetis® pelo apoio e mimos para os pacientes e tutores deste estudo.

“A distinção entre passado, presente e futuro é apenas uma ilusão teimosamente persistente”.

(ALBERT EINSTEIN)

RESUMO

A dermatite atópica canina (DAC) é uma doença inflamatória crônica influenciada pela interação de fatores genéticos e ambientais. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia da associação de oclacitinib e *Lactobacillus rhamnosus* GG oral na redução da gravidade das lesões cutâneas e do prurido em cães com diagnóstico de DAC. Foram selecionados 40 cães de propriedade privada, não sazonalmente atópicos, submetidos a tratamento com oclacitinib durante pelo menos quatro meses. Os animais foram divididos em dois grupos aleatórios, duplamente cegos, de vinte indivíduos: um recebeu *L. rhamnosus* GG e o outro placebo. Os sinais clínicos foram avaliados através da escala CADESI-04 e do escore de prurido relatado pelo proprietário (pVAS) nos dias 0, 45 e 90. A análise estatística revelou reduções significativas nas pontuações CADESI-04 no grupo de teste no dia 45 ($p = 0,049$) e no dia 90 ($p = 0,049$) em comparação com o grupo placebo. As pontuações pVAS também tiveram reduções significativas no grupo de teste no dia 45 ($p < 0,01$). Não foram observados efeitos adversos durante o estudo. Os resultados demonstraram o potencial benefício clínico do *L. rhamnosus* GG quando combinado com o oclacitinib no tratamento da DAC. No entanto, estudos futuros com períodos de acompanhamento mais longos e grupos de participantes mais extensos e diversificados poderiam validar a eficácia e segurança desta abordagem de tratamento.

Palavras-chave: alergia; microbioma; probiótico; oclacitinib; cão.

ABSTRACT

Canine atopic dermatitis (CAD) is a chronic inflammatory disease influenced by the interaction of genetic and environmental factors. The aim of this study was to evaluate the efficacy of the combination of oclacitinib and oral *Lactobacillus rhamnosus* GG in reducing the severity of skin lesions and pruritus in dogs diagnosed with ACD. Forty privately owned, non-seasonally atopic dogs undergoing treatment with oclacitinib for at least four months were selected. The animals were divided into two randomized, double-blind groups of twenty individuals: one received *L. rhamnosus* GG and the other placebo. Clinical signs were assessed using the CADESI-04 scale and the owner-reported pruritus score (pVAS) on days 0, 45 and 90. Statistical analysis revealed significant reductions in CADESI-04 scores in the test group on day 45 ($p = 0.049$) and day 90 ($p = 0.049$) compared to the placebo group. The pVAS scores also had significant reductions in the test group on day 45 ($p < 0.01$). No adverse effects were observed during the study. The results demonstrated the potential clinical benefit of *L. rhamnosus* GG when combined with oclacitinib in the treatment of CAD. However, future studies with longer follow-up periods and more extensive and diverse participant groups could validate the efficacy and safety of this treatment approach.

Keywords: allergy; microbiome; probiotic; oclacitinib; dog.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Silhuetas de boxers atópicos, pastor alemão, golden retrievers, shar peis, dálmatas, labradores retriever, buldogues franceses, West Highland white terriers e Jack Russell terriers (nesta ordem). 25
- Figura 2 - Eritema e descamação em face interna de pavilhão auricular (A). Eritema em região interdigital (B), abdômen (C) e região torácica lateral (D) 26
- Figura 3 - Alopecia e melanodermia em região torácica lateral (A), melanodermia em face interna de pavilhão auricular (B), crostas melicéricas em dobra facial (C), eritema e escoriação por autotrauma em região interdigital (D) 21
- Figura 4 - Locais corporais avaliados na dermatite atópica canina 28
- Figura 5 - pVAS com graduação de 0 a 10 28
- Figura 6 A-B - Frascos idênticos de coloração âmbar, identificação por números 41
- Figura 7 - Imagens do aplicativo Atopic Index – Hills®. Tela de entrada do aplicativo (A), tela de cadastro do paciente (B), tela final de avaliação do paciente (C) 42
- Figura 8 - Escala analógica visual para controle de prurido (pVAS) 43

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Comparação de médias de CADESI – 04 entre grupos placebo e intervenção para os dias D0, D45 E D90 46
- Gráfico 2 - Comparação de médias de pVAS entre grupos placebo e intervenção para os dias D0, D45 E D90 47

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Identificação de microrganismos probióticos | 32 |
| Tabela 2 - Raça, sexo, idade, peso e estado reprodutivo e recebimento de <i>L. rhamnosus</i> GG ou não de cães atendidos durante o estudo | 40 |
| Tabela 3 - Avaliação – CADESI – 04 em D0, D45 e D90 – grupo intervenção | 45 |
| Tabela 4 - Avaliação – CADESI – 04 em D0, D45 e D90 – grupo placebo | 45 |
| Tabela 5 - Prurido conforme pVAS em D0, D45 e D90 – grupo intervenção | 47 |
| Tabela 6 - Prurido conforme pVAS em D0, D45 e D90 – grupo placebo | 48 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------|--|
| CAD | Canine atopic dermatitis |
| CADESI -04 | Índice de Extensão e Gravidade da Dermatite Atópica Canina |
| COSCAD 18 | Core outcome set for canine atopic dermatitis |
| D0 | Dia zero |
| D45 | Dia quarenta e cinco |
| D90 | Dia noventa |
| DA | Dermatite atópica |
| DAC | Dermatite atópica canina |
| DAPP | Dermatite alérgica a picada de pulgas |
| F2R | Receptor de trombina |
| GWAS | Genome-wide association study |
| IFN γ | Interferon gama |
| IgA | Imunoglobulina A |
| IgE | Imunoglobulina E |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IL2 | Interleucina 2 |
| IL4 | Interleucina 4 |
| IL5 | Interleucina 5 |
| IL6 | Interleucina 6 |
| IL10 | Interleucina 10 |
| IL12 | Interleucina 12 |
| IL13 | Interleucina 13 |
| IL17 | Interleucina 17 |
| IL-31 | Interleucina 31 |
| JAK1 | Janus quinase 1 |
| LGG | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG |
| L. rhamnosus GG | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG |
| MB | Megabase |
| miRNA | MicroRNA |
| PARs | Receptores ativados por proteases |
| PCR | Reação em Cadeia de Polimerase |

PIA51 Protein Inhibitor of Activated STAT 1
P2E4D Fosfodiesterase 4D
PIB Produto interno bruto
PKP2 Placofilina 2
pVAS Escala analógica visual de prurido
RORA RAR- related orphan receptor A
SCORAD Escore de Dermatite atópica
SH2B Adaptor protein 1
TGF-B Fator de transformação do crescimento beta
TLSP Linfopoetina estromal tímica
TNF- α Fator de necrose tumoral alfa
TGI Trato gastrointestinal
Th1 Linfócito T helper-1
Th2 Linfócito T helper-2
T reg Linfócitos T reguladores
TLR Receptor “toll like”
UFC Unidade formadora de colônia
UFCs Unidades formadoras de colônia
WHWTs West highland white terrier

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 17 |
| 2. OBJETIVOS | 19 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 19 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 19 |
| 3. REVISÃO DA LITERATURA | 20 |
| 3.1 DERMATITE ATÓPICA CANINA | 20 |
| 3.2 ETIOPATOGENIA | 20 |
| 3.2.1 Prevalência relacionada a raça | 20 |
| 3.2.2 Fatores genéticos | 20 |
| 3.2.3 Barreira cutanêa | 21 |
| 3.2.4 Sistema imune | 23 |
| 3.2.5 Alérgenos | 24 |
| 3.3 SINAIS CLÍNICOS | 25 |
| 3.4 DIAGNÓSTICO | 27 |
| 3.5 TRATAMENTO | 29 |
| 3.6 MICROBIOTA, MICROBIOMA E DISBIOSE | 29 |
| 3.6.1 Bactérias intestinais e saúde intestinal | 30 |
| 3.6.2 Microbioma intestinal de cães | 31 |
| 3.7 PROBIÓTICOS | 31 |
| 3.7.1 Probióticos na dermatite atópica humana | 33 |
| 3.7.2 Probióticos na dermatite atópica canina | 34 |
| 3.7.3 <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG | 35 |
| 4. METODOLOGIA | 37 |
| 4.1 ANIMAIS | 37 |
| 4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO | 38 |
| 4.3 CEPA PROBIÓTICA TESTADA | 39 |
| 4.4 IDENTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS – LACTOBACÍLLUS E PLACEBO | 39 |
| 4.5 GRUPOS | 41 |
| 4.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA | 41 |
| 4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 43 |
| 5. RESULTADOS | 44 |
| 5.1 CADESI – 04 | 44 |
| 5.2 PVAS | 46 |
| 6. DISCUSSÃO | 49 |

| | |
|--|-----------|
| 7. CONCLUSÕES | 53 |
| REFERÊNCIAS | 54 |
| APÊNDICES | |
| APÊNDICE A – AUTIRIZAÇÃO DO TUTOR | 63 |
| APÊNDICE B – TRABALHO SUBMETIDO A REVISTA VET DERMATOLOGY EM NOVEMBRO DE 2023 | 65 |
| ANEXOS | |
| ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO NA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS | 73 |

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é responsável pela segunda maior população de animais de estimação em todo o mundo, em que cães e gatos representam uma população de 58 e 27 milhões, respectivamente. Esse aumento da população de animais de estimação gera o fortalecimento do setor pet e hoje, representa 0,36% do Produto Interno Bruto (PIB) brasileiro, sendo o segundo maior mercado de produtos pet, ficando apenas atrás dos Estados Unidos (ABINPET, 2023).

O crescimento deste mercado é consequência do maior cuidado dos tutores com seus pets, uma vez que estes passaram a ser considerados como membros da família. Sendo assim, o bem-estar de animais de estimação influencia diretamente na qualidade de vida dos tutores, o que os torna cada vez mais exigentes em relação a condutas terapêuticas e medicações a serem utilizadas por seus pets (Rocha, 2015).

A dermatite atópica canina (DAC) é uma doença inflamatória multifatorial a qual envolve fatores como imunodeficiência, sensibilização alérgica, defeitos de barreira cutânea, colonização microbiana e fatores ambientais. É uma dermatose comum na rotina clínica, a qual muitas vezes é desafiadora para médicos veterinários e proprietários e, em muitos casos, afeta consideravelmente o bem-estar de tutores e seus animais (Noli, 2019; Nutall; Uri; Halliwell, 2013). Durante muitos anos, anti-histamínicos, ácidos graxos essenciais, glicocorticóides e as ciclosporinas foram utilizadas como principais terapias para a doença, algumas destas com importantes efeitos colaterais (Miller; Griffin; Campbell, 2013). Mais recentemente, foram lançadas opções mais seguras e eficazes para o tratamento do prurido alérgico, como o oclacitinib (Apoquel®), um inibidor da janus quinase e o lokivetmab (Cytopoint®), um anticorpo monoclonal caninizado, que se liga seletivamente e neutraliza a interleucina 31 (IL-31) (Cosgrove *et al.*, 2015; Michels *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2018).

Por ser a principal dermatopatia atendida na dermatologia veterinária, a DAC é alvo de vários estudos em que diversas moléculas são testadas como tratamento principal ou adjuvante no controle do prurido, algumas com efeitos bastante satisfatórios (Bensignor; Olivry, 2004; Loewinger *et al.*, 2022; Mcfadden *et al.*, 2017; Nagle *et al.*, 2001; Yasukawa *et al.*, 2010). Na medicina veterinária, estudos demonstraram que a exposição precoce aos probióticos têm efeitos clínicos e imunológicos benéficos a longo prazo. Entretanto, devido ao baixo número de trabalhos avaliando os efeitos de probióticos na DAC e avaliações muitas vezes limitadas por fatores de confusão, como diferentes dietas, ambientes e sensibilizações, estudos maiores são necessários para comprovar o efeito benéfico desta terapia (Marsella; De Benedetto, 2017;

Ohshima- Terada *et al.*, 2015; Osumi *et al.*, 2019; Yamazaki; Rosenkrantz; Griffin, 2019). Na medicina humana, os probióticos têm sido foco de estudos, uma vez que a modulação da microbiota intestinal do hospedeiro pode ser eficaz para prevenir e/ou tratar de doenças alérgicas, sendo uma suplementação com potencial de diminuir a gravidade da doença (Andrade *et al.*, 2022; Cukrowska *et al.*, 2021; D'ellios *et al.*, 2020; Lise; Mayer; Silveira, 2018; Umborowati *et al.*, 2022; Weston *et al.*, 2005).

Com base no possível efeito benéfico das terapias com probióticos, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito adjuvante de *Lactobacillus rhammnosus* GG associado ao oclacitinib em cães com dermatite atópica.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia clínica da associação do uso de oclacitinib associado ao *Lactobacillus rhamnosus* GG por via oral em cães diagnosticados com dermatite atópica canina.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Distribuir de forma duplo-cega *Lactobacillus rhamnosus* GG e placebo associado ao oclacitinib e avaliar os sinais clínicos e níveis de prurido dos cães usando o sistema de pontuação CADESI -04 e a escala pVAS.
2. Realizar análises estatísticas para determinar a eficácia do tratamento combinado de oclacitinib e *Lactobacillus rhamnosus* GG em cães com DAC, comparando os resultados entre o grupo intervenção e o grupo controle.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 DERMATITE ATÓPICA CANINA

A DAC é uma doença inflamatória hereditária da pele, geralmente pruriginosa e predominantemente causada por células T, envolvendo uma interação entre anormalidades da barreira cutânea, sensibilização a alérgenos e disbiose microbiana (Bizikova *et al.*, 2015).

3.2 ETIOPATOGENIA

A fisiopatologia da DAC é multifatorial e envolve fatores como genes de suscetibilidade, ambiente, microrganismos, defeitos primários ou secundários da função da barreira cutânea, bem como a resposta imunológica do animal acometido (Salzo; Castro, 2020).

3.2.1 Prevalência relacionada a raça

Na dermatologia veterinária, a DAC atinge cerca de 20 a 30% da população de cães (Marsella; Santoro; Ahrens, 2012) sendo os cães das raças buldogues francês e inglês, cocker spaniels, yorkshire terrier, lhasa apso, shih tzu, pug, bull terrier os mais comumente afetados, sugerindo a hipótese de que algumas raças possam ser mais predispostas (Jaeger *et al.*, 2010; Meury *et al.*, 2011; Miller; Griffin; Campbell, 2013). Atualmente as cinco raças: boxer, bulldog, labrador retriever, pug e west highland white terrier (WHWTs) são consideradas predispostas em todo o mundo, apesar desta predisposição possa ser alterada conforme a região (Mazrier *et al.*, 2016; Favrot *et al.*, 2020).

3.2.2 Fatores genéticos

Sabe-se que a DAC é uma doença hereditária e que em combinação com fatores ambientais irá determinar o risco de desenvolvimento da doença e o fenótipo clínico (Bizikova *et al.* 2015).

Análises genômicas sugeriram que vários genes que afetam a função imunológica e o desenvolvimento da pele estão envolvidos, e que existem diferenças nos genes relacionados a doença entre raças (Nutall *et al.*, 2019). Diferentes descobertas publicadas e relacionados ao

genoma, apresentam respostas conflitantes, e demonstram a dificuldade e a complexidade de identificar associações genéticas, em cortes de diferentes áreas geográficas dentro da mesma raça (Hensel *et al.*, 2024).

Uma pesquisa relacionada a ligação e associação genômica ampla (GWAS) por exemplo, identificou uma nova região genômica de 2,7 Mb no cromossomo canino 3, que inclui 17 genes. O gene F2R (receptor de trombina), foi identificado em wests atópicos e não atópicos (Aglar *et al.*, 2019). Outra pesquisa realizada na Austrália identificou uma região genômica diferente de 1,3 Mb no cromossomo canino 17, com um gene candidato não receptor da proteína tirosina fosfatase do tipo 22 (Roque *et al.*, 2012).

Um estudo no Reino Unido relacionado a filagrina demonstrou mutações em cães da raça labrador (Wood *et al.*, 2010), porém outros estudos não observaram estas mesmas mutações em cães da raça WHWTs (Salzmann *et al.*, 2011, Roque *et al.*, 2012).

Elevados níveis de IgE também demonstraram estar associados a GWAS nos cromossomos 5 e 35 (Roque *et al.*, 2011, Owczarek-Lipska *et al.*, 2012). O gene da placofilina 2 (PKP2) no cromossomo 27, também apresenta resultados conflitantes visto que sua expressão se demonstrou significativa no seu papel de barreira cutânea (Tengall *et al.*, 2013) e outro estudo posterior não observou diferenças na expressão de PKP2 entre cães com DA e animais saudáveis (Tengall *et al.*, 2020).

Os MicroRNAs (miRNA) foram identificados nos últimos anos e podem desempenhar um papel na regulação gênica em células imunes e queratinócitos no nível pós-transcricional. Os últimos estudos publicados a respeito dos potenciais biomarcadores genéticos da DAC são: miR-141, miR-187, miR-200a, miR-203, miR-215 e miR-429, e os genes PDE4D, PIAS1, RORA e SH2B1 (Kouri *et al.*, 2019, Morlang *et al.*, 2021).

3.2.3 Barreira cutânea

Em medicina veterinária, evidências apoiam a importância da disfunção da barreira cutânea na patogênese da DAC. A barreira cutânea, é composta por corneócitos do estrato córneo, circundados por lamelas organizadas de lipídeos contendo colesterol e seus ésteres, ácidos graxos livres e ceramidas. Quantidades diminuídas de ceramidas, expressão e distribuição alteradas de filagrina, em comparação com achados de pele de cães saudáveis, juntamente com defeitos ultra estruturais no estrato córneo, são indicativos de um defeito na barreira cutânea de cães com DA (Santoro *et al.*, 2015). Porém, se a disfunção da barreira

cutânea é um defeito primário e/ou aparece secundariamente a inflamação cutânea, ainda está aberto a debates (Santoro *et al.*, 2023).

Os queratinócitos, representam o principal tipo de célula formadora da epiderme. Incorporados ao cimento da camada lipídica que cobre cada corneócito, funcionando como um selo entre as células. As ceramidas fazem parte dos lipídeos que compõe a barreira cutânea, e tem sido investigada ao longo dos anos. Reduções na composição das ceramidas, tem sido atribuída em parte a uma resposta inflamatória, desencadeada pela exposição a alérgenos em indivíduos sensibilizados (Santoro *et al.*, 2015. Reiter; Torres; Wetz; 2009, Shimada *et al.*, 2009). Um estudo mais recente, investigou a abundância relativa de cada ceramida, conteúdo total e a organização no estrato córneo em cães saudáveis e atópicos, demonstrando uma diminuição na abundância relativa de ácidos graxos livres, e não de ceramidas ou colesterol e propõe que não exista uma diferença entre cães saudáveis e atópicos quanto ao conteúdo nem a abundancia de ceramidas, e sim de que a organização espacial e a composição de átomos de carbono da ceramida, podem ser tão importantes quanto a quantidade de ceramidas presentes no estrato córneo da pele atópica (Chermprapai *et al.*, 2018).

A filagrina, é a proteína estrutural mais extensivamente estudada associada na DA em humanos e cães. No entanto, estudos demonstraram o envolvimento de componentes estruturais adicionais na alteração da barreira cutânea na DA. Em particular interesse, são as alterações das junções estreitais e dos corneodesmossomos. Em medicina humana, o envolvimento de outras estruturas juncionais, tais como as junções comunicantes e aderentes, foi proposto como outra causa de ruptura de barreira cutânea na DA. Portanto, estudos recentes apontam para alterações estruturais mais complexas da barreira cutânea na DA, que vão além da filagrina e das ceramidas (Santoro *et al.*, 2023).

Os peptídeos antimicrobianos representam uma das mais importantes linhas de defesa contra a invasão microbiana. Além de sua poderosa ação antimicrobiana associada as suas moléculas imunomoduladoras, atuam como uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa (Santoro *et al.*, 2015). Uma atualização publicada no ano de 2023, demonstrou que a pele atópica apresenta uma desregulação na secreção, dispersão e provavelmente eficácia antimicrobiana (menor efeito inibitório antibacteriano) quando comparado a cães saudáveis. Sendo assim, o envolvimento dos peptídeos antimicrobianos, na patogênese das infecções cutâneas em cães com DA, pode não estar relacionados aos seus níveis, mas sim a suas funcionalidades e secreções (Santoro *et al.*, 2023).

3.2.4 Sistema Imune

A sensibilização na DAC, é iniciada quando a célula de Langerhans captura e internaliza alérgenos que são processados e empacotados em moléculas do complexo principal de histocompatibilidade, na superfície destas células e apresentadas as células T auxiliares (Th0) no linfonodo. As células dendríticas ativam as células T auxiliares, e as polarizam em direção ao fenótipo Th2, produzindo citocinas como IL-4 e IL-13. Essas citocinas, podem estimular as células B a se tornarem células plasmáticas, que começam a produzir IgE específica para alérgenos. Estas IgE específicas para alérgenos migram para a pele e também entram na circulação e em outros tecidos, e se ligam as células que expressam receptores de alta e baixa afinidade em sua superfície celular. Outras citocinas também associadas a esta fase são IL-5, IL-6 e IL-31 (Marsella *et al.*, 2012, Olivry *et al.*, 2016).

A progressão da DAC ocorre após a reexposição ao mesmo alérgeno, a célula epidérmica de Langerhans com IgE ligada a superfície celular migra para a derme. Estas células apresentam o alérgeno aos linfócitos t auxiliares, e continuam a polariza-los em direção ao fenótipo Th2. Citocinas Th2 adicionais como IL-31, podem ser liberadas e ativam o neurônio sensorial para induzir o prurido. Os alérgenos podem reticular a IgE específica do alérgenos, ligada a superfície dos mastócitos dérmicos, liberando mediadores inflamatórios como a histamina, serotonina e substancia P, além como fator quimiotático dos eosinófilos (Marsella *et al.*, 2012).

Toxinas microbianas liberadas por *Staphylococcus* sp. e *Malassézia* sp. ou alérgenos ambientais, são capazes de ativar queratinócitos e outras células imunes, a liberar citocinas pró inflamatórias e quimiocinas, podendo polarizar células T auxiliares em direção ao fenótipo Th1, onde são produzidas citocinas como interferon ($IFN\gamma$). Este interferon promove a ativação de células monócitos- macrófagos. Queratinócitos, monócitos e mastócitos ativados produzem citocinas pró-inflamatórias adicionais, como fator de necrose tumoral alfa ($TNF - \alpha$) -alfa, regulando positivamente a expressão de P- selectina e E- selectina, nas células endoteliais, recrutando assim mais leucócitos do sangue. A epiderme fica mais espessa, assim como o estrato córneo; A função da barreira piora, permitindo maior penetração do alérgeno; e o ciclo TLSP = linfopoetina estromal tímica. A inflamação crônica envolve além dos mediadores celulares Th1 e Th2 os mediadores Th17 e Th22 (Marsella *et al.*, 2012).

A presença de IgE alérgeno específico em animais afetados com a doença, é demonstrado em muitos estudos, porém alguns cães apresentam sinais clínicos de DAC sem

evidenciação destas imunoglobulinas em teste sorológico e intradérmico. Além disso, a participação de anticorpos do isótopo IgG alérgeno específico podem ser demonstrados tanto em animais sensibilizados experimentalmente quanto espontaneamente, demonstrando uma resposta imune bifásica de Th1 e Th2 (Pucheu- Haston *et al.*, 2015).

Sabe -se que citocinas e quimiocinas desempenham papéis centrais na patogênese da DAC. Uma atualização publicada no ano de 2024, revisou bancos de dados de citações on-line e procedimentos de reuniões internacionais sobre citocinas e quimiocinas relevantes para a DAC publicados entre 2015 e 2022. Os resultados destes estudos revelaram uma regulação positiva do eixo imunológico multipolar (Th1, Th17 e Th22), demonstrando que a DA não está envolvida exclusivamente por uma regulação positiva apenas por citocina Th2 (Mochizuki *et al.*, 2024)

3.2.5 Alérgenos

Há evidências convincentes de que o ambiente e seus componentes têm um papel importante na patogênese da DAC (Masuda *et al.*, 2000; Youn *et al.*, 2002). Muitos alérgenos ambientais estão envolvidos na doença, estando entre eles os pólenes de árvores, arbustos e gramíneas, a poeira doméstica, as fibras de tecidos, os restos celulares de animais e humanos, os fragmentos de insetos e os ácaros da poeira doméstica. Além disso, os esporos de fungos, os ácaros de armazenamento e outros alérgenos de menor frequência também são relatados (Hill; Deboer, 2001).

Alimentos também podem ser fatores desencadeantes para cães com DAC, e esses pacientes podem parecer indistinguíveis daqueles em que os sintomas são desencadeados por pólenes ou outros fatores ambientais (Miller; Griffin; Campbell, 2013). As principais fontes de proteínas relacionadas a reações adversas a alimentos são carne bovina, carne de frango, carne ovina, derivados lácteos, trigo e ovos (Mueller; Olivry; Prelaud, 2016).

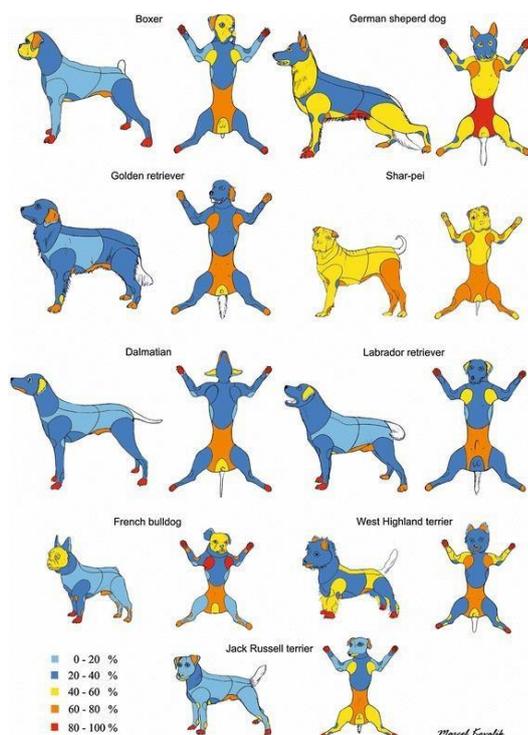
Cães com DAC podem apresentar uma hipersensibilidade a presença de antígenos bacterianos ou toxinas, apresentando contagens superficiais de organismos estafilocócicos maiores quando comparados a contagens em cães saudáveis (Mason; Lloyd, 1989; Morales; Schultz; Deboer, 1994). Além disso, antígenos de leveduras lipofílicas do gênero *Malassezia* também podem causar hipersensibilidade em cães com DAC (Bond *et al.*, 2002; Miller; Griffin; Campbell, 2013).

3.3 SINAIS CLÍNICOS

Os primeiros sinais clínicos desta doença podem surgir em cães de seis meses a seis anos, sendo mais comum em animais entre um e três anos. O prurido é a característica principal da DAC que pode incluir coçar, esfregar, mastigar ou lambe excessivamente, correr e/ou balançar a cabeça. Dependendo dos alérgenos envolvidos, o prurido pode ser sazonal (por exemplo, pólen) ou não sazonal (por exemplo, ácaros, alimentos) (Zur *et al.*, 2002).

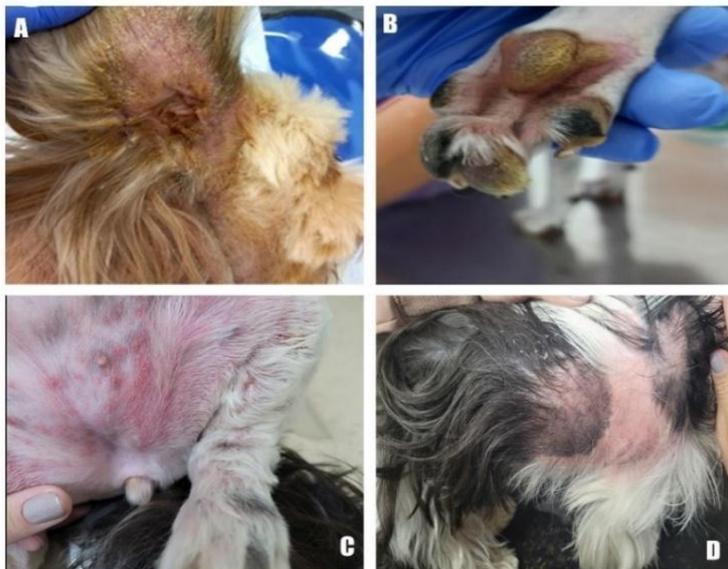
Como sinais clínicos, eritema e prurido podem ser observados acometendo principalmente a região interdigital, flancos, abdômen, axilas, face e orelhas. No entanto hoje sabe-se, que existem variações associadas a raça e locais afetados pela DAC (Figura 1) (Wilhem, Hovalik, Favrot 2012). O prurido geralmente resulta em autotrauma, levando a lesões secundárias como escoriações, crostas, hiperpigmentação e alopecia (Figura 2 e 3). Nestes casos, é comum encontrar infecções secundárias como as causadas por bactérias ou *Malassezia* (Keith; Patterson, 2016; Miller; Griffin; Campbell, 2013).

Figura 1 - Silhuetas de boxers atópicos, pastor alemão, golden retrievers, shar peis, dálmatas, labradores retriever, buldogues franceses, west highland white terriers e jack russell terriers (nesta ordem).



Fonte: adaptado de Hensel *et al.*, 2015.

Figura 2 - Eritema e descamação em face interna de pavilhão auricular (A), eritema em região interdigital (B), abdômen (C) e região torácica lateral (D).



Fonte: M.V Mônica Cabral e Cristiane Deon (2023).

Figura 3 - Alopecia e melanodermia em região torácica lateral (A), melanodermia em face interna de pavilhão auricular (B), crostas melicéricas em dobra facial (C), eritema e escoriação por autotrauma em região interdigital (D).



Fonte: M.V. Mônica Cabral e Cristiane Deon (2023).

3.4 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da DAC é clínico, sendo avaliados critérios que incluem o prurido com ou sem lesões, infecções crônicas ou recorrentes, estilo de vida intradomiciliar, patas frontais e regiões côncavas de pavilhões auriculares afetadas e prurido responsivo a administração de glicocorticoides (Favrot *et al.*, 2010).

Uma abordagem de 4 etapas, foi proposta para facilitar a identificação de doenças subjacentes em cães com prurido, e os fatores de exacerbação comuns na DA. As 4 principais causas de prurido são as infecções parasitárias, piodermite ou infecções fúngicas, alergia alimentar e dermatite atópica. Em um primeiro momento, considera-se a possibilidade de dermatite alérgica a pulgas. O segundo passo, é considerar a possibilidade de outros ectoparasitas que podem estar associados ao prurido como por exemplo a sarna sarcóptica, queiletielose, pediculose, trombiculíase e otococaríase, ou podem ser encontrados como uma doença concomitante por exemplo a demodicose. Em seguida, deve-se considerar a possibilidade de infecção estafilocócica e crescimento excessivo de *malassézia*. Finalmente, considerar o papel da reação alimentar adversa cutânea. Para que estes diagnósticos possam ser realizados, os métodos básicos para o descarte destas condições incluem pente fino nos pelos, encontrando pulgas ou fezes de pulgas, raspagem de pele, impressões com fita adesiva, reflexo oto pedal, análise de pelos, exame citológico da pele e ouvidos e teste de dieta de eliminação, cujo ingrediente o cão nunca tenha sido exposto antes. O tratamento e o controle de infecções cutâneas e infestações por ectoparasitas, permitirão avaliar qualquer coceira que ainda permaneça no paciente pruriginoso (Nutall *et al.*, 2019).

Escalas visuais validadas, podem ser utilizadas para avaliar o índice de extensão e gravidade da DAC, em que os principais sinais clínicos são avaliados e pontuados conforme a severidade. Entre elas estão a escala que avalia o Índice de Extensão e Gravidade da Dermatite Atópica Canina (CADESI-04) e a Escala Visual Analógica de Prurido (pVAS) (Hill; Lau; Rybnicek, 2007; Rybnicek *et al.*, 2009; Olivry *et al.*, 2014).

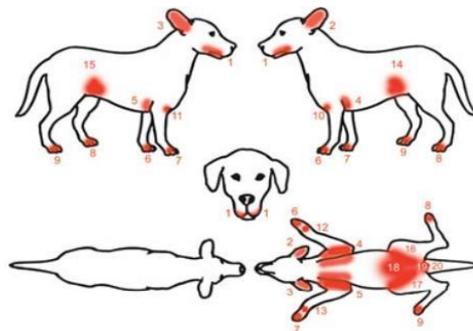
A escala CADESI-04, foi projetada para pontuar lesões de pele em locais específicos do corpo. Nessa escala é selecionado eritema (como marcador de inflamação aguda), liquenificação (como marcador de doença crônica) e a combinação de escoriação e alopecia como marcadores de prurido. Os locais corporais avaliados nesta escala encontram-se na figura 4 e incluem áreas de flexura, parte côncava de pavilhão auricular, região interdigital, entre

outros. O escore de gravidade possui 4 pontos consistindo em nenhum (pontuação 0), leve (escore 1), moderado (escore 2) e grave (escore 3) (Olivry *et al.*, 2014).

Já a pVAS, consiste em uma escala que avalia a gravidade do prurido de um cão através do ponto de vista do tutor. É utilizada como uma ferramenta valiosa para avaliação da resposta a tratamentos com medicamentos antipruriginosos. Nesta escala, os tutores analisam e marcam na escala visual analógica um ponto que descreve melhor o nível de prurido do seu cão. Para isso, uma folha contendo uma escala graduada de 0 a 10 (Figura 5) é fornecida para o tutor, permitindo a marcação no número relacionado ao grau de prurido do animal (Rybnicek *et al.*, 2009).

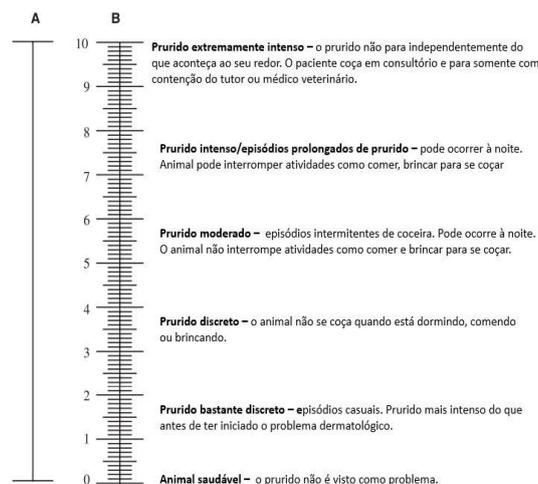
Os testes alérgicos devem ser utilizados somente após um diagnóstico clínico da DAC, com o objetivo principal de identificar potenciais alérgenos causadores, que podem ser evitados ou tratados com imunoterapia específica para alérgenos (Nutall *et al.*, 2019).

Figura 4 - Locais corporais avaliados na dermatite atópica canina



Fonte: Olivry *et al.* (2014).

Figura 5 - pVAS com graduação de 0 a 10 fornecida aos tutores.



Fonte: adaptado de Rybnicek *et al.* (2009).

3.5 TRATAMENTO

Por ser uma doença progressiva, os objetivos do tratamento da DAC são controlar precocemente, retardar o processo da doença, melhorar a qualidade de vida do paciente e de seus tutores, diminuir as crises alérgicas, minimizar o custo e os efeitos adversos da medicação e a complexidade dos regimes de tratamento (Nutall *et al.*, 2019).

Um maior cuidado com o manejo ambiental pode ser realizado, com finalidade de diminuir fatores desencadeantes da DAC. Glicorticóides orais, ciclosporina e maleato de oclacitinib são recomendados para o tratamento da DAC crônica, concomitantemente ou após o controle de fatores desencadeantes conhecidos. Banhos semanais com xampus emolientes e suplementações ou dietas enriquecidas com ácidos graxos essenciais, especialmente ricos em ômega-6, terapia com interferons recombinantes e corticoides ou tacrolimus tópicos para lesões localizados e em curto período, também podem ser utilizados (Olivry *et al.*, 2015). O lokivetmab, um anticorpo monoclonal caninizado anti IL-31, foi aprovado para uso em cães com DAC. Esse anticorpo atua extracelularmente ao direcionar e neutralizar a IL-31 antes de ligar ao seu receptor e desencadear a cascata pruriginosa (Santoro, 2019).

A imunoterapia específica para alérgenos é o único tratamento para a DAC que parece ter o potencial de normalizar a resposta imunitária desregulada, retardando a progressão da doença. Sendo ineficaz em alguns cães e apenas parcialmente eficaz em muitos casos (Olivry *et al.*, 2015). Porém, quando eficaz, pode reduzir substancialmente a necessidade de medicação anti-inflamatória ao longo da vida do cão afetado (Aberg, Varjonen, Ahman, 2017).

É importante ressaltar que nenhum tratamento, incluindo qualquer umas das intervenções farmacológicas mais recentes, tem total 100% de eficácia em casos de DAC. A abordagem para cada paciente deve ser personalizada e flexível, ajustando as diferentes necessidades à medida que o paciente envelhece (Nutall *et al.*, 2019).

3.6 MICROBIOTA, MICROBIOMA E DISBIOSE

O trato gastrointestinal (TGI) abriga um ecossistema complexo que consiste em vários microrganismos, como bactérias, vírus, fungos e protozoários. Este sistema é chamado de microbiota quando se refere ao conjunto de microrganismos existentes em um ambiente específico. Já microbioma refere-se como o habitat como um todo, onde incorporam-se fatores

bióticos e abióticos como o hospedeiro, o genoma e condições ambientais (Suchodolski, 2016; Swanson *et al.*, 2011; Whiteside *et al.*, 2015).

Existem diferenças nas populações bacterianas entre o estômago e os intestinos delgado e grosso, principalmente devido às diferenças na fisiologia intestinal (diferença nos níveis de oxigênio, pH, compostos antimicrobiano e motilidade intestinal). O estômago canino abriga apenas alguns tipos de bactérias que podem sobreviver ao ambiente ácido, predominantemente *helicobacter spp.* e, em menor grau, bactérias do tipo ácido lácticas (Garcia-Mazcorro *et al.*, 2012 a) (Garcia-Mazcorro *et al.*, 2012 b). Já o intestino delgado abriga uma mistura de bactérias aeróbicas e anaeróbicas (Johnston; Lamport; Batt, 1993; Mentula *et al.*, 2005) e o intestino grosso é altamente povoado principalmente por bactérias anaeróbicas (Honnerffer *et al.*, 2017; Ritchie; Steiner; Suchodolski, 2008).

O microbioma intestinal é um importante órgão imunológico e metabólico. As bactérias intestinais produzem vários metabólitos que influenciam na saúde do intestino e de outros órgãos e sistemas, incluindo rins, cérebro e coração. Quando existe uma mudança no perfil dos microrganismos que compõem a microbiota intestinal definimos com disbiose, podendo estar relacionada às desordens do trato gastrointestinal e de outros órgãos (Suchodolski, 2022).

O conceito de disbiose está em constante evolução, e inclui alterações na diversidade do microbioma e/ou estrutura e alterações funcionais como, por exemplo, produção alterada de metabólitos bacterianos. É importante ressaltar que as bactérias intestinais constituem apenas uma parte de uma intrincada relação que existe entre as células epiteliais intestinais, a camada de muco intestinal, o sistema imunológico do hospedeiro e o ambiente luminal. A composição da microbiota é influenciada até certo ponto pela dieta, medicamentos como antibióticos e quimioterápicos, inflamação no intestino, alterações estruturais no intestino e outros (Garraway *et al.*, 2018; Jergens *et al.*, 2019; Wenk, 2006; Wernimont *et al.*, 2020).

3.6.1 Bactérias intestinais e saúde intestinal

Bactérias intestinais produzem ou convertem moléculas dietéticas e drogas em metabólitos, sendo o microbioma intestinal considerado um importante órgão metabólico. Um microbioma intestinal equilibrado, exerce um efeito benéfico pois influencia na saúde do hospedeiro através da modulação do sistema imunológico, defesa contra patógenos intestinais e fornecimento de vitaminas e nutrientes (Arpaia *et al.*, 2013). A presença de bactérias, também é importante para o desenvolvimento adequado da estrutura intestinal, uma vez que a nutrição

da mucosa intestinal é resultado da absorção dos compostos no lúmen, os quais são provenientes dos ingredientes da dieta, ou produzidos pelos microrganismos intestinais (Suchodolski, 2016).

Os efeitos microbianos vão além do trato gastrointestinal. Estudos em cães e gatos mostram que alterações no microbioma intestinal não estão presentes apenas na doença gastrointestinal, mas também estão associados a distúrbios em outros sistemas de órgãos, como insuficiência renal crônica, doença cardíaca, distúrbios neurológicos, diabetes mellitus, e obesidade (Jeffery *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2021; Sanchez *et al.*, 2020; Summers *et al.*, 2019).

3.6.2 Microbioma intestinal de cães

O microbioma normal em cães e gatos adultos é composto principalmente por organismos dos filos *Actinobactéria*, *Bacteroides*, *Bifidobactéria*, *Firmicutes*, *Fusobactérias* e *Proteobactérias* e suas proporções diferem ao longo do comprimento do TGI (GARCIA-Mazcorro *et al.*, 2012b; Inness *et al.*, 2007; Suchodolski; Camacho; Steiner, 2008). Um estudo preliminar avaliando o microbioma fecal de cães saudáveis e cães com DAC, observou a abundância de *Conchiformibius*, *Catenibacterium* spp., grupo *Ruminococcus gnavus*, e *Megamonas*, em cães alérgicos. Este estudo sugere que alterações na diversidade e composição da microbiota intestinal podem estar associadas à DAC (Rostaher *et al.*, 2022).

Os *Lactobacillus* geralmente habitam todo o intestino de cães variando de 10^4 a 10^8 UFC/ml e, entre eles, o *Lactobacillus acidophilus* é dominante. *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus salivarius* também fazem parte e são relatados como parte da saúde do intestino canino. Outros *Lactobacillus* caninos são representados por *Lactobacillus murinus* e *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus sanfranciscensise*, *Lactobacillus paraplantarum* (Grzeskowiak *et al.*, 2015).

3.7 PROBIÓTICOS

Os probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, produzem efeitos benéficos à saúde. Entre eles podem ser citadas cepas do tipo *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e algumas cepas de *Enterococcus*. Estas bactérias podem ajudar a controlar organismos enteropatogênicos pela produção de ácidos orgânicos no lúmen do TGI, ou podem competir pela fixação em locais na mucosa intestinal (Wynn, 2009).

Os probióticos afetam o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunes da mucosa, interagindo com microrganismos comensais ou potencialmente patogênicos, gerando produtos metabólicos finais, como ácidos graxos de cadeia curta, e se comunicando com as células por sinais químicos. Estes mecanismos podem conduzir ao antagonismo de patógenos potenciais, a melhorar o ambiente intestinal, fortalecer a barreira intestinal, à regulação negativa da inflamação e à regulação positiva da resposta imune a desafios antigênicos. As cepas de probióticos são identificadas segundo seu gênero, espécie, subespécie (se corresponder) e uma denominação alfanumérica que identifica uma cepa específica (Tabela 1) (Guarner *et al.*, 2023).

Tabela 1 - Identificação de microrganismos probióticos.

| Gênero | Espécie | Subespécie | Denominação de cepa | Denominação da depositária internacional de cepas | Nome da cepa |
|--------------------------|---------------------|------------|---------------------|---|--------------------------|
| <i>Lactocaseibacills</i> | <i>L. rhamnosus</i> | Nenhuma | GG | ATCC 53103 | LGG |
| <i>Bifidobacterium</i> | <i>B. animalis</i> | Lactis | DN-173 010 | CNCMI-2494 | <i>Bifidus regularis</i> |
| <i>Bifidobacterium</i> | <i>B. longum</i> | Longum | 35624 | NCIMB 41003 | <i>Bifantis</i> |

Fonte: Guarner *et al.*, 2023

Os mecanismos de interação entre probióticos e hospedeiro, promovem uma simbiose entre microbiota e hospedeiro e pode ser otimizada com intervenções farmacológicas ou nutricionais no ecossistema microbiano intestinal, usando probióticos ou prebióticos. Entre os benefícios imunológicos dos probióticos, estão a ativação de macrófagos locais para aumentar a apresentação dos antígenos para os linfócitos B e o aumento da produção de imunoglobulina A secretória (IgA), tanto local quanto sistemicamente. Além disso, há modulação do perfil de citocinas e indução da tolerância aos antígenos alimentares. Também são citados benefícios não imunológicos como a digestão de alimentos, competição com os patógenos pelos nutrientes, alteração do pH local para criar um ambiente local desfavorável para os patógenos, produção de bacteriocinas para inibir os patógenos, fagocitose de radicais superóxidos, a estimulação da produção epitelial de mucina, o aumento da função da barreira intestinal e a competição pela adesão com os patógenos (Guarner *et al.*, 2023).

O probiótico dito como ideal é o que contém uma cepa bacteriana que ocorre naturalmente na mesma espécie que o hospedeiro pretendido, não é patogênica, mantém a viabilidade durante a produção, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal, adere e coloniza a mucosa epitelial e promove um efeito benéfico ao hospedeiro (Wynn, 2009).

3.7.1 Probióticos na dermatite atópica humana

Os efeitos dos probióticos na prevenção e tratamento da DA permanecem indefinidos. No entanto, evidências de diferentes grupos de pesquisa mostram que os probióticos podem ter um efeito positivo no tratamento da DA, o qual depende de vários fatores, como cepas probióticas específicas, tempo de administração (tempo de início), duração da exposição e dosagem (Rather *et al.*, 2016).

Em humanos, os probióticos são amplamente utilizados como terapia adjuvante para casos alérgicos com resultados inconsistentes devido ao mecanismo multifatorial das alergias (Rahman *et al.*, 2011; Rather *et al.*, 2016). Intervenções com probióticos mostraram ser capazes de reduzir e aliviar os sintomas da DA em crianças, particularmente no tratamento de bebês e crianças com menos de um ano. Além disso, administrações de probióticos de cepa mista tendem a ter melhores efeitos preventivos e curativos. Diferentes durações de intervenção também podem afetar os resultados clínicos (Jiang *et al.*, 2020).

Muitos microrganismos são amplamente estudados em medicina humana e seus benefícios são comprovados através de testes clínicos. Para doenças alérgicas, os probióticos de maior importância clínica citados são os à base de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus casei*. Também são utilizadas as espécies de *Bifidobacterium*, entre elas, a *Bifidobacterium lactis*, a *Bifidobacterium longum* e a *Bifidobacterium animalis*, com seus benefícios variando de acordo com cada cepa (Pan *et al.*, 2010). Alguns estudos demonstraram que bactérias do gênero *Lactobacillus* são importantes como terapia adjuvante no tratamento da DA e na prevenção da recorrência ou desenvolvimento da DA, desempenhando um papel importante na modulação de Th1 e Th2 (Prakoeswa *et al.*, 2022). Outro estudo com *Lactobacillus* para crianças diagnosticadas com DA mostrou resultados semelhantes na redução dos sintomas clínicos de DA. Esse efeito foi demonstrado pela diminuição do SCORAD e dos níveis séricos de IgE, IL-4 e IL-17 (Prakoeswa *et al.*, 2017).

Em uma revisão de 13 ensaios randomizados controlados por placebo, foi evidenciada uma diminuição na gravidade dos sintomas clínicos, após a administração de probióticos de um a dois meses em lactantes ou crianças com dermatite atópica. Outros estudos demonstraram uma redução de sintomas apenas em crianças com dermatite atópica associada a IgE, ou alterações em alguns marcadores inflamatórios. Porém, três destes estudos não demonstraram diferenças clínicas entre crianças com dermatite atópica tratadas com probióticos. Na maioria

destes estudos, os marcadores inflamatórios permanecem inalterados após a administração de probióticos, quando comparado ao placebo. Achados semelhantes estão presentes em estudos probióticos para alergia alimentar em humanos. As diferenças podem estar relacionadas a diferentes populações de estudo, cepas probióticas e doses probióticas (Betsi; Papadavid; Falgas, 2008).

3.7.2 Probióticos na dermatite atópica canina

Na medicina veterinária os probióticos são utilizados em diferentes espécies e recomendados em casos como na doença inflamatória intestinal, diarreias, doença renal crônica ou em pancreatites (Lalles *et al.*, 2007; Mangiante *et al.*, 2001; Muftuoglu *et al.*, 2006; Nava *et al.*, 2005; Olah *et al.*, 2002; Şahin *et al.*, 2007; Sargeant *et al.*, 2007; Wynn, 2009).

Cepas de bactérias isoladas de fezes de cães e estudadas para probióticos incluem *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus animalis*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Enterococcus faecalis EE4*, *E. faecium EF01* e *Bifidobacterium animalis*. Todos sobreviveram à passagem pelo trato gastrointestinal e foram recuperados em fezes, embora fossem geralmente indetectáveis de uma a duas semanas após o término da suplementação (Manninen *et al.*, 2006).

Um estudo realizado com dois beagles atópicos adultos foram cruzados duas vezes com um ano de diferença; A primeira ninhada foi o grupo controle não tratado com probióticos (n=7). *Lactobacillus rhamnosus* GG foi administrado a cadela durante a segunda gravidez (200 x 10⁹ UFC) por via oral, diariamente, começando na terceira semana da segunda gravidez, e continuando ao longo da lactação e aos filhotes da segunda ninhada (n=9) das 3 semanas aos 6 meses de idade (100 x 10⁹ UFC) por via oral diariamente. Todos os filhotes foram sensibilizados aos ácaros da poeira doméstica com 3 semanas de idade, amostras de soro foram obtidas a cada 6 semanas para medição de IgE de ácaros da poeira doméstica e, aos 6 meses de idade, os filhotes foram testados para alergia intradérmica e ambientalmente desafiados com ácaros domésticos. Os filhotes expostos ao probiótico, tiveram títulos significativamente mais baixos de IgE específica para alérgenos, e reações mais brandas ao teste intradérmico, em comparação com a ninhada controle não tratada, porém as pontuações clínicas após a exposição aos ácaros não diferiram entre as ninhadas (Marsella, 2009).

Um segundo estudo com os mesmos filhotes de beagles do estudo anterior foram acompanhados após 3 anos da suspensão dos probióticos, para avaliar gravidade dos sinais

clínicos e medir a produção de IgE e IL-10 específica para alérgenos e TGF-B após a estimulação com alérgenos. Os resultados mostraram que as pontuações clínicas após o desafio com ácaros da poeira doméstica foram maiores na ninhada controle e tinham níveis mais altos de IL-10 do que os cães expostos ao probiótico (os cães expostos ao probiótico cães estavam próximos dos níveis presentes em beagles normais). A IgE específica para alérgenos e TGF-B não diferiram entre as ninhadas (Marsella; Santoro; Ahrens, 2012).

Outro estudo realizado em cães com DA utilizou de *Lactobacillus paracasei* K71 e verificou um efeito poupador de medicações, aumentando o intervalo de administração ou suspensão de terapia foi verificado ao associar terapias de glicocorticóides ou ciclosporina ao probiótico testado (Ohshima- Terada *et al.*, 2015).

Em 2019, um estudo realizado em cães com DAC e administração oral de *Enterococcus faecalis* FK-23p em uma dose de ≥ 100 mg / kg por dia durante 12 semanas observou escores clínicos reduzidos quando utilizado como um tratamento adjuvante. De acordo com a taxa de melhoria dos escores clínicos, 50% dos atópicos apresentaram sinais clínicos reduzidos com administração oral de FK-23p (Osumi *et al.*, 2019).

São diversos os usos desta terapia, todavia, os produtos probióticos estão sujeitos a variações no controle de qualidade. É cada vez mais claro que a manipulação da ecologia do trato gastrointestinal tem poderosos efeitos sistêmicos. O uso de probióticos melhora claramente a função imunológica em várias espécies, incluindo cães e gatos e parece ter um papel no tratamento de animais com diversas condições (Wynn, 2009).

3.7.3 Lactobacillus rhamnosus GG

Lactobacillus rhamnosus GG foi originalmente isolado de uma amostra fecal humana por Sherwood Gorbach e Barry Goldin em 1985 e o propôs como uma potencial cepa probiótica baseada em sua alta tolerância a ácidos e bile, capacidade de adesão e características de crescimento (Goldin *et al.*, 1992).

No ano de 1989 foi a primeira cepa de *Lactobacillus* a ser patenteada graças a suas importantes características (Capurso, 2019). Com sua introdução no mercado em 1990, a cepa de *L. rhammnosus* GG tornou-se uma das mais estudadas e comercializadas cepas probióticas, sendo testada em vários ensaios clínicos e demonstrando efeitos benéficos numa variedade de áreas. Das áreas estudadas em humanos, o *L. rhammnosus* GG auxiliou na redução da duração da diarreia infecciosa aguda, na prevenção do desenvolvimento de dermatite atópica, no

aumento da tolerância ao leite de vaca em bebês alérgicos e na eliminação da colonização de enterococos resistentes à vancomicina (Berni Canani *et al.*, 2013; Isolauri *et al.*, 1991; Kalliomaki *et al.*, 2001; Manley *et al.*, 2007).

Além disso, o *L. rhamnosus* GG possui propriedades adesivas poderosas, suprime a atividade enzimática bacteriana, pode deslocar ou eliminar certos componentes da flora intestinal normal e produz uma substância antimicrobiana ativa contra uma variedade de bactérias, incluindo *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Clostridium spp.* e *Streptococcus spp.* (Gorbach, 2000).

A atividade imunológica da cepa LGG, já foi verificada em diversos estudos em diferentes espécies, onde verificou-se o estímulo da resposta imune específica, com aumento de IgA, IgG, IgM, melhorando a função intestinal e produção de IgA em camundongos neonatos. Além disso, é capaz de aumentar a secreção de IL-6, inibir a produção de lipopolissacarídeos e o fator de necrose tumoral (Capurso, 2019).

Com relação a doenças alérgicas em humanos o LGG a nível intestinal, sabe-se da capacidade de modulação da microbiota intestinal, e a hidrólise de peptídeos antigênicos. Já em mucosa intestinal, observa-se a modulação da permeabilidade, a estimulação e o crescimento celular. Além do intestino, é reconhecido a modulação inata/adaptativa do sistema imune, e um impacto no sistema nervoso entérico (Capurso, 2019).

4 METODOLOGIA

Este estudo multicêntrico, duplo-cego e controlado por placebo foi realizado em um serviço clínico privado de dermatologia veterinária, o qual presta serviço em diferentes cidades do estado do Rio Grande do Sul.

Todos os pacientes foram avaliados, três vezes com intervalos de 45 dias: dia 0 (D0), dia 45 (D45) e dia 90 (D90) pelo mesmo médico veterinário entre os meses de julho de 2022 a janeiro de 2023. Um total de 40 cães, diagnosticados com dermatite atópica canina e responsivos parcialmente ao maleato de oclacitinib (Apoquel®) para o controle de prurido, a pelo menos 4 meses, na dose de 0,4 – 0,6 mg/kg a cada 24 horas, e que apresentassem CADESI-04 máximo de 59 caracterizando uma DA em remissão, leve a moderada, foram avaliados neste estudo.

Aleatoriamente, os pacientes receberam frascos idênticos, de coloração âmbar, identificados por números de 1 a 40, contendo 90 unidades de uma cepa probiótica contendo *Lactobacillus rhammnosus* GG (n=20) na dose de 1×10^9 unidades formadoras de colônia (UFCs) por dose, ou cápsulas com veículo inerte placebo (n=20), composto por silicato de magnésio, celulose, dióxido de silício e estearato de magnésio (Diluicap hygro®). As duas opções, em seus devidos grupos foram administradas uma vez ao dia, no período da noite, duas horas depois após a última refeição continuamente durante 12 semanas.

4.1 ANIMAIS

Foram avaliados 40 cães com diagnóstico de DAC, prurido não sazonal, de diferentes raças, idades, sexo, peso, que recebiam alimentação a base de ração comercial, castrados ou não (Tabela 2).

O diagnóstico dermatológico de DAC foi seguido conforme diretrizes publicadas para diagnóstico e identificação de alérgenos (Hensel *et al.*, 2015). Brevemente, a triagem alérgica iniciou excluindo dermatite alérgica a picada de pulgas. No exame direto buscou-se verificar a presença de pulgas ou fezes de pulgas e a localização das lesões cutâneas e do prurido associado a DAPP que são mais comumente encontradas na área lombossacra, base da cauda e coxas caudomediais. Outras investigações associadas a doenças de pele ectoparasitárias, também foram realizadas através de raspagem de pele e verificação em microscopia com objetivo de baixo aumento (4x ou 10x) e uso de pente fino, buscando excluir *Sarcoptes scabiei canis*, *Demodex spp.*, *Cheyletiella spp.*, piolhos, carrapatos e *Otodectes cynotis*.

Amostras citológicas da pele e cerúmen, foram coletadas e coradas com panóptico rápido e examinados em microscopia ótica em imersão (100x), antes de fechar o diagnóstico de DAC para que infecções estafilocócicas e o crescimento excessivo de *Malassezia* não interferisse no diagnóstico. Tratamentos foram instituídos para pacientes que apresentaram quadros infecciosos, sendo prescritos agentes bacterianos ou antifúngicos tópicos ou orais conforme a necessidade de cada caso.

A dieta de eliminação foi realizada com ração comercial hipoalergênica a base de soja da marca Royal Canin® sendo recomendado excluir quaisquer alimentos, guloseimas, ou medicamentos com sabores. O teste foi realizado por no mínimo 8 semanas e o diagnóstico de DA foi confirmado nos pacientes que não apresentaram remissão clínica dos sintomas. (Hensel *et al.*, 2015).

Dois cães da raça shih tzu foram retirados do estudo após quinze dias do início do tratamento, devido aos tutores optarem por outro tratamento que não incluía oclacitinib. Estes pacientes foram substituídos por outros dois pacientes que se qualificavam para o estudo.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Os critérios de inclusão foram pacientes com diagnóstico de DAC a pelo menos 4 meses. Estes pacientes deveriam receber maleato de oclacitinib (Apoquel®) a cada 24 horas, nas doses que variavam entre 0,4 mg/kg a 0,6 mg/kg, conforme a recomendação do laboratório Zoetis® a pelo menos 4 meses, e que ainda apresentassem prurido leve a moderado. Além disso foram incluídos pacientes com CADESI -04 máximo de 59 o que classifica como dermatite atópica em remissão, leve a moderada.

Todos os pacientes deveriam estar com controle preventivo de ectoparasitas em dia, a pelo menos 3 meses antes do início do estudo. As terapias tópicas relacionadas a xampus e condicionadores, com ação hidratante e emoliente e soluções otológicas para limpeza auricular de diferentes marcas comerciais, foram mantidas conforme o que já era utilizado pelo paciente, bem como diferentes rações comerciais. Todas estas variáveis não foram padronizadas previamente, mas deveriam ser mantidas de forma contínua sem alterações.

Os critérios de exclusão foram animais com endocrinopatia concomitante ou neoplasia, outros tratamentos como ciclosporina, terapia monoclonal, imunoterapia, corticosteroides orais ou tópicos com período prévio de 4 meses e antibióticos sistêmicos para tratamento de pele com período prévio de 4 semanas.

Em casos em que pacientes necessitassem de outro tratamento para o controle dos sintomas da DAC, durante as 12 semanas de participação do estudo, estes seriam automaticamente excluídos.

4.3 CEPA PROBIÓTICA TESTADA

O probiótico escolhido para o projeto foi manipulado e a cepa escolhida foi *Lactobacillus rhammnosus* GG na dose de 1×10^9 UFC.

4.4 IDENTIFICAÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DAS AMOSTRAS – LACTOBACILLUS E PLACEBO

As amostras foram produzidas e acondicionadas pela Fórmula Bichos Manipulação Ltda localizada na cidade de Novo Hamburgo – RS. Os frascos idênticos, de coloração âmbar com numeração de 1 a 40 (Figura 6A-B), não apresentavam distinção entre cápsulas ou conteúdo que pudesse identificar qual frasco continha o *Lactobacillus rhammnosus* GG ou placebo.

Os tutores foram convidados a participar do estudo, juntamente com seus pets durante as consultas dermatológicas de rotina. Todos os tutores foram informados sobre potenciais riscos e benefícios da participação durante o estudo, e o consentimento informado por escrito foi obtido de cada um antes da inscrição no estudo (Apêndice A). A triagem e a inscrição dos pacientes, ocorreram em cidades no estado do Rio Grande do Sul – Caxias do Sul, Garibaldi e Novo Hamburgo entre os meses de julho de 2022 a janeiro de 2023.

As amostras foram distribuídas conforme o agendamento dos atendimentos, caso algum paciente não comparecesse ao seu dia, automaticamente, o próximo paciente receberia o frasco em sequência.

Tabela 2 - Raça, sexo, idade, peso e estado reprodutivo e recebimento de *L. rhammnosus* GG ou não de cães atendidos durante o estudo.

| Cão | Raça | Sexo | Idade em anos | Peso | Estado reprodutivo | <i>Lactobacillus rhammnosus</i> GG |
|------------|-------------|-------------|----------------------|-------------|---------------------------|---|
| 01 | Yorkshire | F | 15 | 6,1 | Castrada | Não |
| 02 | Shih-tzu | F | 8 | 5,4 | Castrada | Sim |
| 03 | SRD | F | 4 | 9,8 | Castrada | Não |
| 04 | Shih-tzu | F | 3 | 5,5 | Castrada | Sim |
| 05 | Shih-tzu | M | 8 | 7,9 | Castrado | Não |
| 06 | Shih-tzu | M | 9 | 7,6 | Castrado | Sim |
| 07 | Spitz | M | 6 | 8,8 | Castrado | Não |
| 08 | Shih-tzu | F | 11 | 5,4 | Castrada | Sim |
| 09 | Maltês | M | 9 | 5,7 | Castrado | Não |
| 10 | Shih-tzu | M | 8 | 7,1 | Castrado | Sim |
| 11 | Shih-tzu | F | 2 | 5,3 | Castrada | Não |
| 12 | Yorkshire | M | 2 | 5 | Castrado | Sim |
| 13 | Shih-tzu | F | 9 | 5,8 | Castrada | Não |
| 14 | Shih-tzu | F | 7 | 7,8 | Castrada | Sim |
| 15 | Shih-tzu | F | 2 | 7,7 | Castrada | Não |
| 16 | Shih-tzu | F | 6 | 7,8 | Castrada | Sim |
| 17 | Shih-tzu | M | 8 | 8 | Castrado | Não |
| 18 | Shih-tzu | F | 2 | 4,9 | Castrada | Sim |
| 19 | Bulldog | M | 4 | 12,8 | Castrado | Não |
| 20 | Shih-tzu | F | 8 | 6,4 | Castrada | Sim |
| 21 | Shih-tzu | F | 6 | 6,6 | Castrada | Não |
| 22 | Shih-tzu | M | 10 | 6,6 | Castrado | Sim |
| 23 | Yorkshire | M | 6 | 5,4 | Castrado | Não |
| 24 | Shih-tzu | F | 1 | 6,9 | Castrada | Sim |
| 25 | Shih-tzu | F | 6 | 6 | Castrada | Não |
| 26 | Poodle | F | 7 | 5,2 | Castrada | Sim |
| 27 | Pequinês | F | 8 | 6,6 | Castrada | Não |
| 28 | Shih-tzu | M | 5 | 6,2 | Castrado | Sim |
| 29 | Sharpei | F | 4 | 18 | Castrada | Não |
| 30 | SRD | M | 13 | 8,5 | Castrado | Sim |
| 31 | Shih-tzu | F | 5 | 8,3 | Castrada | Não |
| 32 | Shih-tzu | F | 2 | 8,2 | Castrada | Sim |
| 33 | Shih-tzu | F | 13 | 5,4 | Castrada | Não |
| 34 | Pequinês | F | 9 | 4,8 | Castrada | Sim |
| 35 | Shih-tzu | F | 3 | 4,9 | Castrada | Não |
| 36 | SRD | F | 6 | 9,5 | Castrada | Sim |
| 37 | Bulldog | M | 6 | 15 | Castrado | Não |
| 38 | Shih-tzu | M | 2 | 8,2 | Castrado | Sim |
| 39 | SRD | F | 12 | 12 | Castrada | Não |
| 40 | Poodle | F | 8 | 6,6 | Castrada | Sim |

Fonte: a própria autora (2023).

Figura 6 - Frascos idênticos, de coloração âmbar identificados por números.



Fonte: a própria autora (2023).

4.5 GRUPOS

Os pacientes somente foram classificados em grupo intervenção e grupo placebo após a avaliação do último paciente. Neste momento, a farmácia de manipulação responsável pela produção das amostras enviou uma tabela onde continha a numeração de cada frasco e o que continha em cada um.

4.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA

O objetivo principal deste estudo foi avaliar a associação do uso de oclacitinib e *Lactobacillus rhamnosus* GG por via oral em cães diagnosticados com DAC. Os pacientes foram avaliados em três momentos: D0, D45 e D90. Nestes dias, a severidade e extensão das lesões foram avaliadas usando o sistema de pontuação CADESI-04, registrando 3 tipos de lesões (eritema, liquenificação e prurido – através de escoriação e alopecia) em 20 zonas do corpo comumente afetados na DAC. Locais como área perilabial, orelhas, axilas, membros torácicos e pélvicos, flexura de membros torácicos, área palmar metacárpica, flancos, face medial de membros pélvicos, área abdominal ventral, área perineal e cauda proximal ventral foram avaliadas. Essas áreas foram pontuadas em uma escala entre 0 e 3 (0, nenhuma; 1, leve; 2, moderada; 3, grave) com pontuação máxima de 180 (Olivry *et al.*, 2014).

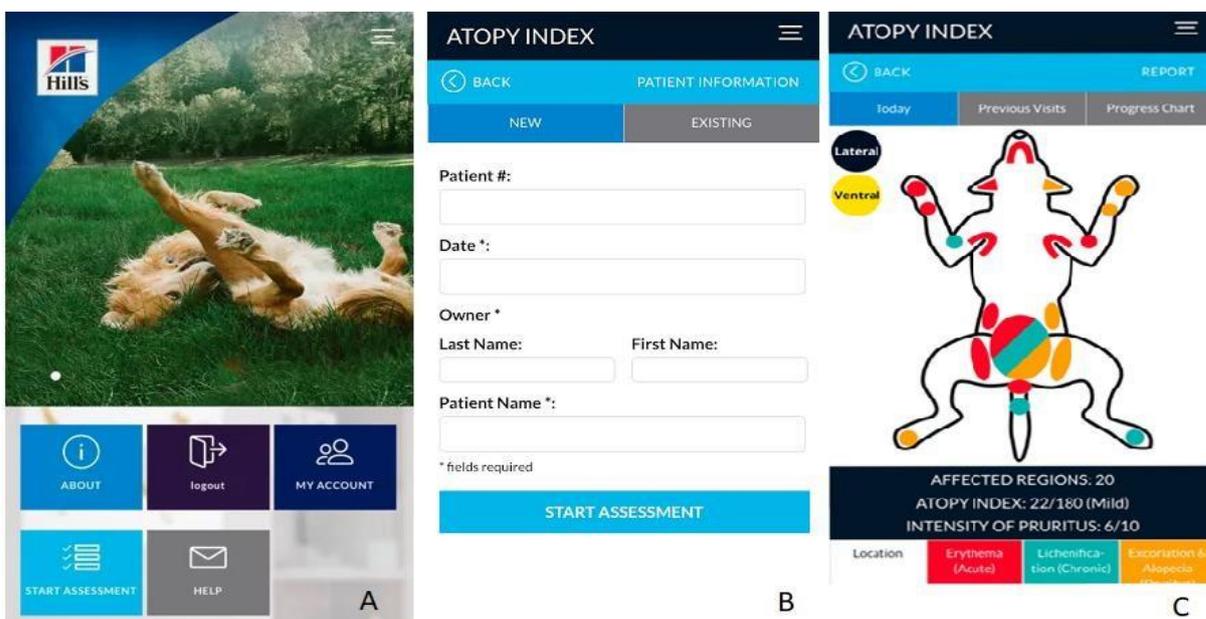
Para armazenar o índice de extensão e gravidade da DAC (CADESI-4) foi utilizado o aplicativo Hill's Atopy Index® (Figura 7 A-C). O aplicativo avalia o índice dermatológico total

com base em uma escala de gravidade validada em apenas alguns minutos, sendo possível visualizar o índice de gravidade usando a visão lateral e ventral usual, acompanhando a evolução da pontuação total e da gravidade por cada área em cada visita e compartilhando ao final o relatório resumido para o e-mail cadastrado.

Em cada visita, o prurido foi pontuado pelos tutores usando uma escala visual analógica de prurido (Hill; Lau; Rybnicek, 2007; Rybnicek *et al.*, 2009). Para melhor visualização do tutor, foi entregue em cada visita a versão impressa desta escala da empresa Zoetis® (Figura 8) para o tutor marcar à caneta a região na qual o nível de prurido do seu pet se encontrava. Posteriormente esta marca era verificada com uma régua e então pontuada de 0 – 10 e este número era então adicionado no aplicativo Atopic Index - Hills®. O tutor não tinha acesso às pontuações anteriores.

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Caxias do Sul (número 0008/2022) (Anexo 1).

Figura 7 – Imagens do aplicativo Atopic Index - Hills®, tela de entrada do aplicativo (A), tela de cadastro do paciente (B), tela final após a avaliação do paciente (C).



Fonte: Hills® (2023).

Figura 8 - Escala analógica visual para controle de prurido.



Fonte: Zoetis® (2023).

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Quanto ao desenho experimental deste estudo, o tamanho da amostra foi determinado através da aplicação de métodos estatísticos. O tamanho da amostra foi estimado usando o programa de calculadora G Power 3.1.9.2 da Universidade de Kiel, Alemanha (<http://www.gpower.hhu.de/>). O nível de significância estipulado foi de 5% e o poder de teste de 80%. O tamanho amostral estimado foi de 40 pacientes, para detectar diferenças de grupo de tamanho médio e/ou efeitos de intervenção ($d = 0,9$) e para análise de comparação de médias entre dois grupos com razão de 1 para os grupos analisados. Nesse caso, são 20 pacientes para cada grupo.

As análises estatísticas foram calculadas utilizando o software IBM SPSS Statistics versão 26. Para todas as análises estatísticas, foi adotado um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). A normalidade dos dados foi atestada através do teste de Shapiro-Wilk. O escore da escala pVAS e do CADESI-04 antes e depois do tratamento dos grupos intervenção e controle, foram analisados através do teste t de Student pareado, e as diferenças entre os grupos distintos foram analisadas com o teste t de Student de amostras independentes.

5 RESULTADOS

Este estudo avaliou quarenta cães, entre eles dezesseis machos e vinte e quatro fêmeas, durante 90 dias. A idade média foi de $6,58 \pm 3,4$ anos. Durante o período do estudo, nenhum paciente apresentou reações adversas relacionadas ao uso desta associação.

5.1 CADESI-04

No grupo de pacientes no qual houve associação de *L. rhamnosus* GG e oclacitinib foram observadas mudanças estatisticamente significativas nos escores do CADESI-04 ao longo do tempo. A média inicial no D0 foi de $16,10 \pm 6,664$ e diminuiu para $10,80 \pm 5,818$ no D45, uma diferença estatisticamente significativa de 5,3 pontos ($p < 0,01$). No entanto, entre o D45 e o D90, não foi observada uma diferença estatisticamente significativa, diminuindo $1,2 \pm 3,9$ pontos ($p = 0,19$). A diferença final entre o início (D0) e o fim do estudo (D90) no grupo intervenção foi de 6,5 pontos no CADESI-04 ($p < 0,01$) (Tabela 3).

No grupo de pacientes que receberam placebo e oclacitinib a média inicial no D0 foi de $18,95 \pm 8,029$ e diminuiu para $14,55 \pm 5,862$ no D45, uma diferença estatisticamente significativa de 4,4 pontos ($p = 0,013$). Entre o D45 e o D90, não observamos uma diferença significativa ($-0,6 \pm 9,6$, $p = 0,783$). A diferença final no grupo placebo foi uma redução de 3,8 pontos no escore do CADESI-04 ($p = 0,157$) (Tabela 4).

Na comparação entre grupos, observamos diferenças significativas em todas as avaliações. Na primeira avaliação (D0), não houve diferença significativa ($p = 0,229$), já na segunda avaliação (D45), houve diferença significativa ($p = 0,049$), com uma média de $-3,75 \pm 1,84$ pontos no grupo de intervenção em comparação com o grupo placebo. Na terceira avaliação (D90), também foi observado uma diminuição significativa no escore ($p = 0,049$), com uma média de $-5,55 \pm 2,72$ pontos no grupo de intervenção em comparação com o grupo placebo (Gráfico 1).

Tabela 3- Avaliação - CADESI-04 em D0, D45 e D90 - grupo intervenção

| Cão | D0 | D45 | D90 |
|--------------|-------------------|-------------------|------------------|
| 02 | 7 | 4 | 2 |
| 04 | 16 | 8 | 5 |
| 06 | 19 | 11 | 12 |
| 08 | 10 | 12 | 9 |
| 10 | 29 | 15 | 14 |
| 12 | 10 | 10 | 10 |
| 14 | 9 | 12 | 11 |
| 16 | 24 | 20 | 13 |
| 18 | 16 | 2 | 2 |
| 20 | 25 | 22 | 21 |
| 22 | 18 | 19 | 15 |
| 24 | 12 | 13 | 11 |
| 26 | 27 | 14 | 9 |
| 28 | 16 | 10 | 14 |
| 30 | 10 | 2 | 4 |
| 32 | 18 | 9 | 12 |
| 34 | 9 | 3 | 4 |
| 36 | 8 | 4 | 5 |
| 38 | 20 | 13 | 15 |
| 40 | 19 | 13 | 15 |
| Média | 16,1 ± 6,7 | 10,8 ± 5,8 | 9,6 ± 5,6 |

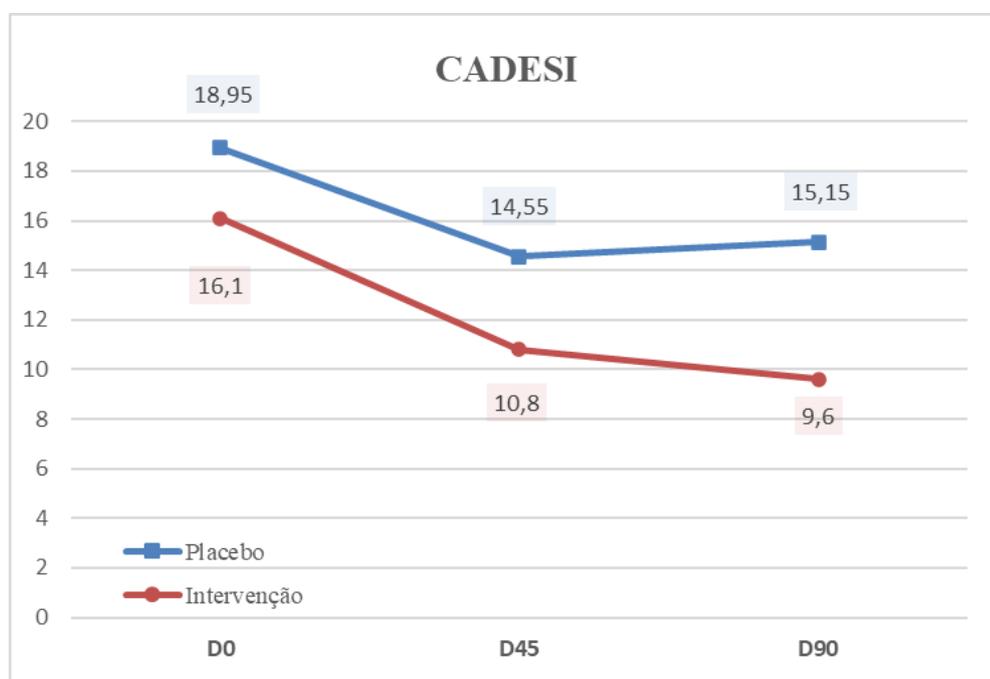
Fonte: a própria autora (2023).

Tabela 4 - Avaliação - CADESI-04 em D0, D45 e D90 - grupo placebo

| Cão | D0 | D45 | D90 |
|--------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| 01 | 17 | 24 | 11 |
| 03 | 11 | 7 | 8 |
| 05 | 26 | 23 | 21 |
| 07 | 10 | 9 | 11 |
| 09 | 34 | 15 | 20 |
| 11 | 23 | 19 | 15 |
| 13 | 29 | 16 | 26 |
| 15 | 17 | 14 | 9 |
| 17 | 16 | 12 | 12 |
| 19 | 16 | 7 | 6 |
| 21 | 35 | 14 | 20 |
| 23 | 23 | 27 | 16 |
| 25 | 25 | 18 | 24 |
| 27 | 13 | 8 | 7 |
| 29 | 18 | 11 | 22 |
| 31 | 12 | 12 | 7 |
| 33 | 11 | 13 | 16 |
| 35 | 11 | 13 | 13 |
| 37 | 22 | 21 | 51 |
| 39 | 9 | 8 | 8 |
| Média | 18,95 ± 8,03 | 14,55 ± 5,9 | 15,15 ± 10,8 |

Fonte: a própria autora (2023).

Gráfico 1 – Comparação de médias de CADESI -04 entre grupos de placebo e intervenção para os dias D0, D45 e D90



Fonte: a própria autora (2023).

5.2 PVAS

No grupo que recebeu *L. rhamnosus* GG associado ao oclacitinib, observamos mudanças significativas nos escores de pVAS ao longo do tempo. A média inicial no D0 foi de $5,390 \pm 1,6010$ e diminuiu para $4,075 \pm 1,8444$ no dia 45 ($p < 0,01$). Entre o D45 e D90, não foi observado diferença ($0,25 \pm 1,8$, $p = 0,54$). A diferença final encontrada entre D0 e D90 foi uma redução significativa de 1,56 pontos na escala pVAS ($p < 0,01$) (Tabela 5).

No grupo placebo, não foram observadas mudanças significativas nos escores da pVAS ao longo do estudo. A média inicial no D0 foi de $4,870 \pm 0,6387$ pontos e permaneceu praticamente inalterada no D45 ($5,0 \pm 1,4510$) e no D90 ($4,525 \pm 1,8812$). Não houve diferenças estatisticamente significativas nas comparações no grupo placebo em nenhum dos momentos (Tabela 6).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de intervenção e placebo em nenhum dos encontros. No primeiro encontro (D0), não houve diferença significativa ($p = 0,31$), com uma diferença de $0,52 \pm 0,51$. No segundo encontro (D45), a diferença não foi significativa ($p = 0,08$), com uma média de $-0,92 \pm 0,52$. No terceiro

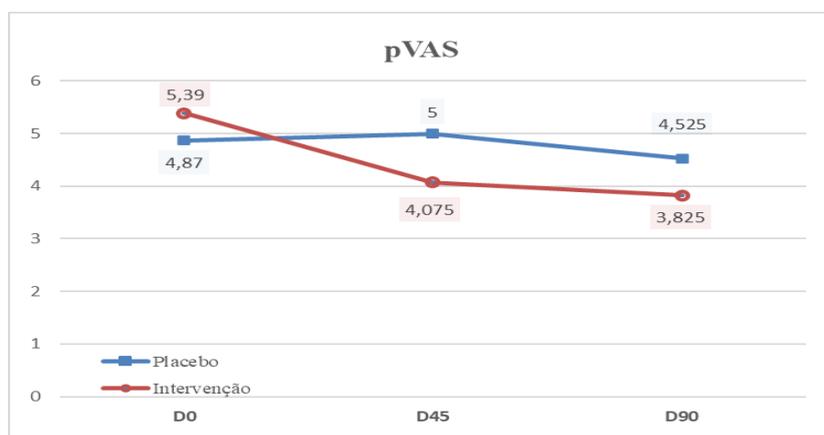
encontro(D90), também não observamos diferença ($p = 0,23$), com uma média de $-0,7 \pm 0,58$ pontos.

Tabela 5 - Prurido conforme pVAS em D0, D45 e D90 – grupo intervenção

| Cão | D0 | D45 | D90 |
|--------------|------------------|-------------------|-------------------|
| 02 | 5 | 2 | 2 |
| 04 | 8 | 5,5 | 2 |
| 06 | 6 | 6 | 2 |
| 08 | 5 | 4,5 | 4 |
| 10 | 7 | 5 | 4 |
| 12 | 5 | 5 | 6 |
| 14 | 2 | 1 | 3 |
| 16 | 5 | 4 | 6 |
| 18 | 8 | 1 | 4 |
| 20 | 4 | 5 | 6 |
| 22 | 6 | 6 | 4 |
| 24 | 4,3 | 1,5 | 2 |
| 26 | 6 | 6 | 6 |
| 28 | 3,5 | 5 | 6 |
| 30 | 4,5 | 4 | 2 |
| 32 | 5 | 2 | 3 |
| 34 | 4 | 4 | 4 |
| 36 | 5,5 | 2 | 2 |
| 38 | 5,5 | 5 | 5 |
| 40 | 8,5 | 7 | 5,5 |
| Média | 5,4 ± 1,6 | 4,07 ± 1,8 | 3,82 ± 1,8 |

Fonte: A própria autora (2023).

Gráfico 2 – Comparação de médias de pVAS entre grupos placebo e intervenção para os dias D0, D45 e D90



Fonte: a própria autora (2023).

Tabela 6 – Prurido conforme pVAS em D0, D45 e D90 – grupo placebo

| Cão | D0 | D45 | D90 |
|--------------|-------------------|------------------|-------------------|
| 01 | 4 | 6 | 7 |
| 03 | 2 | 4 | 6 |
| 05 | 8 | 8 | 5 |
| 07 | 4 | 3 | 3 |
| 09 | 8 | 6 | 6 |
| 11 | 5 | 4,5 | 5,5 |
| 13 | 5 | 5,5 | 7 |
| 15 | 6 | 4 | 5 |
| 17 | 3 | 6 | 2 |
| 19 | 5 | 5,5 | 4 |
| 21 | 6,5 | 6 | 6 |
| 23 | 4,4 | 3 | 2 |
| 25 | 5 | 3,5 | 5 |
| 27 | 4,5 | 2 | 4,5 |
| 29 | 5,5 | 6 | 6,5 |
| 31 | 3,5 | 5 | 3 |
| 33 | 2 | 6 | 4 |
| 35 | 4 | 4 | 4 |
| 37 | 6 | 6 | 7 |
| 39 | 6 | 6 | 4 |
| Média | 4,87 ± 0,6 | 5,0 ± 1,4 | 4,52 ± 1,9 |

Fonte: a própria autora (2023).

6 DISCUSSÃO

Até o momento, em nosso conhecimento, este foi o primeiro estudo brasileiro avaliando o uso oral de *L. rhamnosus* GG em associação com maleato de oclacitinib (Apoquel®) em pacientes com DAC. Este estudo randomizado, duplo cego e controlado por placebo demonstrou reduções significativas nas pontuações CADESI-04 em comparação ao grupo placebo. As pontuações pVAS também tiveram reduções significativas no grupo de teste. Portanto, demonstrou-se assim o potencial benefício clínico do *L. rhamnosus* GG quando combinado com oclacitinib no tratamento da DAC. É importante salientar que, atualmente não existem parâmetros estabelecidos de referência para definir um limiar para o sucesso do tratamento (Olivry *et al.*, 2018).

A escolha da cepa *L. rhamnosus* GG foi definida com base em pesquisas veterinárias prévias (Marsella, 2009, Marsella *et al.*, 2012), segurança da cepa estudada (Weese *et al.*, 2002), pesquisas em seres humanos (Foolad *et al.*, 2013), facilidade de manipulação e experiência prévia da pesquisadora.

Embora os mecanismos imunomoduladores de *L. rhamnosus* GG não sejam totalmente compreendidos, está estabelecido que os probióticos podem interagir com células dendríticas, ajudando a equilibrar a imunidade Th1/Th2 e aumentar a atividade T reg (De Pessemier *et al.*, 2021). Especificamente, *L. rhamnosus* GG pode influenciar a cascata inflamatória atópica induzindo a produção de interleucinas e interferons e reduzindo os níveis de IgE (Marsella, 2009). Estes estudos publicados previamente podem justificar a melhora nos escores de CADESI-04 observados nessa pesquisa.

Em medicina veterinária, um estudo em cães gravemente atópicos avaliou a eficácia do probiótico *L. rhamnosus* GG para o alívio ou prevenção de sinais clínicos da dermatite atópica (DA). A administração de *L. rhamnosus* GG em diferentes doses foi associada a uma redução do título sérico de IgE contra *Dermatophagoides farinae* quando comparado ao grupo controle. No entanto, este mesmo estudo observou que a administração de LGG não pareceu reduzir os sinais clínicos da DA (Marsella, 2009). Diferentemente do que foi observado no presente estudo, observou-se reduções significativas nas pontuações CADESI-04 em comparação com o grupo placebo. Outra pesquisa posterior realizada em um modelo experimental em cães com DA mostrou que a exposição precoce aos probióticos *L. rhamnosus* GG tem efeitos clínicos e imunológicos positivos (Marsella *et al.*, 2012).

Pesquisas científicas em seres humanos possuem respostas conflitantes quanto ao potencial benefício de *L. rhamnosus* GG na DA. Uma meta-análise publicada no ano de 2023 por Hausein *et al.*, 2023 avaliou 75 estudos e os efeitos preventivos e terapêuticos da suplementação probiótica na dermatite atópica infantil. Este estudo confirmou que a *L. rhamnosus* GG foi a cepa mais estudada no mundo, porém revelou-se ineficaz na redução do SCORAD da doença. Outra revisão sistemática publicada no ano de 2013, o qual analisou 21 estudos, demonstrou que a suplementação de *L. rhamnosus* GG foi eficaz na prevenção a longo prazo do desenvolvimento da DA (Foolad *et al.*, 2013).

Além dos potenciais benefícios em cães com DA, o *L. rhamnosus* GG demonstrou ter a capacidade de sobreviver ao trânsito gastrointestinal desta espécie sem causar quaisquer efeitos adversos clinicamente evidentes, (Weese *et al.*, 2002). A ausência de efeitos colaterais também foi verificada no presente estudo.

Optou-se por utilizar a dose 1×10^9 UFC de *L. rhamnosus* GG a cada 24 horas, por existirem pesquisas prévias em diferentes espécies e por experiência prévia da pesquisadora há pelo menos 7 anos. Em medicina humana, um estudo realizado no ano de 2021 e que envolveu 151 crianças com dermatite atópica, utilizou um mix de *Lactobacillus* na dose de 1×10^9 UFC (Cukrowska *et al.*, 2021). Em medicina veterinária Weese *et al.*, 2002 verificou a viabilidade de diferentes doses de *L. rhamnosus* GG em amostras fecais, sendo elas 1×10^9 UFC (grupo 1), 1×10^{10} UFC (grupo 2), 5×10^{10} UFC (grupo 3) e 5×10^{11} UFC (grupo 4) uma vez ao dia por 5 dias. Os grupos 1, 2 e 3 não apresentaram diferenças estatísticas em diferentes doses e o grupo 4, sendo a dose mais alta, a colonização fecal foi significativamente maior do que em qualquer outro grupo ($P < 0,001$).

O tempo de duração de 12 semanas deste estudo, baseou-se em trabalhos publicados em medicina humana em que o tempo médio varia de 8 a 16 semanas, como observado em revisão sistemática publicada no ano de 2022 (Sodré *et al.*, 2022). Embora o tempo estabelecido de 12 semanas possa ter sido adequado para colher os resultados obtidos, pode não capturar efeitos a longo prazo ou variações potenciais na resposta ao tratamento durante um período maior. É importante salientar que um tempo maior de terapia, poderia causar prejuízos na coleta dos dados, pois seria necessária a cooperação do tutor em disponibilizar mais tempo e recursos para deslocar-se até o consultório do veterinário. Um tempo de 12 semanas foi considerado ideal antes de iniciar o projeto, visto que todos os tutores obtiveram boa aceitação ao convite de três visitas para avaliações do estudo.

O horário de administração do tratamento placebo/probiótico foi padronizado para o período da noite, duas horas após a ingestão da última refeição. Não existem estudos que recomendem um horário ideal (manhã, tarde ou noite) para o uso do probiótico *Lactobacillus* em humanos. A escolha de um horário definido é importante para que se possa manter a regularidade do tratamento na rotina familiar (Fleishman, 2021).

Entretanto, sabe-se que a viabilidade dos *Lactobacillus* pode ser prejudicada quando associado a jejum prolongado, a exposição ao ambiente ácido do estômago ou associado a alimentos de difícil digestão, razão pela qual recomenda-se em humanos a ingestão de probióticos de 30 minutos até 2 horas após a ingestão de alimentos. Esse intervalo favorece a redução da acidez do pH encontrado no estômago, tornando o ambiente mais propício aos benefícios do probiótico (Fleishman, 2021).

A padronização de raça não foi realizada como critério de inclusão ou exclusão neste estudo, muito embora tenha se observado que mais da metade dos pacientes são da raça shih tzu (24). Isso pode sugerir, uma preferência geográfica dos tutores quando escolhem uma determinada raça como pet. Estudos publicados apontam a raça shih tzu como uma das raças comumente afetada pela DA, sugerindo uma predisposição racial (Jaeger *et al.*, 2010; Meury *et al.*, 2011; Miller; Griffin; Campbell, 2013).

A dose do Apoquel[®] utilizada em todos os pacientes deste estudo, variou entre 0,4 mg/kg a 0,6 mg/kg a cada 24 horas, ajustando de acordo com o peso de cada paciente, por conveniência de posologia das apresentações comerciais. Respostas individuais da ação do Apoquel[®] relacionada a uma dose que variou entre 0,4 mg/kg a 0,6 mg/kg não foi mensurada e aceita-se que isso não é aplicável como critério de avaliação. A dose e a posologia indicadas na bula de Apoquel[®], foram especificamente selecionadas para maximizar o efeito nas citocinas dependentes de JAK1 associadas à alergia e a condições atópicas em cães (Zoetis[®], 2013).

Os pacientes recebiam dieta comercial seca, controle preventivo de ectoparasitas, xampus hidratantes e limpadores auriculares de marcas variadas. Estes critérios não foram padronizados quanto a suas composições ou marcas. Produtos com ação antibacteriana e antifúngica não foram permitidos. No entanto, todas estas variáveis deveriam ser mantidas de forma contínua e sem alterações durante os 90 dias do estudo. É plausível discutir o fato de que possam existir respostas clínicas individuais diferentes, quanto a estas variáveis. Porém a DAC é uma doença multifatorial, existindo fatores individuais que necessitam de composições diferenciadas para cada paciente (Nuttall *et al.*, 2019). Os critérios de inclusão selecionaram

diferentes pacientes com diagnóstico de DAC, que recebiam Apoquel® a pelo menos 4 meses e apresentavam CADESI – 04 > 59. Embora exista uma ampla gama de CADESI- 04 nos 40 pacientes avaliados, a média entre grupos de CADESI no D0 foi de $p = 0,229$ não havendo diferenças significativas entre eles.

Apesar de não ter sido avaliados escores dermatológicos após o término da suplementação do placebo/probióticos, alguns tutores relataram um aumento da intensidade do prurido após o término do tratamento. Mesmo sem saber se o paciente recebia *L. rhamnosus* GG, alguns tutores solicitaram o retorno de uma suplementação que eles julgavam ser o probiótico, pois para eles era evidente a piora clínica relacionada ao prurido após o término dos 90 dias do estudo. Tutores mais observadores, relataram uma piora, após 20 dias sem a suplementação. Isso pode ser um indicativo de que *L. rhamnosus* GG não permanece viável no intestino por longos períodos, sugerindo que uma suplementação mais longa ou contínua possa ser recomendada para que seus efeitos benéficos se mantenham. Um estudo realizado em cães os quais receberam cinco diferentes cepas de *Lactobacillus* por via oral estavam indetectáveis em amostras de fezes após sete dias da suspensão da suplementação oral (Manninen *et al.*, 2006).

Atualmente, dos 20 pacientes que receberam *L. rhamnosus* GG, seis deles, todos da raça shih tzu, com idades entre 2 e 8 anos e que realizaram avaliações dermatológicas com a autora no ano de 2023, continuam recebendo a suplementação com probióticos diariamente por via oral. Este tratamento foi solicitado pelos tutores e sugerido pela autora, visto que para estes pacientes, após 14 a 20 dias do término de recebimento das cápsulas do projeto, os mesmos apresentaram um aumento da intensidade do prurido.

A maioria dos tutores considerou o produto de fácil administração e gerenciamento. A autora acredita que pacientes que já fazem o uso crônico de tratamentos por via oral, como neste caso, o oclacitinib, tendem a ser mais receptivos ou o tutor com mais habilidade para administrar tratamentos orais.

7 CONCLUSÕES

Em conclusão, este estudo destaca os potenciais benefícios clínicos da combinação de *L. rhamnosus* GG oral com oclacitinib, no controle da dermatite atópica canina. Os resultados deste estudo sugerem que a dose de 1×10^9 UFC de *L. rhamnosus* GG por via oral a cada 24 horas é eficiente quando associado ao oclacitinib (Apoquel®), promovendo um efeito benéfico no controle clínico da DAC. Apesar dos resultados, investigações adicionais serão necessárias para o melhor entendimento desta cepa e de outras cepas que poderiam validar a eficácia e segurança desta abordagem de tratamento. O perfil de tolerância se mostrou satisfatório em todas as faixas etárias estudadas, não havendo reações adversas relacionadas ao uso desta associação.

REFERÊNCIAS

- ABERG, L. VARJONEN, K. AHMAN, S. Results of allergen-specific immunotherapy in atopic dogs with *Malassezia* hypersensitivity: a retrospective study of 16 cases. *Vet Dermatol* v. 28 p: 633–636, 2017.
- ABINPET. Mercado PET BRASIL 2023. Disponível em: <<https://abinpet.org.br/dados-de-mercado/>>. Acesso em: 16 abr. 2023.
- AGLER, C.S. et al. Genome-wide association analysis in West Highland white terriers with atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* v. 209 p.1–6, mar. 2019.
- ANDRADE, P. D. S. M. A. DE et al. Efficacy of Probiotics in Children and Adolescents With Atopic Dermatitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Frontiers in Nutrition*, v. 8, 26 jan. 2022.
- ARPAIA, N. et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*, v. 504, n. 7480, p. 451–455, 2013.
- BENSIGNOR, E.; OLIVRY, T. P-48 Treatment of localized lesions of canine atopic dermatitis with tacrolimus ointment: a blinded, randomized, controlled trial. *Veterinary Dermatology*, v. 15, n. s1, p. 56–56, ago. 2004.
- BERNI CANANI, R. et al. Formula selection for management of children with cow's milk allergy influences the rate of acquisition of tolerance: A prospective multicenter study. *Journal of Pediatrics*, v. 163, n. 3, 2013.
- BETSI, G. I.; PAPADAVID, E.; FALAGAS, M. E. Probiotics for the Treatment or Prevention of Atopic Dermatitis A Review of the Evidence from Randomized Controlled Trials. *Am J Clin Dermatol.* [s.l: s.n.].
- BIZIKOVA, P. et al. Role of genetics and environment in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v.25, n. 2, p. 95-e26, feb. 2015.
- BOND, R. et al. Intradermal test reactivity to *Malassezia pachydermatis* in atopic dogs. *Veterinary Record*, v. 150, n. 14, p. 448–449, abr. 2002.
- CAPURSO, L. Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A Review. *Journal of clinical gastroenterology*, 53 Suppl 1, S1–S41, 2019.
- COSGROVE, S. B. et al. Long-term compassionate use of oclacitinib in dogs with atopic and allergic skin disease: Safety, efficacy and quality of life. *Veterinary Dermatology*, v. 26, n. 3, p. 171-e35, 1 jun. 2015.
- CUKROWSKA, B. et al. The effectiveness of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* strains in children with atopic dermatitis and cow's milk protein allergy: A multicenter, randomized, double blind, placebo controlled study. *Nutrients*, v. 13, n. 4, 1 abr. 2021.
- CHERMPRAPAI, S. et al. Altered lipid properties of the stratum corneum in canine atopic dermatitis. *Biochim Biophys Acta Biomembr.* v.1860: 526–533, 2018.

D'ELIOS, S. et al. Probiotics in the prevention and treatment of atopic dermatitis. *Pediatric Allergy and Immunology*, v. 31, n. S26, p. 43–45, 1 nov. 2020.

DE PESSEMIER, et al., Eixo intestino-pele: conhecimento atual da inter-relação entre disbiose microbiana e doenças da pele. *Microorganismos* 2021, v.9, p.353, 2021.

FAVROT, C. et al. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*, v. 21, n. 1, p. 23–31, 2010.

FAVROT, C. et al. Atopic dermatitis in West Highland white terriers – part 1: natural history of atopic dermatitis in the first three years of life. *Veterinary Dermatology*, v. 31, n. 2, p. 106–116, oct. 2020.

FLEISHMAN, C. Does time of day matter? Disponível em: [s.l: s.n.].
<internationalprobiotics.org/probiotic-supplements-does-time-of-day-matter> 2021.

FILIPE CARVALHO ROCHA, R. Critérios de Decisão de Compra de Ração Para Cães: Um Estudo Exploratório. [s.l: s.n.].

FOOLAD, N. et al. Effect of Nutrient Supplementation on Atopic Dermatitis in Children: A Systematic Review of Probiotics, Prebiotics, Formula, and Fatty Acids. *JAMA Dermatol.* 149(3): p.350–355, 2013.

GARCIA-MAZCORRO, J. F. et al. Effect of the proton pump inhibitor omeprazole on the gastrointestinal bacterial microbiota of healthy dogs. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 80, n. 3, p. 624–636, jun. 2012a.

GARCIA-MAZCORRO, J. F. et al. Abundance and short-term temporal variability of fecal microbiota in healthy dogs. *MicrobiologyOpen*, v. 1, n. 3, p. 340–347, set. 2012b.

GARRAWAY, K. et al. Relationship of the mucosal microbiota to gastrointestinal inflammation and small cell intestinal lymphoma in cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 32, n. 5, p. 1692–1702, 1 set. 2018.

GOLDIN, B. R. et al. Survival of *Lactobacillus* Species (Strain GG) in Human Gastrointestinal Tract. *Digestive Diseases and Sciences*. [s.l: s.n.].

GORBACH, S. L. Probiotics and gastrointestinal health. *The American journal of gastroenterology*, 95(1 Suppl), 2000.

GRZEŚKOWIAK, Ł. et al. Microbiota and probiotics in canine and feline welfare. *Anaerobe Academic Press*, 1 ago. 2015.

GUARNER, F. et al. Probiotics and Prebiotics: 2023 Guidelines global from the World Gastroenterology Organisation. Disponível em: [s.l: s.n.].
<www.worldgastroenterology.org/guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-english>

HAUSEIN, E. et al. Meta-analysis on preventive and therapeutic effects of probiotic supplementation in infant atopic dermatitis: *J Dtsch Dermatol Ges.*v.8, p.833-843, 21 aug. 2023.

HENSEL, P. et al. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Veterinary Research*, v. 11, n. 1, p. 196, 11 dez. 2015.

HENSEL, P. et al. Update on the role of genetic factors, environmental factors and allergens in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v. 35, n. 1, p. 15-24, feb, 2024.

HILL, P. B.; DEBOER, D. J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 81, n. 3-4, p. 169-186, set. 2001.

HILL, P. B.; LAU, P.; RYBNICEK, J. Development of an owner-assessed scale to measure the severity of pruritus in dogs. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.randomizer.org>.

HILL'S ATOPY INDEX®. Disponível em: <http://play.google.com/store/apps/details?id=com.colpal.hills.atopy&hl=en_US>. Acesso em: 10. mai. 2022.

HONNEFFER, J. B. et al. Variation of the microbiota and metabolome along the canine gastrointestinal tract. *Metabolomics*, v. 13, n. 3, 1 mar. 2017.

INNESS, V. L. et al. Molecular characterisation of the gut microflora of healthy and inflammatory bowel disease cats using fluorescence in situ hybridisation with special reference to *Desulfovibrio* spp. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, v. 91, n. 1-2, p. 48-53, fev. 2007.

ISOLAURI, E. et al. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics*, v. 88, n. 1, p. 90-7, jul. 1991.

JAEGER, K. et al. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: A comparison of five locations in three continents. *Veterinary Dermatology*, v. 21, n. 1, p. 119-123, 2010.

JEFFERY, N. D. et al. The association of specific constituents of the fecal microbiota with immune-mediated brain disease in dogs. *PLoS ONE*, v. 12, n. 1, 1 jan. 2017.

JERGENS, A. E. et al. Microbiota-related changes in unconjugated fecal bile acids are associated with naturally occurring, insulin-dependent diabetes mellitus in dogs. *Frontiers in Veterinary Science*, v. 6, n. JUN, 2019.

JIANG, W. et al. The Role of Probiotics in the Prevention and Treatment of Atopic Dermatitis in Children: An Updated Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Pediatric Drugs*Adis, 1 out. 2020.

JOHNSTON, K.; LAMPORT, A.; BATT, R. An unexpected bacterial flora in the proximal small intestine of normal cats. *Veterinary Record*, v. 132, n. 14, p. 362-363, 3 abr. 1993.

KALLIOMÄKI, M. et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet*, v. 357, n. 9262, p. 1076–1079, abr. 2001.

KEITH A. HNILICA; ADAM P. PATTERSON. *Hypersensitivity Disorders. Em: Small animal dermatology: a color atlas and therapeutic guide*. 4. ed. St. Louis: Elsevier, 2016. p. 188–244.

KOURY, J. et al. Phosphodiesterase 4D, miR-203 and selected cytokines in the peripheral blood are associated with canine atopic dermatitis. *PloS One*, v. 14, e. 0218670, 2019.

LALLÈS, J. P. et al. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. *Proceedings of the Nutrition Society*, may, 2007.

LI, Q. et al. Gut Dysbiosis and Its Associations with Gut Microbiota-Derived Metabolites in Dogs with Myxomatous Mitral Valve Disease. 2021.

LISE, M.; MAYER, I.; SILVEIRA, M. Use of probiotics in atopic dermatitis. *Revista da Associacao Medica Brasileira*, v. 64, n. 11, p. 997–1001, 1 nov. 2018.

LOEWINGER, M. et al. The effect of a mixed cannabidiol and cannabidiolic acid based oil on client-owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v. 33, n. 4, p. 329-e77, 1 ago. 2022.

MANGIANTE, G. et al. Lactobacillus plantarum Reduces Infection of Pancreatic Necrosis in Experimental Acute Pancreatitis *Dig Surg*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.karger.com/journals/dsu>.

MANLEY, K. J. et al. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. *Medical Journal of Australia*, v. 186, n. 9, p. 454–457, 7 maio 2007.

MANNINEN, T.J. et al. Alteration of the canine small-intestinal lactic acid bacterium microbiota by feeding of potential probiotics. *Applied and environmental microbiology*, v.72, n.10, p. 6539–6543, oct 2006.

MARSELLA, R. Evaluation of Lactobacillus rhamnosus strain GG for the prevention of atopic dermatitis in dogs. *Am J Vet Res*. 2009 Jun;70(6):735-40. doi: 10.2460/ajvr.70.6.735. PMID: 19496662

MARSELLA, R. et al. Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 241, n. 2, p. 194–207, 15 jul. 2012.

MARSELLA, R.; DE BENEDETTO, A. Atopic dermatitis in animals and people: An update and comparative review. *Veterinary Sciences MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 1 set. 2017.

MARSELLA, R.; SANTORO, D.; AHRENS, K. Early exposure to probiotics in a canine model of atopic dermatitis has long-term clinical and immunological effects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 146, n. 2, p. 185–189, 15 abr. 2012.

MASON, I. S.; LLOYD, D. H. The role of allergy in the development of canine pyoderma. *Journal of Small Animal Practice*, v. 30, n. 4, p. 216–218, abr. 1989.

MASUDA, K. et al. Positive reactions to common allergens in 42 atopic dogs in Japan. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 73, n. 2, p. 193–204, fev. 2000.

MAZRIER, H. et al. Canine atopic dermatitis: breed risk in Australia and evidence of susceptible clade. *Veterinary Dermatology*, v.27, n.3, p. 167-e42, may.2016.

MCFADDEN, R. A. et al. A double-blinded, randomized, controlled, crossover evaluation of a zinc methionine supplement as an adjunctive treatment for canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v. 28, n. 6, p. 569-e138, dez. 2017.

MENTULA, S. et al. Comparison between cultured small-intestinal and fecal microbiotas in beagle dogs. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 71, n. 8, p. 4169–4175, ago. 2005.

MEURY, S. et al. Role of the environment in the development of canine atopic dermatitis in Labrador and golden retrievers. *Veterinary Dermatology*, v. 22, n. 4, p. 327–334, ago. 2011.

MICHELS, G. M. et al. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the safety of lokivetmab (ZTS-00103289), a caninized anti-canine IL-31 monoclonal antibody in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v. 27, n. 6, p. 505-e136, 1 dez. 2016.

MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K. L. (Eds.). *Muller and Kirk's small animal dermatology*. 7. ed. St. Louis: Elsevier, 2013. p. 363–431.

MOCHIZUKI, T. C. et al., Update on the role of cytokines and chemokines in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v. 35, n.1, p. 25-39, feb. 2024.

MORALES, C. A.; SCHULTZ, K. T.; DEBOER, D. J. Antistaphylococcal antibodies in dogs with recurrent staphylococcal pyoderma. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 42, n. 2, p. 137–147, ago. 1994.

MORLANG, M. I. et al. Cutaneous microRNA expression in healthy Labrador and golden retrievers and retrievers with allergic and inflammatory skin diseases. *Vet Dermatol*, v.32, p.331, e.92, 2021.

MUELLER, R. S.; OLIVRY, T.; PRÉLAUD, P. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (2): Common food allergen sources in dogs and cats. *BMC Veterinary Research*, v. 12, n. 1, 12 jan. 2016.

MUFTUOGLU, M. A. T. et al. Effects of probiotics on the severity of experimental acute pancreatitis. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 60, n. 4, p. 464–468, abr. 2006.

NAGLE, T. M. et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial to investigate the efficacy and safety of a Chinese herbal product (P07P) for the treatment of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. [s.l: s.n.].

NAVA, G. M. et al. Probiotic alternatives to reduce gastrointestinal infections: the poultry experience. *Animal Health Research Reviews*, v. 6, n. 1, p. 105–118, jun. 2005.

NOLI, C. Assessing Quality of Life for Pets with Dermatologic Disease and Their Owners. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 49, n. 1, p. 83–93, jan. 2019.

NUTTALL, T. J. et al. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of atopic dermatitis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 254, n. 11, p. 1291–1300, 1 jun. 2019.

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

OHSHIMA-TERADA, Y. et al. Complementary effect of oral administration of *Lactobacillus paracasei* K71 on canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v. 26, n. 5, p. 350-e75, 1 out. 2015.

OLÁH, A. et al. Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *British Journal of Surgery*, v. 89, n. 9, p. 1103–1107, 29 nov. 2002.

OLIVRY, T. et al. Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Archives of Dermatological Research*, v. 288, n. 10, p. 579–585, set. 1996.

OLIVRY, T. et al. Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Dermatology*, v. 25, n. 2, 2014.

OLIVRY, T. et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Veterinary ResearchBioMed Central Ltd*, 16 ago. 2015.

OLIVRY, T. et al. Early activation of Th2/Th22 Inflammatory and pruritogenic pathways in acute canine atopic dermatitis skin lesions. *Journal of Investigative Dermatology*, v. 136, n.10, p. 1961-1969, oct. 2016.

OLIVRY, T. et al. Development of a core outcome set for therapeutic clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis (COSCAD'18). *BMC Vet Res* 14, 238, 2018.

OSUMI, T. et al. A double-blind, placebo-controlled evaluation of orally administered heat-killed *Enterococcus faecalis* FK-23 preparation in atopic dogs. *Veterinary Dermatology*, v. 30, n. 2, p. 127-e36, 1 abr. 2019.

OWCAZRECK- LIPSKA, M. et al. Two loci on chromosome 5 are associated with serum IgE levels in Labrador retrievers. *PloS One*, v.7 n.39176, 2012.

PAN, S. J. et al. Probiotics and allergy in children - An update review. *Pediatric Allergy and Immunology*, jun. 2010.

PICOLLI DA SILVA, L.; NÖRNBERG, J. L. *Ciência Rural*, v. 33, n. 5, set-out. v. 33, n. 5, p. 983–990, 2003.

PRAKOESWA, C. R. S. et al. *Lactobacillus plantarum* IS-10506 supplementation reduced scorad in children with atopic dermatitis. *Beneficial Microbes*, v. 8, n. 5, p. 833–840, 2017.

PRAKOESWA, C. R. S. et al. Beneficial effect of *Lactobacillus plantarum* IS-10506 supplementation in adults with atopic dermatitis: a randomized controlled trial. *Journal of Dermatological Treatment*, v. 33, n. 3, p. 1491–1498, 2022.

PUCHEU-HASTON, C. M. et al. Review: Lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1-T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 1 abr. 2015.

RAHMAN, S. et al. *The Pathology and Immunology of Atopic Dermatitis Inflammation & Allergy-Drug Targets*. [s.l: s.n.].

RATHER, I. A. et al. Probiotics and atopic dermatitis: An overview. *Frontiers in Microbiology* Frontiers Media S.A., 12 abr. 2016.

REITER, L. V.; TORRES, S. M. F.; WERTZ, P. W. Characterization and quantification of ceramides in the nonlesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared with controls. *Veterinary Dermatology*, v. 20, n. 4, p. 260–266, ago. 2009.

ROQUE, J.B. et al. IgE responsiveness to dermatophagoides farinae in West Highland white terrier dogs is associated with region on CFA35. *J Hered*, v.102, p.74–80, 2011.

ROQUE, J. B. et al. Atopic dermatitis in West Highland white terriers is associated with a 1.3-mb region on CFA 17. *Immunogenetics*, v. 64, p. 209–217, 2012.

ROSTAHER, A et al. Comparison of the Gut Microbiome between Atopic and Healthy Dogs: Preliminary Data. *Animals*, v. 12, set. 2022

RITCHIE, L. E.; STEINER, J. M.; SUCHODOLSKI, J. S. Assessment of microbial diversity along the feline intestinal tract using 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 66, n. 3, p. 590–598, dez. 2008.

RYBNÍČEK, J. et al. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Veterinary Dermatology*, v. 20, n. 2, p. 115–122, abr. 2009.

ŞAHİN, T. et al. Effects of the probiotic agent *Saccharomyces Boulardii* on the DNA damage in acute necrotizing pancreatitis induced rats. *Human and Experimental Toxicology*, v. 26, n. 8, p. 653–661, ago. 2007.

SHIMADA, K. et al. Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol*. v.20: 541–546, 2009.

SALZMANN, C. A. et al., Genome-wide linkage study of atopic dermatitis in West Highland white terriers. *BMC Genet*, v.12, p.37, 2011.

SALZO, P. S.; CASTRO, R. DE C. C. Dermatite Atópica. Em: LARSSON, C. E.; LUCAS, R. (Eds.). Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária. 2. ed. São Caetano do Sul: Interbook, 2020. p. 599–619.

SANCHEZ, S. B. et al. Fecal microbiota in client-owned obese dogs changes after weight loss with a high-fiber-high-protein diet. *PeerJ*, v. 8, n.5 out. 2020.

SANTORO, D. Therapies in Canine Atopic Dermatitis: An Update. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* W.B. Saunders, 1 jan. 2019.

SANTORO, D. et al. Review: pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host-microorganism interaction. *Vet Dermatol.* v.26, n. 2 p.84–94, feb 2015.

SANTORO, D. et al., Update on the skin barrier, cutaneous microbiome and host defence peptides in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology.* v. 35, n.1. p. 5-14. nov.2023.

SARGEANT, J. M. et al. Pre-harvest Interventions to Reduce the Shedding of *E. coli* O157 in the Faeces of Weaned Domestic Ruminants: A Systematic Review. *Zoonoses and Public Health*, v. 54, n. 6–7, p. 260–277, set. 2007.

SODRÉ, C.S. et al. The effect of probiotics on the clinical status of adult patients with atopic dermatitis: a systematic review. *Eur J Med Res* v.27, p.94, 2022.

SOUZA, C. P. et al. 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*, v. 29, n. 6, p. 489-e164, 1 dez. 2018.

SUCHODOLSKI, J. S. Diagnosis and interpretation of intestinal dysbiosis in dogs and cats. *Veterinary Journal* Bailliere Tindall Ltd, 1 set. 2016.

SUCHODOLSKI, J. S. Analysis of the gut microbiome in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology* American Society for Veterinary Clinical Pathology, 1 fev. 2022.

SUCHODOLSKI, J. S.; CAMACHO, J.; STEINER, J. M. Analysis of bacterial diversity in the canine duodenum, jejunum, ileum, and colon by comparative 16S rRNA gene analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 66, n. 3, p. 567–578, dez. 2008.

SUMMERS, S. C. et al. The fecal microbiome and serum concentrations of indoxyl sulfate and p-cresol sulfate in cats with chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 33, n. 2, p. 662–669, 1 mar. 2019.

SWANSON, K. S. et al. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME Journal*, v. 5, n. 4, p. 639–649, abr. 2011.

TENGALL, K. et al. Genome-wide analysis in German shepherd dogs reveals association of a locus on CFA 27 with atopic dermatitis. *PLoS Genet*, v.9, n.1003475, 2013.

TENGALL, K. et al. Transcriptomes from German shepherd dogs reveal differences in immune activity between atopic dermatitis affected and control skin. *Immunogenetics*, v.72, p. 315–323, 2020.

UMBOROWATI, M. A. et al. The role of probiotics in the treatment of adult atopic dermatitis: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Health, Population and Nutrition Bio Med Central Ltd*, 1 dez. 2022.

WEESE, J. S.; ANDERSON, M. E. C. Preliminary evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG, a potential probiotic in dogs. *The Canadian veterinary journal = La revue veterinaire canadienne*, v. 43, n. 10, p. 771–4, out. 2002.

WENK, C. Prebiotics in companion animals. Em: LAUE, D. K.; TUCKER, L. A. (Eds.). *Recent advances in pet nutrition*. Nottingham: Nottingham University Press, 2006. p. 47–55.

WERNIMONT, S. M. et al. The Effects of Nutrition on the Gastrointestinal Microbiome of Cats and Dogs: Impact on Health and Disease. *Frontiers in Microbiology Frontiers Media S.A.*, 25 jun. 2020.

WESTON, S. et al. Effects of probiotics on atopic dermatitis: A randomised controlled trial. *Archives of Disease in Childhood*, v. 90, n. 9, p. 892–897, set. 2005.

WILHEM, S.; KOVALIK, M.; FAVROT, C., Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*. v.22(2):143–149, 2011.

WHITESIDE, S. A. et al. The microbiome of the urinary tract - A role beyond infection. *Nature Reviews Urology Nature Publishing Group*, 1 jan. 2015.

WYNN, S. G. Probiotics in veterinary practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 234, n. 5, p. 606–613, 1 mar. 2009.

YAMAZAKI, C.; ROSENKRANTZ, W.; GRIFFIN, C. Pilot evaluation of *Enterococcus faecium* SF68 as adjunctive therapy for oclacitinib-responsive adult atopic dermatitis in dogs. *Journal of Small Animal Practice*, v. 60, n. 8, p. 499–506, 2019.

YOUN, H.-Y. et al. Allergens causing atopic diseases in canine. *Journal of veterinary science*, v. 3, n. 4, p. 335–41, dez. 2002.

ZUR, G. et al. Zur G, Ihrke PJ, White SD, Kass PH. 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. *Vet Dermatol*. v.13(2):89–102, 2002.

ZOETIS ® Monografia técnica do Apoquel ®. Disponível em: <https://www.zoetis.com.br/_locale-assets/arquivos/animais-de-companhia/biblioteca/monografia-de-produtos/apoquel-monografia-tecnica.pdf>. Acesso em: 12. mar. 2023.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título da Pesquisa: Uso de *Lactobacillus rhamnosus* GG associado a oclacitinib, em cães com diagnóstico de dermatite atópica canina.

Pesquisador(a): Mônica Cabral Cardoso

Orientador(a): Dr. André Fleck

Mestrado em Saúde Animal– Universidade de Caxias do Sul

1. Natureza da pesquisa: o PET, através de seu tutor está sendo convidado(a) a participar desta pesquisa que tem como finalidade avaliar se a associação de *Lactobacillus* a terapia de oclacitinib auxiliará nos alívios dos sintomas de dermatite atópica canina.
2. Participantes da pesquisa: Serão selecionados 40 cães com Dermatite atópica canina, que já sejam pacientes da Dermalove Dermatologia Veterinária. Vinte animais receberão placebo e 20 o lactobacillus, o trabalho de pesquisa é duplo cego, somente a Farmácia de manipulação saberá o que contem no frasco (lactobacillus ou placebo hipoalergênico), os frascos serão identificados por números de 1 a 40.
3. Envolvimento na pesquisa: ao participar deste estudo seu PET permitirá que a pesquisadora Mônica Cabral Cardoso realize três avaliações presenciais (dia 0, 45, 90). O Tutor do PET tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o PET. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto, por e-mail dermalove@hotmail.com e, se necessário através do WhatsApp 54 32020307.
4. Sobre as entrevistas: Serão realizados três encontros de 15 minutos cada, para avaliar os parâmetros de CADESI-4.
5. Riscos e desconforto: a participação nesta pesquisa não traz riscos ou desconforto ao animal. Os procedimentos adotados nesta pesquisa foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Caxias do Sul.
6. Confidencialidade: todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o(a) pesquisador(a) e o(a) orientador(a) terão conhecimento dos dados.
7. Benefícios: ao participar desta pesquisa o tutor do PET não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre a associação de terapia com *Lactobacillus* e o alívio dos sintomas da dermatite atópica, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa gerar uma tese de mestrado e publicado em revista internacional, auxiliando outros pesquisadores no mundo onde pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.
8. Um cupom de desconto de 15% na compra do Apoquel com a Dermalove por 90 (noventa) dias.
9. Pagamento: o tutor do PET não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem.

Obs: Não assine esse termo se ainda tiver dúvida a respeito.

Consentimento Livre e Esclarecido

Tendo em vista os itens acima apresentados, sendo o tutor responsável, eu _____, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento para que meu PET nome _____, raça _____, idade _____ participe da pesquisa. Declaro que recebi cópia deste termo de consentimento, e autorizo a realização da pesquisa e a divulgação dos dados obtidos neste estudo.

Assinatura do Tutor do Pet Participante da Pesquisa

Assinatura do(a) Pesquisador(a)
Mônica Cabral Cardoso

**APÊNDICE B – TRABALHO SUBMETIDO A REVISTA VET
DERMATOLOGY EM NOVEMBRO DE 2023**

**A Clinical Study: Assessing *Lactobacillus rhamnosus* as Complementary Therapy
for Canine Atopic Dermatitis through a Double-Blind, Placebo-Controlled Trial.**

Running title: Assessing *Lactobacillus rhamnosus* in Canine Atopic Dermatitis

Mônica Cabral Cardoso¹; Tamiris Silva Lopes¹; Marina Cabral Lemos²; Cristiane Deon Figueiredo³; André Felipe Streck^{1*}

¹ Laboratório de Diagnóstico em Medicina Veterinária, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, Campus-Sede, Caxias do Sul, RS 95070-560, Brazil.

² Departamento de Fisioterapia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rua Sarmiento Leite 245 – Centro Histórico, Porto Alegre, RS 90050-170, Brazil.

³ Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.

* Corresponding author: afstreck@ucs.br

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Mônica Cabral Cardoso: Conceptualization; investigation; writing – original draft; methodology; writing – review and editing, project administration. Tamiris Silva Lopes: Writing – review and editing. Marina Cabral Lemos: Statistical analysis, writing – review and editing. Cristiane Deon Figueiredo: Writing – review and editing, André Felipe Streck: Investigation, Writing - review & editing, Supervision, Formal analysis, Project administration, Methodology.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank the companies, Zoetis®, Soft Care® and Vetlog® distributors for supplying products used in this study.

FUNDING INFORMATION

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest relevant to this article.

A Clinical Study: Assessing *Lactobacillus rhamnosus* as Complementary Therapy for Canine Atopic Dermatitis through a Double-Blind, Placebo-Controlled Trial.

Abstract

Background: Canine atopic dermatitis is a chronic inflammatory condition with an increasing prevalence, resulting from an interaction between individual genetic and environmental factors.

Objective: To evaluate the clinical efficacy of the combination of oclacitinib and oral *Lactobacillus rhamnosus* in dogs with atopic dermatitis.

Animals: Forty privately owned, nonseasonally atopic dogs, undergoing treatment with oclacitinib for at least four months were used.

Materials and methods: These animals were divided into two randomized double-blind groups of twenty individuals: one received *L. rhamnosus* and the other placebo. Clinical signs were assessed using the CADESI-04 and owner-reported pruritus (pVAS) scores.

Results: Statistical analysis revealed significant reductions in CADESI-04 scores in the test group at day 45 and day 90 compared to the placebo group. pVAS scores also had significant reductions in the test group from day 0 to day 45. No adverse effects were observed throughout the study.

Conclusions and clinical relevance: These results demonstrated the potential clinical benefit of *L. rhamnosus* when combined with oclacitinib in the treatment of CAD. However, more research with larger and longer treatment durations is needed to confirm and understand long-term effects. This study contributes valuable information on the management of CAD, offering promising evidence for a new treatment approach.

KEYWORDS: allergy, dog, oclacitinib, probiotics, microbiome

INTRODUCTION

Canine atopic dermatitis (CAD) represents a persistent inflammatory condition, with its prevalence has been steadily increasing in recent decades, potentially linked to an intricate interplay between genetic and environmental factors. The initial clinical indicators typically manifest in dogs aged six months to six years, with a higher incidence among animals between one and three years old. Classical clinical signs include erythema and pruritus, primarily

affecting regions such as the interdigital areas, flanks, abdomen, armpits, face, and ears (Marsella et al., 2012a).

Therapeutic objectives for CAD encompass early intervention to manage its onset, slowing down its pathological progression, and enhancing the patient's quality of life. Furthermore, it is important to minimize the costs and adverse effects of medication and complexity of treatment regimens (Nuttall et al., 2019).

Systemic agents such as oral glucocorticoids, cyclosporine, and oclacitinib maleate have demonstrated efficacy in managing chronic CAD presentations. These treatments can be administered either concurrently or subsequent to the management of identifiable exogenous triggers. Furthermore, adjunct therapies such as weekly emollient-based shampoo applications, dietary adjustments or supplementation rich in essential fatty acids (with a notable emphasis on omega-6), recombinant interferon therapy, and the localized application of corticosteroids or tacrolimus have shown promising results in specific cases (Olivry et al., 2014). Notably, the Janus kinase inhibitor called oclacitinib (Apoquel®) was developed, considered safe and effective in the treatment of allergic itching. However, despite treatment efforts, many animals continue to exhibit clinical signs (Marsella and De Benedetto, 2017).

Recent findings have highlighted a potential association between CAD and dysbiosis in the intestinal microbiota (Kawano et al., 2023). The microbiome is a key regulator of the immune system as it maintains homeostasis through bidirectional communication with various tissues and organs (De Pessemier et al., 2021). The “gut-skin” axis hypothesis has been proposed, leading to the exploration of the prophylactic potential of probiotics to improve the intestinal environment, rebalance immune responses, and regulate metabolic activity (Fang et al., 2021). Therefore, the aim of this study is to evaluate the clinical efficacy of the combination of oclacitinib and oral *Lactobacillus rhamnosus* in dogs diagnosed with CAD.

MATERIAL AND METHODS

Forty dogs (sixteen males and twenty-four females) were enrolled in this study. The average age was 6.58 ± 3.4 years. The included breeds were Shih Tzu (24), mixed breed (4), Yorkshire Terrier (3), German Spitz (1), Maltese (1), French Bulldog (2), Miniature Poodle (2), Pekingese (2), and Shar Pei (1).

The dermatological diagnosis of the patients was based on their clinical history of chronic pruritus nonseasonally. Other significant causes of pruritus, such as scabies, secondary

infections, allergic reactions to ectoparasite bites, and food allergies were excluded (Hensel et al., 2015). The exclusion criteria were stringent, eliminating any subjects with concurrent endocrinopathies or neoplasms, and those who have been subjected to alternative treatments such as cyclosporine, monoclonal therapy, immunotherapy, oral or topical corticosteroids within the preceding 4 months, and those on systemic antibiotics for dermatological conditions within the preceding 4 weeks.

To ensure the homogeneity of the study group, it was mandatory that all subjects received Zoetis® oclacitinib at a dosage of 0.4 mg/kg every 24 hours for a minimum duration of 4 months. Eligible subjects exhibited mild to moderate pruritus without secondary dermatological infections. Concurrent therapies, including topical applications (baths, ear cleaning otological solutions), preventive ectoparasite management, and nutritional intake remained consistent with established frequencies, for at least 4 months prior, alongside the administration of oclacitinib throughout the 12-week study duration.

Participants were randomly divided into two double-blind groups of 20 individuals each. The test group received *L. rhamnosus*, while the placebo group received an equivalent dose of placebo. *L. rhamnosus* and placebo were administered at a dose of 10^9 colony forming units (CFU) every 24 hours for 90 days. The groups were evaluated periodically on days zero (D0), forty-five (D45) and ninety (D90).

The severity of clinical signs was assessed using the CADESI-04 (Olivry et al., 2014) and pruritus was scored by owners using a visual analogue pruritus scale (pVAS) (Rybníček et al., 2009). For better visualization, owners were provided with a printed pVAS scale (provided by Zoetis®) at each visit to mark their pet's itching level, which was later scored from 0 to 10.

Statistical analyzes were calculated using IBM SPSS Statistics version 26.0 software. For all statistical analyses, a significance level of 5% ($p \leq 0.05$) was adopted. The normality of the data was confirmed using the Shapiro-Wilk test. The pVAS scale and CADESI-04 scores before and after treatment in the intervention and control groups were analyzed using the paired Student's t test and the differences between different groups were analyzed with the independent samples Student's t test. The study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the University of Caxias do Sul (number 0008/2022) and written consent from the owners was obtained.

RESULTS

Significant changes in CADESI-04 scores over time were observed in *Lactobacillus rhamnosus* (test group). The initial score on Day 0 (D0) was 16.10 ± 6.66 , decreasing to 10.80 ± 5.81 by Day 45 (D45) ($p < 0.01$) and then slightly decreased to 9.60 ± 5.60 by D90 ($p < 0.01$, compared to D0) in the test group. The total score reduction from D0 to D90 was a statistically significant 6.5 ($p < 0.01$). For the placebo group, the initial score on D0 was 18.95 ± 8.03 , decreasing to 14.55 ± 5.8 by D45 ($p = 0.013$) and increased to 15.15 ± 10.82 by D90 ($p = 0.157$, compared to D0). When comparing both groups by CADESI-04, a significant reduction in the test group was identified at the second evaluation (D45) (difference of 3.75 ± 1.84 , $p = 0.049$) and at the third evaluation (D90) (difference of 5.55 ± 2.72 , $p = 0.049$).

Regarding pVAS scores, significant changes over time were observed in the test group, with a score reduction of 5.39 ± 1.6 to 4.07 ± 1.84 by D45 ($p < 0.01$). No significant changes were observed between D45 and D90 (0.25 ± 1.8 , $p = 0.54$). The total score reduction from D0 to D90 was 1.56 ($p < 0.01$). In the placebo group, the initial score on D0 was 4.87 ± 1.64 , increasing to 5 ± 1.45 by D45 ($p = 0.738$) and decreased to 4.52 ± 1.88 by D90 ($p = 0.514$, compared to D0). When comparing pVAS scores between the test group and the placebo group, no significant differences were observed at any of the evaluation points. Throughout the study, no adverse effects were observed in any of the participating dogs.

DISCUSSION

The results of this study demonstrate a statistically significant reduction in CADESI-04 scores and pruritus in the *Lactobacillus rhamnosus* group (test group), suggesting a potential therapeutic benefit. The absence of adverse effects throughout the study enhances the treatment's safety profile, a crucial aspect for clinical applications. These findings align with prior research that has shown reduced immunological indicators and an improvement in clinical symptoms in CAD following oral and topical administration of *L. rhamnosus* and its combination with *L. reuteri* (Marsella, 2009; Marsella et al., 2012a, Santoro et al., 2021).

Although the immunomodulatory mechanisms of *L. rhamnosus* are not fully understood, it's established that probiotics can interact with dendritic cells, helping to balance to Th1/Th2 immunity and enhance Treg activity (De Pessemier et al., 2021). Specifically, *L. rhamnosus* can influence the atopic inflammatory cascade by inducing interleukins and interferons production and reducing IgE levels (Ohshima-Terada et al., 2015). Additionally,

probiotic microorganisms can occupy a niche, preventing the invasion of more pathogenic bacteria (De Pessemier et al., 2021).

In conclusion, this study provides promising evidence for the potential clinical efficacy of the oral *Lactobacillus rhamnosus* in managing canine atopic dermatitis. Despite the important results, potential limitations can be inferred. While the study's sample size of 40 dogs offers valuable insights, a larger and less diverse population would enhance the external validity of the findings. Furthermore, the 12-week duration, although suitable for certain outcomes, may not capture the long-term effects or potential variations in treatment response over an extended period.

REFERENCES

De Pessemier B, Grine L, Debaere M, Maes A, Paetzold B, Callewaert C. Gut-skin axis: Current knowledge of the interrelationship between microbial dysbiosis and skin conditions. *Microorganisms* 2021;9(2):353. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020353>

Fang Z, Li L, Zhang H, Zhao J, Lu W, Chen W. Gut microbiota, probiotics, and their interactions in prevention and treatment of atopic dermatitis: A review. *Front Immunol.* 2021;12:720393. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.720393>

Hensel P, Santoro D, Favrot C, Hill P, Griffin C. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res.* 2015; 11:196. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0515-5>

Kawano K, Iyori K, Kondo N, Yamakawa S, Fujii T, Funasaka K, Hirooka Y, Tochio T. Clinical effects of combined *Lactobacillus paracasei* and kestose on canine atopic dermatitis. *Pol J Vet Sci.* 2023;26(1):131-136. <https://doi.org/10.24425/pjvs.2023.145014>

Marsella, R. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG for the prevention of atopic dermatitis in dogs. *Am J Vet Res.* 2009; 70(6):735–740. <https://doi.org/10.2460/ajvr.70.6.735>

Marsella, R., Santoro, D., Ahrens, K. Early exposure to probiotics in a canine model of atopic dermatitis has long-term clinical and immunological effects. *Vet Immunol Immunopathol.* 2012a; 146(2):185–189. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.02.013>

Marsella R, De Benedetto A. Atopic dermatitis in animals and people: An update and comparative review. *Vet Sci.* 2017;4(3):37. <https://doi.org/10.3390/vetsci4030037>

Nuttall TJ, Marsella R, Rosenbaum MR, Gonzales AJ, Fadok VA. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of atopic dermatitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2019;254(11):1291-1300. <https://doi.org/10.2460/javma.254.11.1291>

Ohshima-Terada, Y., Higuchi, Y., Kumagai, T., Hagihara, A., & Nagata, M. (2015). Complementary effect of oral administration of *Lactobacillus paracasei* K71 on canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.*, 26(5), 350–e75. <https://doi.org/10.1111/vde.12224>

Olivry T, Saridomichelakis M, Nuttall T, Bensignor E, Griffin CE, Hill PB; International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Vet Dermatol.* 2014;25(2):77-85. <https://doi.org/10.1111/vde.12107>

Rybníček J, Lau-Gillard PJ, Harvey R, Hill PB. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Vet Dermatol.* 2009;20(2):115-22. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2008.00728.x>

Santoro D, Fagman L, Zhang Y, Fahong Y. Clinical efficacy of spray-based heat-treated lactobacilli in canine atopic dermatitis: a preliminary, open-label, uncontrolled study. *Vet Dermatol.* 2021;32(2):114-e23. <https://doi.org/10.1111/vde.12915>

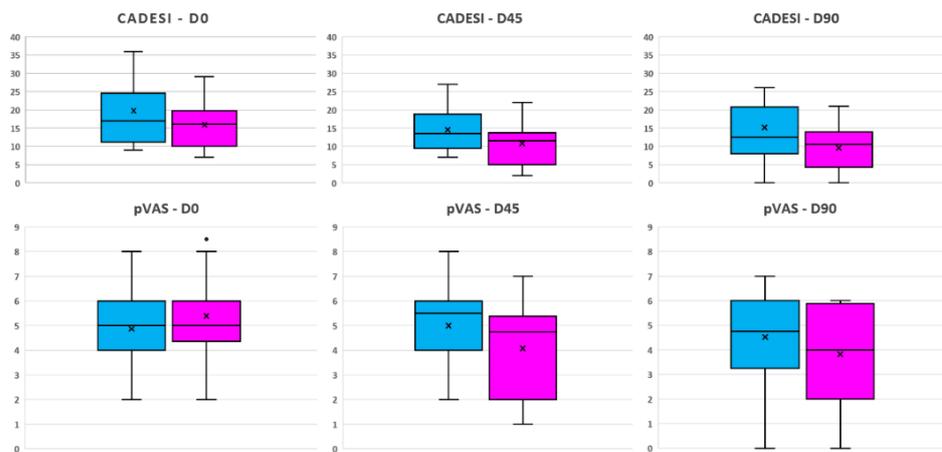


Figure 1. CADESI score and pVAS assessed on days zero (D0), forty-five (D45) and ninety (D90) of the placebo group (blue) and test group (purple). The box plot graphic represents the lowest and higher data in the data set (upper and lower line), the lower quartile and upper quartile (boxes), median (main line) and mean (x).

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
CEUA-UCS

Caxias do Sul, 13 de maio de 2022.

Of.CEUA: 010/2022

Número: 008/2022

Título: "USO DE *LACTOBACILLUS RHAMANOSUS* ASSOCIADO A OCLACITINIB EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA CANINA".

Investigadores Principais: Prof. André Felipe Streck

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Caxias do Sul, em reunião extraordinária do dia 13 de maio de 2022, analisou o projeto supracitado e o considerou **aprovado**, de acordo com os preceitos da Lei n. 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto n. 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

| | |
|----------------------------------|--|
| FINALIDADE | () ENSINO (X) PESQUISA CIENTÍFICA |
| Vigência da autorização | 04 / 2024 |
| Espécie / linhagem / raça | Cão doméstico (<i>Canis lupus familiaris</i>) |
| No. de animais | 40 |
| Peso / Idade | Variável |
| Sexo | Variável |
| Origem | Animais em atendimento em consultórios particulares de Caxias do Sul |

Atenciosamente,

Prof. Dr. Matheus Parmegiani Jahn
Coordenador CEUA/UCS

CAMPUS-SEDE

Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130 – B. Petrópolis – CEP 95070 – 560 – Caxias do Sul – RS – Brasil

Ou: Caixa Postal 1352 – CEP 95020 – 972 – Caxias do Sul – RS – Brasil

Telefone / Telefax (54) 3218 2100 – www.ucs.br

Entidade Mantenedora: Fundação Universidade de Caxias do Sul – CNPJ 88648761/0001-03 – CGCTE 029/0089530

Modelo SPIN – 130033