

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM CAVALOS COM DERMATOPATIAS  
ALÉRGICAS**

**VANESSA JEGAN**

**PORTO ALEGRE  
2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM CAVALOS COM DERMATOPATIAS  
ALÉRGICAS**

**AUTOR: VANESSA JEGAN**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Veterinária da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

**ORIENTADOR: NÉLSON ALEXANDRE KRETZMANN FILHO**

**PORTO ALEGRE**

**2024**

### CIP - Catalogação na Publicação

Jegan, Vanessa  
EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM CAVALOS COM DERMATOPATIAS  
ALÉRGICAS / Vanessa Jegan. -- 2024.  
71 f.  
Orientador: NÉLSON ALEXANDRE KRETZMANN FILHO.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos, Porto  
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Equinos. 2. alergia. 3. citocinas. I. KRETZMANN  
FILHO, NÉLSON ALEXANDRE, orient. II. Título.

**VANESSA JEGAN**

**EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM CAVALOS COM DERMATOPATIAS  
ALÉRGICAS**

**APROVADO POR:**

---

**Prof. Dr. Nélon Alexandre Kretzmann Filho**  
**Orientador e Presidente da Comissão**

---

**Prof. Dr. Eduardo Malschitzky**  
**Membro da Comissão**

---

**Prof.a Dra. Anamaria Telles Esmeraldino**  
**Membro da Comissão**

---

**Dra.. Veronica La Cruz Bueno**  
**Membro da Comissão**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu querido marido, Henrique, cujo amor, incentivo e suporte foram a força motriz que me sustentou em cada etapa desta jornada. Sem você, este sonho não seria possível.

À minha mãe, minha tia e minha irmã, que sempre me envolveram com apoio incondicional e vibraram com cada conquista minha.

Ao meu pai, que mesmo não estando mais entre nós, continua presente com seu apoio eterno.

Ao Prof. Nelson Alexandre Kretzmann, cuja orientação e crença em mim desde o Mestrado foram fundamentais.

Aos meus colegas do REPROLAB, especialmente ao Luiz Augusto, agradeço não só pelo aprendizado conjunto, mas também pela amizade e convivência fraterna que tornaram este percurso mais leve e significativo.

E, finalmente, aos animais que participaram deste estudo, minha profunda gratidão por proporcionarem este aprendizado. Suas contribuições silenciosas são a essência deste trabalho.

"Aquele que vê a si mesmo em todos os seres e todos os seres em si mesmo,  
tem a verdadeira sabedoria." – Shri Krishna, Bhagavad Gita.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Epiderme normal, evidenciando proeminente zona da membrana basal (seta) (Scott; Miller, 2011).....	17
Figura 2	Sensibilização alérgica. Indução de células T auxiliares tipo 2 (Th2) após apresentação dos alérgenos às células T pelas células dendríticas, após estimulação pela IL-4. As células Th2 produzem citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. As células B passam a produzir IgE, que se ligam a receptores específicos em mastócitos e basófilos. Ao encontrar o mesmo alérgeno pela segunda vez, ocorre a degranulação dos mastócitos e basófilos, levando à hipersensibilidade imediata (Adaptado de Fujita et al., 2012).....	19
Figura 3	Representação esquemática das interações documentadas de mastócitos humanos com outras células e estruturas na pele. (Goldstein; Wintroub, 1993).....	21
Figura 4	Urticária recorrente em cavalo atópico. Biópsia de pele revela acúmulo perivascular de eosinófilos e edema dérmico pronunciado (Scott; Miller, 2011).....	29
Figura 5	Componentes e sequência do levantamento do histórico (adaptado de Littlewood et al., 2002).....	30
Figura 6	Procedimentos de exame clínico e diagnóstico (adaptado de Littlewood et al., 2002).....	31
Figure 7	Mean ( $\pm$ SD) gene expression of target cytokines (Interleukin 4, Interleukin 13) in the blood leukocytes from different study groups: Control, IBH, Atopic. NS no significant difference, (*) represent significant differences ( $P < 0.05$ ) between groups.....	40
Figure 8	Mean ( $\pm$ SD) gene expression of target cytokines (Tissue Inhibitor of Metalloprotease-2, Matrix Metalloproteinase 2) in the blood leukocytes from different study groups: Control, IBH, Atopic. NS no significant difference, (*) represent significant differences ( $P < 0.05$ ) between groups.....	41
Figure 9	Mean ( $\pm$ SD) gene expression of target cytokines (Interferon gamma, Interleukin 1 $\beta$ ) in the blood leukocytes from different study groups: Control, IBH, Atopic. NS no significant difference, (*) represent significant differences ( $P < 0.05$ ) between groups.....	41

Figure 10	Mean ( $\pm$ SD) gene expression of target cytokines (TNF- $\alpha$ ) in the blood leukocytes from different study groups: Control, IBH, Atopic. NS no significant difference, (*) represent significant differences ( $P < 0.05$ ) between groups.....	42
Figure 11	Heatmap spearman correlation ( $R^2$ ) of the target cytokines in the blood leukocytes from IBH Group. Significant correlations ( $P < 0.05$ ) between groups: IL4-IFN ( $P=0.024$ ), IL4-TIMP2 ( $P=0.022$ ), INF-TIMP2 ( $P=0.017$ ).....	42
Figure 12	Heatmap spearman correlation ( $R^2$ ) of the target cytokines in the blood leukocytes from Atopic Group. Significant correlations ( $P < 0.05$ ) between groups: IL4-IFN ( $P=0.073$ ), IL4-IL1 ( $P=0.060$ ), INF-IL1 ( $P=0.00$ ).....	43
Figure 13	Horse of the Atopic Group showing self-induced excoriation, hypotrichosis and alopecia in dorsolateral region of the neck and trunk (personal).....	43
Figure 14	Horse of the IBH Group showing self-induced abrasions, alopecia and crusts in rump and base of tail (personal).....	44
Figure 15	Horse of the IBH Group showing papules, alopecia, lichenification and hyperpigmentation in ears and base of the mane (personal).....	44



## LISTA DE TABELAS

Table 1	Details of the sequences used for quantitative real-time polymerase chain reaction amplification of mRNA from equine blood samples.....	38
---------	---	----

# EXPRESSÃO DE CITOCINAS EM CAVALOS COM DERMATOPATIAS ALÉRGICAS

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão de interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ), inibidor tecidual de metaloproteinases 2 (TIMP-2) e matriz metaloproteinase 2 (MMP-2), em equinos com Dermatite Atópica (DA) e Hipersensibilidade a Picada de Insetos (HPI), identificando diferenças e/ou similaridades em sua expressão gênica e apresentação clínica. Trinta e dois cavalos foram incluídos no estudo. Os animais foram divididos em dois grupos. Quatorze animais constituíram o Grupo Controle (cavalos não alérgicos) e dezoito animais constituíram o Grupo Alérgico. O Grupo Alérgico foi então separado em dois subgrupos de acordo com o diagnóstico clínico, denominados Dermatite Atópica (DA) (onze cavalos) e Hipersensibilidade à Picada de Insetos (HPI) (sete cavalos). Os critérios de inclusão do Grupo Controle exigiam ausência de história prévia de prurido sazonal ou perene, urticária recorrente ou doença respiratória, e ausência de lesões cutâneas. Cada cavalo deste estudo foi submetido à coleta de 4ml de amostra de sangue total em tubo de EDTA, estas amostras foram encaminhadas ao laboratório para a realização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real (qPCR). A expressão gênica de IL-4, IFN- $\alpha$ , TIMP-2, IL-1 $\beta$ , MMP-2, TNF- $\alpha$  e IL-13 foi verificada em todas as amostras de sangue avaliadas. Os cavalos HPI apresentaram maior expressão de IL-4 que os Controles. Os cavalos HPI e Controle apresentaram maior expressão de TIMP2 que os cavalos DA. Os cavalos HPI apresentaram maior expressão de MMP2 que os Controles. Os cavalos IBH apresentaram maior expressão de IL13 que os Controles. Não foram observadas diferenças na expressão gênica de IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Em conclusão, nosso estudo forneceu elucidacões valiosas sobre a prevalência e apresentação clínica de cavalos com DA e HPI. O estudo salientou diferenças moleculares significativas, incluindo maior expressão gênica de IL-4 e IL-13 em cavalos com HPI, indicando

um painel imunológico complexo envolvendo caminhos inibitórios e regulação dos níveis de inflamação.

Palavras-chave: equinos, alergia, expressão de citocinas.

## **EXPRESSION OF CYTOKINES IN HORSES WITH ALLERGIC DERMATOPATHIES**

### **ABSTRACT**

*The aim of the present study was to evaluate the expression of interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 4 (IL-4), interleukin 13 (IL-13), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), tumour necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2), and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in horses with Atopic Dermatitis (AD) and Insect Bite Hypersensitivity (IBH), identifying differences and/or similarities in their gene expression and clinical presentation. Thirty-two horses were included in the study. The animals were divided into two groups. Fourteen animals constituted the Control Group (non-allergic horses) and eighteen animals constituted the Allergic Group. The Allergic Group was then separated into two subgroups according to clinical diagnosis, named Atopic Dermatitis (eleven horses) and Insect Bite Hypersensitivity (seven horses). The inclusion criteria for the Control Group required the absence of a history of seasonal or perennial pruritus, recurrent urticaria or respiratory disease, and the absence of skin lesions. Each horse in this study underwent the collection of 4ml of hole blood sample in an EDTA tube, which was sent to the laboratory for real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) analysis. Gene expression of IL-4, IFN- $\alpha$ , TIMP-2, IL-1 $\beta$ , MMP-2, TNF- $\alpha$ , and IL-13 was verified in all evaluated blood samples. The IBH horses showed higher IL-4 expression than the controls. The IBH and Control horses showed higher TIMP2 expression than the Atopic horses. The IBH horses showed higher MMP2 expression than the controls. The IBH horses showed higher IL-13 expression than the controls. No differences were observed in the gene expression of IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ . In conclusion, our study provides valuable insights into the prevalence and clinical presentation of AD and IBH in horses. The study highlighted significant molecular differences, including greater IL-4 and IL-13 expression in IBH horses, indicating a complex immunological landscape involving inhibition pathways and regulation of inflammation levels.*

*Keywords: horses, allergies, cytokin expression.*

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE</b> .....	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>EMBASAMENTO TEÓRICO</b> .....	<b>16</b>
<b>3.1</b>	<b>Pele</b> .....	<b>16</b>
<b>3.2</b>	<b>Imunologia tegumentar e respostas alérgicas</b> .....	<b>17</b>
<b>3.3</b>	<b>Citocinas</b> .....	<b>20</b>
<b>3.4</b>	<b>Doenças de hipersensibilidade cutânea</b> .....	<b>23</b>
3.4.1	Dermatite Atópica.....	23
3.4.2	Hipersensibilidade à picada de insetos.....	25
3.3.3	Urticária crônica.....	27
<b>3.5</b>	<b>Abordagem diagnóstica nas dermatopatias</b> .....	<b>30</b>
<b>4</b>	<b>ARTIGO</b> .....	<b>32</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>55</b>
	<b>APÊNDICE – FICHA DE ATENDIMENTO DERMATOLÓGICO</b> .....	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças de pele causam incômodo, irritabilidade, prurido, infecções secundárias e miíases. Cavalos são a terceira espécie mais comumente atendida em serviços de dermatologia. Quadros dermatológicos em equinos comprometem o conforto, aparência e podem interferir com a capacidade esportiva do cavalo (Scott; Miller, 2011), sendo as doenças alérgicas comuns em cavalos em todo o mundo (Marsella, et al., 2023). O termo alergia descreve um estado de hipersensibilidade a um antígeno, e refere-se à hipersensibilidade do tipo I, mediada por anticorpos da imunoglobulina E (IgE) (Gershwin, 2015).

Uma reação alérgica é uma reação exagerada do sistema imunológico de alguns indivíduos a substâncias normalmente inofensivas (alérgenos), que não induzem doença ou reação inflamatória na maioria dos indivíduos. Equinos desenvolvem naturalmente doenças alérgicas (Wagner, 2016), podendo envolver pele, olhos, sistema respiratório e trato gastrointestinal. Os alérgenos mais comuns incluem proteínas do pólen, ácaros ambientais e epitélios (Abbas et al., 2012).

Alergias mediadas por imunoglobulina E (IgE) são caracterizadas por mecanismos imunológicos que envolvem a produção de IgE alérgeno-específica, ligação desta à mastócitos teciduais através de receptores e a liberação de mediadores inflamatórios após exposição destes mastócitos sensibilizados a um alérgeno (Wagner, 2016). Estas reações estão relacionadas à patofisiologia de doenças como a Dermatite Atópica (DA) (Jose-Cunilleras et al., 2001) e a Hipersensibilidade à Picada de Insetos (HPI) (Lorch et al. 2001).

Houve avanço significativo na compreensão dos mecanismos moleculares envolvendo a inflamação cutânea nas doenças alérgicas (Vonakis; Saini, 2008) mediadas pela degranulação de mastócitos e basófilos (Caproni et al. 2003), proporcionando o desenvolvimento de terapias-alvo com anticorpos monoclonais para controle dos sinais clínicos em humanos (Klonowska, et al., 2018; Nakashima et al., 2018; Lawrence et al., 2018; Igawa, 2019) e cães (Olivry et al., 2016; Gonzales et al., 2013; Gonzales et al., 2014). Estudos envolvendo as citocinas presentes no processo inflamatório de equinos com doenças alérgicas dermatológicas representam uma área em expansão. Um trabalho conduzido por Fettelschoss-Gabriel e colaboradores (2018) desenvolveu um

tratamento para HPI utilizando um anticorpo monoclonal anti-IL-5 equina, sendo este o primeiro tratamento imunológico alvo-específico em equinos.

A presente pesquisa tem o objetivo de avaliar a dinâmica entre as citocinas interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), Fator de Necrose Tumoral alfa (FNT- $\alpha$ ), inibidor tecidual de metaloproteinases 2 (TIMP-2) e matriz metaloproteinase 2 (MMP-2), em equinos com DA e HPI, descrever as lesões de pele macroscópicas e seus padrões regionais, identificando diferenças e/ou similaridades em sua expressão gênica.

## **2 HIPÓTESE**

As citocinas inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , FNT- $\alpha$ ) estarão aumentadas nos animais do Grupo Alérgico comparada aos animais do Grupo Controle. Dentro do Grupo Alérgico, os animais do subgrupo DA terão menor expressão de citocinas inflamatórias que os animais do subgrupo HPI. Cavalos com HPI terão mais lesões secundárias que os cavalos com DA.



### 3 EMBASAMENTO TEÓRICO

#### 3.1 Pele

A pele é uma barreira anatômica e fisiológica entre o animal e o ambiente, fornecendo proteção contra danos físicos, químicos e microbiológicos. Seus componentes sensoriais percebem calor, frio, dor, prurido, toque e pressão. É sinérgica com sistemas orgânicos internos e assim reflete processos patológicos tanto primários quanto compartilhados com outros tecidos (Scott; Miller, 2011).

A pele é contínua com as membranas mucosas locais (digestiva, respiratória, ocular, urogenital) e sua espessura e qualidade, juntamente à pelagem, variam entre áreas do corpo, raças, indivíduos, sexo e idade (Scott; Miller, 2011). Em geral, a espessura da pele diminui dorsal para ventral no tronco e proximal para distal nos membros. É mais espessa na fronte, pescoço dorsal, tórax dorsal, garupa e base da cauda, e mais fina na pina, axila, região inguinal e períneo (Wakuri et al., 1995; Scott, 2004).

É composta por três componentes: epiderme, derme e subcutâneo (Wakuri et al., 1995) (Figura 1). A epiderme é composta por múltiplas camadas de células definidas por sua posição, forma, morfologia e diferenciação. As células epidérmicas são divididas em queratinócitos (85%), melanócitos (5%), células de Langerhans (3-8%) e células de Merkel (2%), e classificadas em estratos ou camadas. O estrato basal é a camada mais interna, seguida pelos estratos espinhoso, granuloso, lúcido e córneo (Smith, 1888; Scott; Miller, 2011). O estrato córneo é compacto e possui camadas lipídicas bem organizadas (Marsella, Johnson, Ahrens, 2014).

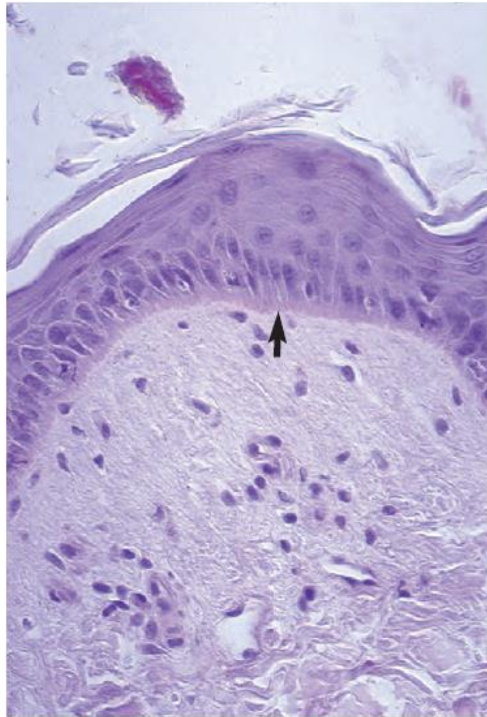


Figura 1: Epiderme normal, evidenciando proeminente zona da membrana basal (seta). (Scott; Miller, 2011).

A derme, dividida em camada superficial e profunda, é composta de fibras insolúveis (colágeno e elastina) e solúveis (proteoglicanos e hialuronato), que suportam o estresse do movimento e mantêm a forma da pele. Contêm os anexos cutâneos, músculo pilo-erector, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Está envolvida na regulação do crescimento, proliferação, adesão, migração e diferenciação celular, e modula a cicatrização, estrutura e função da epiderme (Scott; Miller, 2011).

### **3.2 Imunologia tegumentar e respostas alérgicas**

O sistema imunológico cutâneo é composto pelos sistemas humoral e celular. O componente celular compreende os queratinócitos, células dendríticas epidermais (células de Langerhans), células dendríticas dermais, linfócitos, macrófagos, mastócitos, células endoteliais e granulócitos. O componente humoral consiste das imunoglobulinas, componentes do complemento, fibrinolisinases, citocinas, eicosanóides, neuropeptídeos e peptídeos antimicrobianos (Scott; Miller, 2011).

Respostas alérgicas são reações exageradas do sistema imunológico de alguns indivíduos predispostos (Wagner, 2016), mediadas por IgE ligada a alguns tipos celulares previamente sensibilizados que, ao entrar em contato com o alérgeno, causam a liberação e síntese de mediadores inflamatórios (Gershwin, 2015). A ligação da IgE ao seu receptor de alta afinidade na superfície de algumas células é chamada sensibilização e precede o desenvolvimento de alergia clínica. Este mecanismo é implicado na patogênese de diversas doenças alérgicas em equinos (Wagner, 2006).

As reações alérgicas são divididas em quatro tipos: tipo I (anafilactóide ou imediata), tipo II (citotóxica), tipo III (complexo imune) e tipo IV (mediada por células ou tardia). Os tipos I, II e III juntos formam as reações imediatas e são mediadas por anticorpos, requerendo de alguns minutos a poucas horas para serem detectadas. O tipo IV é a reação de hipersensibilidade tardia, não mediada por anticorpos, e classicamente requer 24-72h para se tornar detectável (Scott; Miller, 2011). O termo alergia ou resposta alérgica refere-se à resposta alérgica mediada por anticorpos do tipo IgE (Gershwin, 2015; Abbas et al., 2012), desencadeada principalmente contra proteínas do pólen, ácaros ambientais e epitélios (Abbas et al., 2012). Após exposição inicial a um alérgeno, células T diferenciam-se em Th2 e interagem com células B. Elas também secretam citocinas como IL-4 e IL-13, e estes sinais induzem células B a produzir e promover a mudança de formas de anticorpos (isotipos) IgM para outras classes, especialmente IgE. A IgE é encontrada na superfície de algumas células sanguíneas periféricas como basófilos, subpopulações de células B e monócitos, e em mastócitos de vários tecidos como pele, submucosa das vias aéreas e intestino (Wagner, 2006) (Figura 2).

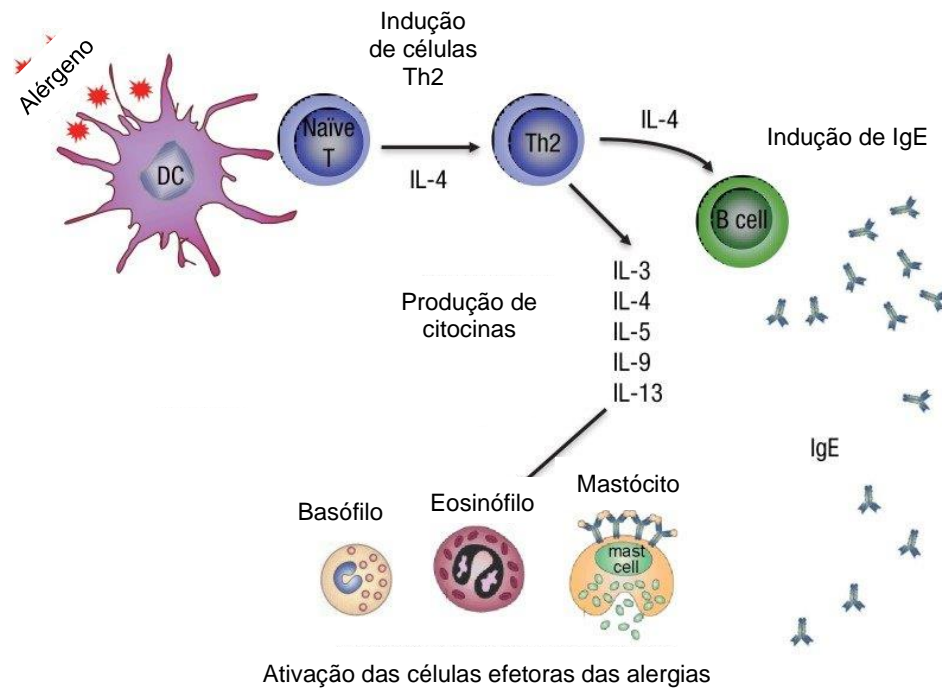


Figura 2: Sensibilização alérgica. Indução de células T auxiliares tipo 2 (Th2) após apresentação dos alérgenos às células T pelas células dendríticas, após estimulação pela IL-4. As células Th2 produzem citocinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. As células B passam a produzir IgE, que se ligam a receptores específicos em mastócitos e basófilos. Ao encontrar o mesmo alérgeno pela segunda vez, ocorre a degranulação dos mastócitos e basófilos, levando à hipersensibilidade imediata (Adaptado de Fujita et al., 2012).

Na ausência do alérgeno, a sensibilização não induz sinais clínicos de alergia. Somente a ligação da IgE ao alérgeno desencadeia a degranulação celular e resulta na liberação imediata de mediadores inflamatórios seguido do rápido aparecimento dos sinais clínicos (Wagner et al., 2006).

Após a ligação do alérgeno à IgE e ativação do mastócito, ocorre a liberação de vários mediadores como a histamina, enzimas, proteoglicanos e ácido araquidônico, que por sua vez levam à liberação de prostaglandina, leucotrienos e fator de ativação plaquetária. Todos estes mediadores levam à vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, broncoconstrição e quimiotaxia de neutrófilos aos locais de inflamação. Linfócitos Th2 secretam a IL-5, que ativa eosinófilos e aumenta sua maturação, e a IL-13, que estimula a secreção de muco pelas células epiteliais (Abbas et al., 2012).

As reações de hipersensibilidade tardia são mediadas por citocinas das células Th2 e mastócitos, e caracterizadas por um maior número de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células CD4+. Tais citocinas incluem o FNT (Fator de Necrose Tumoral), que ativa expressão celular de moléculas de adesão e favorece a infiltração de neutrófilos e monócitos. Mastócitos e células Th2 produzem IL-4, que aumenta a expressão de moléculas de adesão para eosinófilos, levando ao acúmulo destes e outras células inflamatórias no local da reação. Ocorre a liberação de outras citocinas, como fator de agregação plaquetária, prostaglandinas e leucotrienos, que contribuem para o dano tecidual e contínuo recrutamento de células inflamatórias (Abbas et al., 2012).

Segue-se a produção de altos níveis de IgE antígeno-específica, através da mudança de imunoglobulina M para IgE (Wagner et al., 2006). Estas IgE's ligam-se à receptores especializados nos mastócitos, basófilos (Radcliffe, 2016), eosinófilos, células de Langerhans e monócitos ativados (Abbas et al., 2012), tornando-os sensibilizados (Radcliffe, 2016). Reações de hipersensibilidade podem envolver diferentes sistemas, e muitos alérgenos podem estar envolvidos (Abbas et al., 2012).

Cavalos geralmente não desenvolvem sinais clínicos de hipersensibilidade antes dos 3-4 anos de idade (Wilson et al., 2001). Alergias cutâneas são raramente observadas em animais mais jovens (Wagner et al., 2016), possivelmente pela transferência do IgE materno via colostro ao potro neonato, sendo produzida por ele somente 6-9 meses após o nascimento (Marti et al., 2009)

### **3.3 Citocinas**

Citocinas são polipeptídios ou glicoproteínas produzidas por diversos tipos celulares presentes nos locais de resposta imunológica. São também biomarcadores para condições inflamatórias e podem ser referências diagnósticas para algumas doenças. Mediam interações celulares e regulam a diferenciação, proliferação e sobrevivência de células imunológicas através do desencadeamento da produção de outras citocinas, que podem aumentar (pró-inflamatórias) ou diminuir (anti-inflamatórias) a resposta inflamatória (Hall et al.,

2015). A Figura 3 traz uma representação esquemática das interações documentadas de mastócitos humanos com outras células e estruturas na pele.

O IFN- $\gamma$  e FNT- $\alpha$  são citocinas pró-inflamatórias, enquanto IL-4 é anti-inflamatória. O IFN- $\gamma$  é um marcador para a resposta imunológica mediada por células e a IL-4 é específica da estimulação dos linfócitos B, desencadeando a resposta imune humoral (Gildea et al., 2013), e o FNT- $\alpha$  regula a inflamação local (Janeway, et al., 2002).

A IL-1 $\beta$  é um produto de monócitos, macrófagos e células dendríticas, bem como linfócitos B, neutrófilos e células natural killer (NK), componentes do complemento e outras citocinas como o FNT (Murray, 2013).

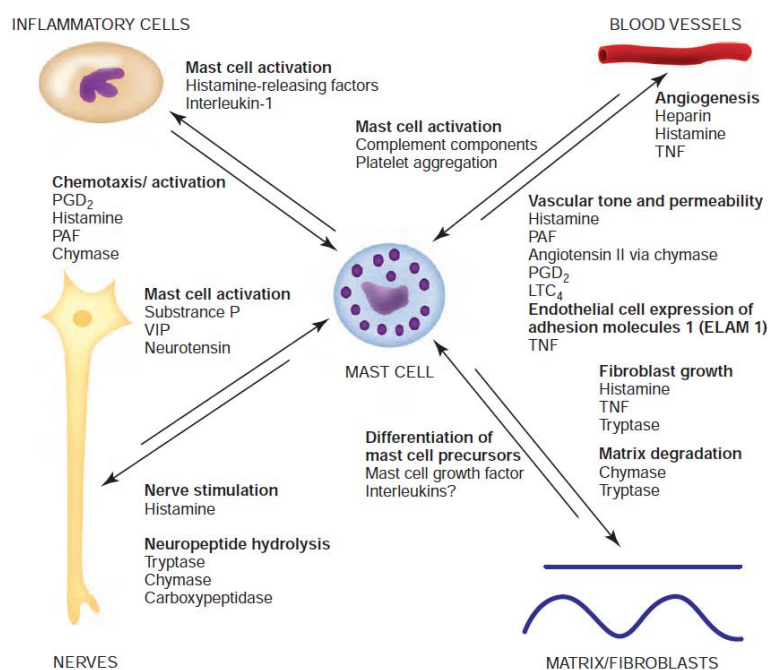


Figura 3. Representação esquemática das interações documentadas de mastócitos humanos com outras células e estruturas na pele. (Goldstein; Wintroub, 1993).

A IL-4 é uma glicoproteína complexa produzida principalmente por mastócitos, basófilos, eosinófilos e neutrófilos (Chomarat; Banchereau, 1997) com propriedades estimuladoras de células B, promotoras de Th2 e função supressora de células T. Também é responsável pela mudança do isotipo da imunoglobulina para IgE (Curtis, 2006), e exerce potente atividade inibitória em macrófagos. Tem ação inibitória sobre FNT- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . A IL-4 atua como um regulador dos níveis de inflamação, o que reflete um esforço fisiológico para

controlar os níveis de dano tecidual durante as respostas imunes (William, 2003), além de apresentar um efeito pró-fibrótico (Bergeron et al., 2003; Buttner et al., 2004).

A IL-13 desempenha um papel predominante na inflamação alérgica. O sítio intracelular de armazenamento de IL-13 em eosinófilos está associado aos grânulos cristalóides, sugerindo que IL-13 é um mediador pré-formado que é liberado após estimulação da degranulação (Woerly, 2002). Assim como a IL-4, a IL-13 inibe a produção de macrófagos, de FNT- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , além de promover a mudança de isotipo para IgE (Mak, Saunders, 2006).

As ações biológicas do IFN- $\gamma$  podem ser atribuídas à sua capacidade de ativar ou inibir a expressão de genes alvo, através da sua ligação a receptores específicos da superfície celular, expressos em praticamente todos os tipos de células (Vilčekjunming, 1998). Portanto, o IFN- $\gamma$  é produzido por células especializadas, mas pode ligar-se a quase todos os tipos de células para provocar uma resposta (Payne, 2017), induzindo ou inibindo muitas funções celulares através de efeitos diretos na expressão gênica (Young; Hodge, 2003). A sinalização do IFN- $\gamma$  desempenha um papel importante no estabelecimento da imunidade celular, através da regulação da imunidade, unindo as vias de resposta imune inata e específica (Payne, 2017). Macrófagos estimulados por IFN- $\gamma$  produzem IL-12, uma citocina que induz a proliferação de células B e apoia a produção contínua de IFN- $\gamma$  (Yoshimoto et al., 1997).

O FNT- $\alpha$  é produzido principalmente por macrófagos ativados, linfócitos T e células NK. Desempenha um papel importante no controle da infecção. A liberação de FNT pelos macrófagos parece ser crucial para a formação e manutenção dos granulomas (Atzeni et al., 2013).

As metaloproteinases são endopeptidases que, além da função degradativa, estão relacionadas estruturalmente e se classificam segundo a sua especificidade de substrato e a sua estrutura primária. As metaloproteinases de matriz (MMP) são uma família de enzimas proteolíticas que atuam no remodelamento da matriz extracelular e que, em conjunto, podem degradar seus constituintes. A MMP-2 é uma gelatinase presente como um elemento constitutivo da pele normal, que atua degradando os colágenos tipo IV, V, VII e X, a elastina e os colágenos desnaturalizados. Se evidencia em queratinócitos e fibroblastos dérmicos, e tem um papel importante na degradação final do

colágeno, uma vez que este tenha sido modificado inicialmente por outras collagenases (Pérez-García, 2004). No entanto, a MMP-2 também é expressa por queratinócitos hiperproliferativos (Krengel et al., 2002) e estágios iniciais de ulceração (Kähäri; Saarialho-Kere, 1997).

Os inibidores de metaloproteinases (TIMP) têm outros papéis, atuando como fatores estimulantes do desenvolvimento, na esteroidogênese e na modulação do crescimento celular (Pérez-García, 2004). A TIMP-2 é capaz de inibir as atividades de todas as MMPs, tendo um papel central na manutenção do equilíbrio entre a deposição de matriz extracelular e a sua degradação em diferentes processos fisiológicos. Além disso, exibe atividade semelhante ao fator de crescimento e pode inibir a angiogênese (Gomez et al., 1997).

### **3.4 Doenças de hipersensibilidade cutânea**

#### **3.4.1 Dermatite Atópica**

A dermatite atópica em humanos e cães é uma condição hereditária caracterizada por prurido, onde os indivíduos afetados são geneticamente predispostos a desenvolver alergia mediada por IgE à alérgenos ambientais (Olivry, DeBoer, Griffin, 2001) absorvidos por via cutânea, inalatória ou oral (Scott, Miller, 2011). Em equinos a doença não está tão bem caracterizada como nas outras espécies, apesar de compartilhar algumas similaridades (Stepnik, et al, 2011; Marsella, et al., 2022). A patogênese da dermatite atópica em cavalos é provavelmente mediada por uma resposta imunológica predominantemente Th2 e a produção de IgE alérgeno-específica (Stepnik, et al., 2011), com consequente produção de inúmeras citocinas, incluindo IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IL-31 (Marsella, et al., 2023).

A prevalência real é desconhecida (Scott, Miller, 2011), mas provavelmente é mais comum do que previamente relatado, parcialmente pois ela coexiste com a HPI, que também pode causar prurido e urticária (Kolm-Stark, Wagner, 2002; Stepnik et al., 2012). Não há predileção por idade e sexo (White, 2005), e as predisposições raciais variam dependendo da localização geográfica. Contudo, observou-se que cavalos árabes, finlandeses e puro-sangue são comumente afetados, sugerindo que haja um componente



hereditário (Marsella et al., 2023). Equinos atópicos são predispostos à infecção secundária e estas podem acentuar gravemente o prurido e a inflamação (Scott, Miller, 2011).

Os sinais clínicos iniciam em cavalos jovens (um ano e meio a seis anos de idade) e podem manifestar-se em qualquer estação, sazonalmente ou não, dependendo dos alérgenos envolvidos (White, 2005; Marsella, 2023). Sua ocorrência em cavalos mais velhos pode ocorrer caso tenham saído de um local com clima mais frio para um local mais quente. Com o tempo, um cavalo sazonalmente afetado pode tornar-se não sazonal, pois o animal tem mais tempo para desenvolver outras sensibilidades (Marsella et al., 2023).

As três apresentações mais comuns de dermatite atópica são urticária, urticária com prurido ou prurido isolado (White, 2005; Marsella, 2023). Há prurido bilateral simétrico, inicialmente na ausência de lesões visíveis, afetando face, pina, tórax ventral e abdômen, membros, região dorsolateral do pescoço, base da crina, cauda e garupa (Scott, Miller, 2011). Lesões secundárias como escoriações, hipotricose e alopecia autoinduzidas, infecção bacteriana secundária com ou sem liquenificação e hiperpigmentação são comuns (Scott, Miller, 2011).

Quando a dermatite atópica está associada à HPI, observa-se maior severidade dos sinais clínicos. Alguns cavalos têm ambas as manifestações de doença atópica (sinais cutâneos e respiratórios), enquanto outros tem um ou outro. A progressão da doença cutânea para respiratória já foi observada, porém não é claramente documentada como é a marcha atópica em humanos. Alguns cavalos atópicos podem ter o componente alérgico alimentar que também atua como desencadeador de crise alérgica (Marsella; De Benedetto, 2017; Marsella et al., 2023). Conjuntivite e rinite alérgicas são raras em cavalos atópicos (Scott, Miller, 2011).

O diagnóstico da doença é baseado no histórico, apresentação clínica e exclusão de outras doenças cutâneas pruríticas e/ou urticariformes (Scott, Miller, 2011; White, 2005) como infecções secundárias, alergia alimentar, HPI, dermatite de contato (Scott, Miller, 2011) e ectoparasitas. Testes de IgE alérgeno específica podem ser realizados para identificar alérgenos a serem utilizados em protocolos de imunoterapia, mas não podem ser utilizados para o diagnóstico (Marsella et al., 2023).

A dermatite atópica é considerada uma doença crônica que requer manejo prolongado (Fadok, 1995; Scott, Miller, 2011) com medicações sistêmicas, como anti-histamínicos, glicocorticoides, antidepressivos tricíclicos ou uma combinação destes, associados com terapia tópica, controle ambiental de alérgenos (White, 2005), pentoxifilina, ácidos graxos essenciais, controle de infecções secundárias e imunoterapia (Marsella et al., 2023). Em função da necessidade de terapia a longo prazo e implicações esportivas, considera-se a imunoterapia alérgeno específica como um bom tratamento da doença. Os alérgenos são selecionados através de testes alérgicos intradérmicos ou sorológicos e o tratamento imunoterápico é prolongado (Scott, Miller, 2011).

#### 3.4.2 Hipersensibilidade à picada de insetos

A HPI é a resposta alérgica de cavalos às picadas de insetos hematófagos (Marsella et al., 2023) e representa uma reação de hipersensibilidade aos antígenos salivares de inúmeras espécies de *Culicoides* e possivelmente espécies de *Simulium*, *Stomoxys calcitrans* e *Haemotobia irritans* (Scott, Miller, 2011). A espécie exata de *Culicoides* varia nas diferentes localizações geográficas, dependendo quais são localmente abundantes. Observa-se que há diversas espécies locais, com alguns tipos dominantes correspondendo a 80-90% das picadas (Marsella et al., 2023).

É uma doença de distribuição mundial com predisposição familiar e genética. A doença é observada em qualquer idade, raça ou sexo, porém parece ser mais comum em algumas raças como o Quarto de Milha e o Árabe (Scott, Miller, 2011).

A idade em que o animal é exposto ao *Culicoides* é crítica para o desenvolvimento da doença. Cavalos que foram expostos aos *Culicoides* precocemente apresentam aproximadamente 5% de chances de desenvolver a doença, ao passo que cavalos expostos mais tardiamente apresentam risco superior a 50% (Björnsdóttir et al., 2006; Lange et al., 2005). Os primeiros sinais da doença podem ser observados em animais jovens, dependendo do clima e da exposição aos insetos. Em climas amenos, os sinais clínicos podem ocorrer em cavalos tão jovens quanto 2 anos de idade (Lanz et al., 2017) e são

tipicamente progressivos com o passar do tempo, de forma que a cada estação a doença aumenta em severidade (Cunningham, Dunkel, 2008).

Em climas amenos, os sinais clínicos são não-sazonais, com exacerbação sazonal, associados ao aparecimento dos insetos (Scott, Miller, 2011). A ocorrência é mais comum nos meses mais quentes, com pico de incidência na primavera e outono (Marsella et al., 2023).

As lesões podem estar distribuídas dorsal ou ventralmente (Schaffartzik, et al. 2012), dependendo da espécie de *Culicoides* específica da área geográfica (Marteles et al., 2019). Classicamente, as regiões afetadas são as orelhas, a face, tórax, membros, cernelha, garupa, base da cauda, região inguinal e linha média ventral (Fadok, 2013). As lesões costumam iniciar na base da cauda e estender-se cranialmente (Schaffartzik, et al., 2012). As lesões primárias são tipicamente papulares pruriginosas. Muitos cavalos desenvolvem infecções bacterianas secundárias, que aumentam o grau de prurido e complicam o quadro clínico (Marsella, 2019). Com a cronicidade, as lesões evoluem para escoriações autoinduzidas, hipotricose, alopecia, liquenificação e alterações na pigmentação (Schaffartzik et al. 2012).

A HPI é uma das doenças mais intensamente pruríticas em cavalos. O prurido pode ser extremo e levar à severo auto traumatismo e hiperestesia. Os cavalos afetados apresentam comumente pelos fraturados na crina e na cauda, e escoriações na garupa, flancos, peito e dorso do pescoço. Casos severos podem perder todos pelos da crina e terço proximal da cauda, como resultado do auto traumatismo. Quadros crônicos podem apresentar dobras cutâneas, leucodermia e leucotriquia. Alguns animais podem desenvolver nódulos firmes calcificados consistentes com granuloma eosinofílico (Greiner et al., 1990; Yu, 2009), na maioria dos casos permanentes (Yu, 2009; Knottenbelt, 2009).

O diagnóstico é baseado no histórico, exame físico, exclusão de outras condições pruríticas e uma resposta positiva ao controle de insetos (Sloet van Oldruitenborgh-Osterbaan et al, 2009; Marsella et al., 2023) através de barreiras físicas ou uso de repelentes. É crucial a identificação e tratamento adequado das infecções bacterianas secundárias para permitir a avaliação da doença primária. A HPI é frequentemente associada com outras hipersensibilidades, de modo que não é incomum encontrar animais com dermatite atópica associada (Marsella et al., 2023). A identificação de alérgenos específicos IgE, seja por via intradérmica

ou sorológica, atualmente é considerado um critério menor para o diagnóstico da HPI, pois resultados positivos podem ser observados em cavalos normais e podem não ser encontrados em cavalos clinicamente compatíveis com HPI (Kolm-Stark, Wagner, 2002). As biópsias de pele também não são diagnósticas para HPI, pois os resultados são consistentes com doença alérgica e não patognomônicos para HPI (Schaffartzik et al. 2012).

Muitos tratamentos foram considerados, variando de opções orais a tópicas. Atualmente, a estratégia de tratamento mais eficaz ainda depende de evitar os insetos. No entanto, minimizar as picadas de insetos em situações da vida real revela-se desafiador (Marsella et al., 2023). Manter os cavalos afetados distantes de água parada, estabulá-los à noite e usar ventiladores quando estabulados são estratégias eficientes para reduzir as picadas (González, et al. 2013; Meiswinkel, et al. 2000). O uso de repelentes é indicado, porém em climas com alta umidade e frequentes chuvas, precisam ser reaplicados com mais frequência (Marsella et al., 2023). Repelentes a base de permetrina, deltametrina e cipermetrina foram avaliados sob diversas concentrações, com resultados variáveis (Robin, et al., 2015; Braverman, Chizov-Ginzburg, 1997).

Frequentemente são indicados glicocorticóides sistêmicos no tratamento, porém dependendo da duração e da gravidade das reações, esses tratamentos podem não ser sustentáveis. Alternativas aos glicocorticóides, como anti-histamínicos, suplementações de ácidos graxos e imunoterapia, foram considerados no tratamento. No entanto, a grande maioria destes tratamentos foram avaliados em pequenos estudos que não foram replicados, e, portanto, não há conclusões baseadas em evidências (Marsella et al., 2023). Uma nova modalidade de tratamento vem sendo amplamente estudada. A utilização de anticorpos monoclonais mostrou-se segura e eficaz no controle do prurido e escore lesional de cavalos com HPI (Fettelschoss-Gabriel et al., 2019).

### 3.4.3 Urticária crônica

A urticária crônica é uma apresentação comum e frustrante na prática clínica equina, não ligada a um gatilho específico (Marsella et al., 2023), sendo considerada um padrão de reação cutânea (Scott, Miller, 2011). É caracterizada por halos transientes na pele que aparecem subitamente (Hinden et al., 2012),

variavelmente pruríticos (Marsella, et al., 2023) e edematosos, resultantes da degranulação de mastócitos ou basófilos (Scott, Miller, 2011; Hinden et al., 2012), que podem ou não estar ligadas a uma resposta imunológica (Marsella et al., 2023).

A urticária mediada imunologicamente tem sido tradicionalmente considerada uma hipersensibilidade do tipo I com subsequente degranulação de mastócitos, liberação de histamina e outros mediadores pró-inflamatórios. Os alérgenos descritos como possíveis desencadeadores da urticária variam de insetos a alérgenos ambientais, alimentos, suplementos orais, medicamentos e vacinas (Marsella et al., 2023). Há poucos relatos na literatura de reações urticariformes não ligadas à hipersensibilidade em equinos. Prurido colinérgico, considerado uma variante da urticária colinérgica, foi descrito por Logas e colaboradores em 1992, e a urticária induzida pelo suor foi descrita por Lorch e colaboradores em 2013.

Não foi comprovada predisposição racial, de idade ou raça, porém sugere-se que raças de corrida sejam mais predispostas. Os sinais clínicos podem ser agudos e crônicos (Scott, Miller, 2011), sendo comum que sejam recorrentes e prolonguem-se por mais de uma semana (Rüfenacht et al., 2005).

As lesões são relativamente simétricas e bilaterais, localizadas ou generalizadas (Scott, Miller, 2011). Ocorrem comumente no pescoço, flancos e face, podendo estar presentes em qualquer local do corpo (Scott, Miller, 2011; Marsella, et al., 2023).

As lesões são macias e ficam esbranquiçadas sob pressão digital, pois são inicialmente causadas pela vasodilatação. Com o passar das horas, as lesões tornam-se mais firmes devido ao acúmulo de células inflamatórias. Lesões individuais podem aumentar e diminuir e, em casos graves, podem coalescer em grandes áreas de placas elevadas. O edema pode acumular-se ventralmente, e a exsudação de fluido através da pele pode ser visualizada facilmente (Marsella, et al., 2023).

Durante a anamnese é importante inquirir ao que o cavalo foi exposto nas horas anteriores ao aparecimento dos sinais de urticária, a fim de estabelecer uma possível conexão entre o início dos sinais e um desencadeador. Nos casos crônicos a identificação do desencadeador é bem mais difícil (Marsella, et al., 2023).

O diagnóstico de urticária crônica é clínico (Marsella, et al., 2023), porém não é um diagnóstico definitivo, e sim um padrão de reação cutânea com muitas causas em potencial (Scott, Miller, 2011). Os principais diagnósticos diferenciais são o eritema multiforme, uma rara doença imunomediada desencadeada por estímulos antigênicos como drogas e vacinas, e a piodermite superficial. Nestes casos pode ser necessária a realização de uma biópsia para discriminar entre os diferenciais (Marsella, et al., 2023) (Figura 4). Histologicamente, há variável infiltrado perivascular de eosinófilos e linfócitos (Hinden et al., 2012), e foi demonstrada a presença de células sensibilizadas com IgE na derme (Rüfenacht, et al., 2005). A expressão de IL-4 e IL-13 é maior na pele de cavalos com urticária crônica, com ainda maior expressão da IL-4 na pele com lesão (Hinden et al., 2012).

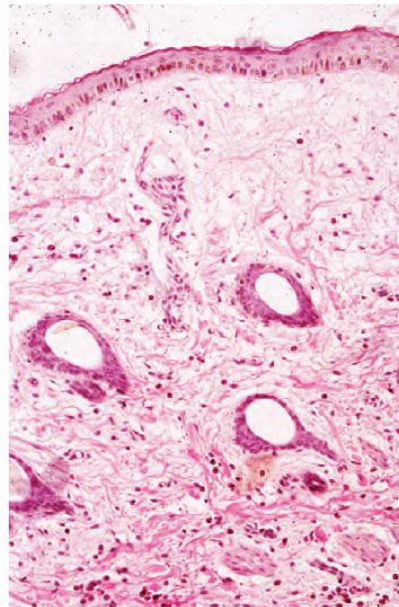


Figura 4: Urticária recorrente em cavalo atópico. Biópsia de pele revela acúmulo perivascular de eosinófilos e edema dérmico pronunciado (Scott; Miller, 2011).

Testes alérgicos IgE específicos podem auxiliar na identificação dos potenciais alergênicos, porém um teste positivo não indica necessariamente uma relação causal, sendo necessário avaliar os resultados em conjunto com o histórico de exposição do cavalo (Evans et al., 1992).

As abordagens terapêuticas incluem a eliminação de fatores etiológicos conhecidos, tratamento dos sinais clínicos com glicocorticoides, imunoterapia

(Scott, Miller, 2011) e anti-histamínicos. Pentoxifilina e ácidos graxos essenciais podem ser utilizados em casos crônicos (Marsella, et al., 2023).

### 3.5 Abordagem diagnóstica nas dermatopatias

Uma abordagem estruturada é essencial. É necessário iniciar pelo processo de levantamento do histórico, onde tempo suficiente deve ser destinado a esta etapa. Todas as informações devem ser adequadamente registradas em uma ficha (Littlewood et al., 2002). O Anexo 1 exemplifica uma ficha dermatológica utilizada na avaliação dos animais. Informações acuradas sobre o manejo do animal e inspeção das baias, áreas de manejo e circulação, armazenagem de alimentos e equipamentos, e exercício são particularmente importantes (Littlewood et al., 2002; Scott; Miller, 2003). Os componentes e sequência do levantamento do histórico são exemplificados na Figura 4.



Figura 5. Componentes e sequência do levantamento do histórico (adaptado de Littlewood et al., 2002).

O exame clínico completo deve incluir o estado geral e a pele, e ser realizado sob adequada contenção e iluminação suficiente. Deve ser realizado sistematicamente, dorso-ventralmente em cada região do corpo, iniciando na

cabeça e finalizando na cauda e região perineal. O exame de todos os aspectos dos cascos deve ser realizado, incluindo a banda coronária e ranilha (Littlewood et al., 2002).

Durante o exame clínico, deve-se determinar o padrão de distribuição e localização regional das lesões, pois alguns padrões são muito relevantes no diagnóstico. É importante identificar as lesões primárias e secundárias, além da qualidade da pele e pelagem. Os diagnósticos diferenciais são estabelecidos em ordem de probabilidade, estabelecendo-se um plano de diagnóstico. Testes laboratoriais simples são realizados, e, caso não apoiem a confirmação ou exclusão dos diagnósticos diferenciais, testes mais específicos são realizados. Em casos em que os testes complementares não podem ser realizados, um diagnóstico terapêutico pode ser conduzido (Scott; Miller, 2003). Os procedimentos de exame físico e diagnóstico são exemplificados na Figura 5.

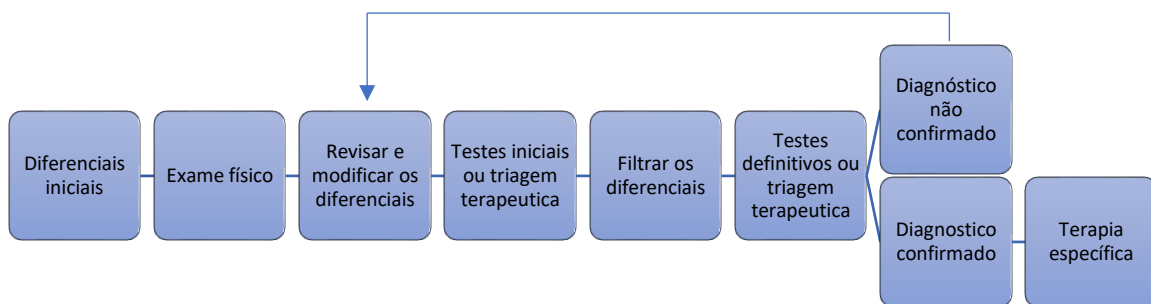


Figura 6 – Procedimentos de exame clínico e diagnóstico (adaptado de Littlewood et al., 2002).



#### 4. ARTIGO

### EXPRESSION OF CYTOKINES IN HORSES WITH ALLERGIC DERMATOPATHIES

<sup>1</sup>Vanessa Jegan; <sup>1</sup>Henrique Boll de Araujo Bastos; <sup>1</sup>Luiz Augusto Machado Centeno; <sup>1</sup>Nélson Alexandre Kretzmann Filho

<sup>1</sup>PPGMA:Equinos Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil

Vanessa Jegan. Corresponding author. Tel.: +55 51 3308-6124; fax: +55 51 3308- 8063. E-mail address: [vanessajegan.vet@gmail.com](mailto:vanessajegan.vet@gmail.com)

#### ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the expression of cytokines interleukin 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin 4 (IL-4), interleukin 13 (IL-13), interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2), and matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) in different equine allergic dermatoses, identifying differences and/or similarities in their gene expression. Thirty-two horses were included in the study. The animals were divided into two groups. Fourteen animals constituted the Control Group (non-allergic horses) and eighteen animals constituted the Allergic Group. The Allergic Group was then separated into two subgroups according to clinical diagnosis, named Atopic Dermatitis (eleven horses) and Insect Bite Hypersensitivity (seven horses). The inclusion criteria for the Control Group required the absence of a history of seasonal or perennial pruritus, recurrent urticaria or respiratory disease, and the absence of skin lesions. Each horse in this study underwent the collection of 4ml of hole blood sample in an EDTA tube, which was sent to the laboratory for real-time Polymerase Chain Reaction (qPCR) analysis. Gene expression of IL-4, IFN- $\alpha$ , TIMP-2, IL-1 $\beta$ , MMP-2, TNF- $\alpha$ , and IL-13 was verified in all evaluated blood samples. The IBH horses showed higher IL-4 expression than the controls. The IBH and Control horses showed higher TIMP2 expression than the Atopic horses. The IBH horses showed higher MMP2 expression than the controls. The IBH horses showed higher IL13 expression

than the controls. No differences were observed in the gene expression of IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ .

## 1. INTRODUCTION

Horses are the third most common species presented for clinical evaluation for skin diseases, which can impact the animal's welfare, cause secondary infections and interfere with the horse's ability to function in riding, working or show (Scot; Miller, 2011). Allergic diseases are common in horses around the world (Marsella, et al., 2022). IgE-mediated allergies are characterized by the production of allergen-specific IgE, its binding to tissue mast cells through receptors and the release of cytokines after exposure of these previously sensitized mast cells to the allergen (Wagner, 2006).

Cytokines are polypeptides or glycoproteins produced by many types of cells present at the sites of immune response and can be found in a variety of body fluids. They mediate cellular interactions and regulate differentiation, proliferation, and survival of immune cells by triggering the production of other cytokines, which can increase (pro-inflammatory) or attenuate (anti-inflammatory) immune response. Thereby, cytokines are biomarkers for inflammatory conditions, potential diagnostic tools (Hall et al., 2015) and treatment target for diseases (Fettelschoss-Gabriel et al., 2018). Hence, cytokines are widely studied and the ability to detect them has become increasingly important for researchers and clinicians (Hall et al., 2015).

There has been significant progress in understanding the molecular mechanisms involving skin inflammation in allergic diseases (Vonakis; Saini, 2008) mediated by degranulation of mast cells and basophils (Caproni et al. 2003), providing the development of target therapies with monoclonal antibodies to control clinical signs in humans (Klonowska, et al., 2018) and dogs (Michels et al., 2016; Gonzales et al., 2013; Gonzales et al., 2016). The first equine monoclonal antibody anti-interleukin (IL)-5 was developed, being the first target-specific monoclonal antibody treatment for horses (Fettelschoss-Gabriel et al., 2019).

Several regulatory cytokines have been defined as involved in the initiation and maintenance of the allergic response. The first group of cytokines are those

produced by T helper 1 (Th1) cells, which include interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). The second group of cytokines are generated by Th2 cells, such as IL-4 and IL-13. Allergic inflammation is an inappropriate response that arises from polarization of T cells toward a Th2 response, since greater expression of Th2 cytokines is seen in allergen-challenged individuals, along with a downregulation of Th1 cytokines (Davoine; Lacy, 2014).

IL-4 and IL-13 are recognized as orchestrators of inflammatory events associated with allergic inflammation. IL-4 induces a mixed inflammatory profile with a combination of increased, through TNF- $\alpha$  (Lavoie-Lamoureux et al., 2010; Luzina et al., 2012), and decreased, through IL-1 $\beta$ , proinflammatory cytokine expression (Lavoie-Lamoureux et al., 2010). Expression of IL-4 leads to accumulation of T and B lymphocytes and a tendency to collagen accumulation (Luzina et al., 2011). IL-4 and IL-13 are known to switch B cells towards IgE synthesis and stimulates naive T-cells to switch to the Th2 response, promoting IgE and eosinophilic responses in atopy (Hamelmann; Gelfand, 2001; Aggarwal; Holmes, 1999).

IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  are produced by keratinocytes, lymphocytes and macrophages, playing important roles in the initiation and perpetuation of the skin lesions in atopic dermatitis (Kato et al., 2002). IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are both pro-inflammatory cytokines (Hansen et al., 2013). IFN- $\gamma$  is an important activator of macrophages, produced predominantly by natural killer (NK) cells as part of the innate immune response and by T lymphocyte once antigen-specific immunity develops (Shamji, M. H.; Durham, S. R., 2017). IFN- $\gamma$  may play a role in exacerbation of existing allergic inflammation and induce the release of eosinophil granule proteins by exocytosis (Davoine; Lacy, 2014). The most abundant cytokine in eosinophils appears to be IL-13, followed by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (Spencer et al., 2009). IFN- $\gamma$  predominantly down-regulate MMP gene expression (Edwards et al., 1987; Kerr et al., 1990).

Inflammation-induced tissue destruction is followed by its remodeling for maintenance of tissue homeostasis. Matrix metalloproteinases (MMPs) are a family of endopeptidases that degrade the various components of the connective tissue matrix (Woessner, 1991). In contrast, tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) are secreted proteins that block the activities of MMPs with a one-to-one stoichiometry (Woessner, 1991; Edwards et al., 1996).

Appropriate regulation of MMPs and their inhibitors during the tissue repair processes is important for tissue remodeling, because any imbalance between the enhanced matrix synthesis and diminished breakdown of connective tissue proteins results in increased depositions of extracellular matrix (Kato et al., 2002).

Cytokines secreted by cells of the immune system have been routinely detected by gene expression in serum and plasma by real-time PCR (Hall et al., 2015). As cytokines interact with immune cells and alter their behavior and properties, their combined effect is often more important than the function of one isolated component (Jager et al., 2003).

The aim of the present study was to verify the gene expression of seven cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-13, IFN-g, TNF-a, TIMP-2 and MMP-2) in horse blood samples with different allergic dermatopathies. The choices of the cytokines were based on previous studies regarding their role in inflammatory immune response.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Local**

This study was conducted at Laboratório de Reprodução Animal (REPROLAB), Faculdade de Veterinária of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil.

### **2.2 Animals**

This study was carried out with an Animal Ethical Use Committee approved protocol at Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (protocol number 35289).

Thirty-four horses were included in the study. Inclusion criteria of the Control Group required no previous history of seasonal or perennial pruritus, recurrent urticaria or respiratory disease, and no cutaneous lesions in the day of blood collection. Horses were kept in natural pastures with free access to mineral supplement and water and remained healthy through the study. Inclusion criteria of the Allergic Group required a history of seasonal or perennial pruritus and skin

lesions. A full clinical examination to assess both the general health status and the skin was performed, therefore dividing the horses in two groups as follows:

If the horse presented clinical signs of pruritus, broken hairs (especially in the main and tail), papules, crusts, exudation and skin thickening on insect feeding sites (dorsally or ventrally), stress signs (irritability, restlessness and/or weight loss), midges were present in the environment and/or were observed feeding on the horse, and the main differential diagnosis were excluded (oxyuriasis, atopic dermatitis and contact dermatitis), the horse was clinically diagnosed with Insect Bite Hypersensitivity (IBH) (Scot; Miller, 2011; Littlewood; Lloyd; Craig, 2022).

If the horse presented clinical signs of recurrent bilaterally symmetric pruritus (seasonal or nonseasonal), secondary lesions of alopecia, excoriation, scaling, lichenification, skin thickening and hyperpigmentation (mainly in the face, pinnae, legs, ventral thorax and abdomen, but may also the dorsolateral neck, mane, croup and base of the tail), and the main differential diagnosis were excluded (ectoparasites, IBH, bacterial infections, fungal infections, contact dermatitis), the horse was clinically diagnosed with Atopic Dermatitis (AD) (Scot & Miller, 2011; Littlewood; Lloyd; Craig, 2022).

Allergic horses were kept in stables with free access to mineral supplement and water, controlled access to natural pastures and besides the allergic skin condition, remained healthy through the study.

Horses of both groups had not received oral, injectable or topic glucocorticoids, antihistamines, nonsteroidal anti-inflammatories or supplements in which the exact ingredients could not be determined, for at least 8 weeks prior to blood collection.

### **2.3 Experimental design**

The allergic horses were divided into two groups. Sixteen animals constituted the Control Group (nonallergic horses) and eighteen animals constituted the Allergic Group. The Allergic Group was then separated in two subgroups according to clinical diagnosis, named as Atopic Dermatitis (AD) (eleven horses) and Insect Bite Hypersensitivity (IBH) (seven horses).

## 2.4 Collection and sample storage

Each horse of this study was submitted to a 4ml total blood sample collection in EDTA tube. The samples were centrifuged, conditioned in RNA later, and transported refrigerated until transferred to a -80°C freezer until analysis.

## 2.5 Extraction and reverse transcription of RNAm

Extraction of leukocyte mRNA was performed using TRIzol Reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) according to manufacturer's instructions. After extraction, mRNA was quantified by photometric measurement (NanoDrop 1000, Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) and only RNA samples with 260/280 ratio between 1.9 and 2.1 and 260/230 ratio >2.0 were used for the analysis. Reverse transcription of mRNA in cDNA was performed using the GoScript Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI, USA).

## 2.6 Quantitative real time PCR (qPCR)

Quantitative PCR was performed with 1 µl of each primer plus 10 µl Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); water was added of a final volume of 20 µl. Amplification was performed using a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), and the data were processed using StepOne™ and StepOnePlus™ Software v2.3.

Relative quantification was performed and the mRNA levels of the target genes (IL-4, IFN-α, TIMP-2, IL-1β, MMP-2, TNF- α and IL-13) were normalized against β-actin (β-ACTIN) mRNA levels. The endogenous gene β-ACTIN was used to normalize the input amount of RNA added to the reactions. Thus, to determine the amplification efficiency of the assays, a set of 5x dilution series, ranging from 242.5 ng/ml to 0.0024 ng/ml, was prepared from RNA of an ovarian sample used to generate standard curves for each gene. To standardize the results for accurate comparison of gene expression between samples, the same RNA concentration (1 ng/ml) was used for all samples. The comparative threshold cycle (CT) ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) method was used for calculating relative mRNA expression.

The program profile used for amplification was 95°C for 2 min followed by 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s, annealing for 30 s and elongation at 60°C for 30 s. The annealing temperatures used are shown in Table 1. The amplification primers were obtained from Integrated DNA Technologies (IDT®), and the sequences used are shown in Table 1.

**Table 1** Details of the sequences used for quantitative real-time polymerase chain reaction amplification of mRNA from equine blood samples.

Target	Sequences	References
<i>IL-1<math>\beta</math></i>	For 5'-TGTACCTGTCTTGTGGGATGAAA-3' Rev 5'-TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA-3'	(Sánchez-matamorros, 2013)
<i>TNF-<math>\alpha</math></i>	For 5'-GCTCCAGACGGTGCTTGTG-3' Rev 5'-GCCGATCACCCCAAAGTG-3'	(Riihimäki et al., 2008)
<i>IL-4</i>	For 5'-CAAAACGCTGAACAACCTCA-3' Rev 5'-CTGTTGAAGCACCTTTGCAG-3'	(Sánchez-matamorros, 2013)
<i>IL-13</i>	For 5'-CTGGAGTCCCTGAGCAACGT-3' Rev 5'-CCACCTGCAGTGCCATCCAAAACAC-3'	(Rhyner, 2008)
<i>IFN<math>\gamma</math></i>	For 5'-TGGACACCATCAAGGAGGAC-3' Rev 5'-GGACCTTCAGATCATTACCG-3'	(Sánchez-matamorros, 2013)
<i>MMP2</i>	For 5'-ATG GCG CCC ATT TAC ACG TA-3' Rev 5'-AGC TCT TG A ATG CCC TTG ATG-3'	(Yuan et al., 2010)
<i>TIMP2</i>	For 5'-GGTGGACTCTGGGAACGACA-3' Rev 3'-CGAGGAGGGAGCCGTGTAGA-5'	(Sessions-Bresnahan et al., 2014)
<i>GAPDH</i>	For 5'-GATTGTCAGCAATGCCTCCT-3' Rev 5'-AAGCAGGGATGATGTTCTGG-3'	(Coyne et al., 2009)
<i>ACTB</i>	For 5'-CGACATCCGTAAGCACCTGT-3' Rev 3'-GTGGACAATGAGGCCAGAAT-5'	(Coyne et al., 2009)

Abbreviations: For, forward primer; Rev, reverse primer; IL1 $\beta$ , Interleukin – 1 $\beta$ ; TNF- $\alpha$ , Tumor Necrosis Factor – alpha; IL4, Interleukin – 4; IL13, Interleukin – 13; IFN $\gamma$ , Interferon gamma; MMP-2, matrix metalloproteinase-2; TIMP2, Tissue inhibitor of metalloproteinases 2; GAPDH, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; ACTB, Beta-actin.

## 2.7 Statistical analysis

Gene expression of IL-4, IFN- $\alpha$ , TIMP-2, IL-1 $\beta$ , MMP-2, TNF-  $\alpha$  and IL-13 were considered as dependent variables. Allergic horses and specific diagnosis were considered as independent variables. Variables were evaluated for normality; those not meeting normal distribution were evaluated by non-parametric statistics Kruskal Wallis test. Data are presented as means  $\pm$  standard error. Differences  $P \leq 0.05$  were considered significant. Differences  $> 0.05$  and  $\leq 0.1$  were considered tendency.

Spearman correlation was performed between dependent variables, in each subgroup. Differences  $P \leq 0.05$  were considered significant.

## 3. RESULTS

The Control Group was constituted by one Thoroughbred stallion, two Mini Pony stallions, one Criollo stallion, five Thoroughbred mares, three mixed breed mares, two Mini Pony mares, one Criollo mare and one Brazilian Sport Horse mare. The median age between the horses of the Control Group was 11 years.

The Allergic Group was divided in two subgroups. Amongst the horses of the AD Group (eleven horses), three were Criollo mares and one gelding, four were Brazilian Sport Horse geldings and two mares and one mixed breed gelding. The median age between the horses was 9,4 years. The median onset of clinical signs was 3 years. Between horses of the IBH Group (seven horses), four were Criollo mares, one stallion, and one gelding, and one Mini Pony stallion. The median age of the IBH horses was 7,2 years, and clinical signs started around 4 years old.

Gene expression of IL-4, IFN- $\alpha$ , TIMP-2, IL-1 $\beta$ , MMP-2, TNF-  $\alpha$  and IL-13 was verified in all blood samples evaluated. Statistical differences were observed in the gene expression of IL-4. IBH horses presented greater IL-4 expression than controls. Differences were observed in the gene expression of TIMP-2. IBH and Control horses presented greater TIMP2 expression than Atopic horses. Differences were observed in the gene expression of MMP-2. IBH horses presented greater MMP2 expression than Controls. Differences were observed in the gene expression of IL-13. IBH horses presented greater IL13 expression

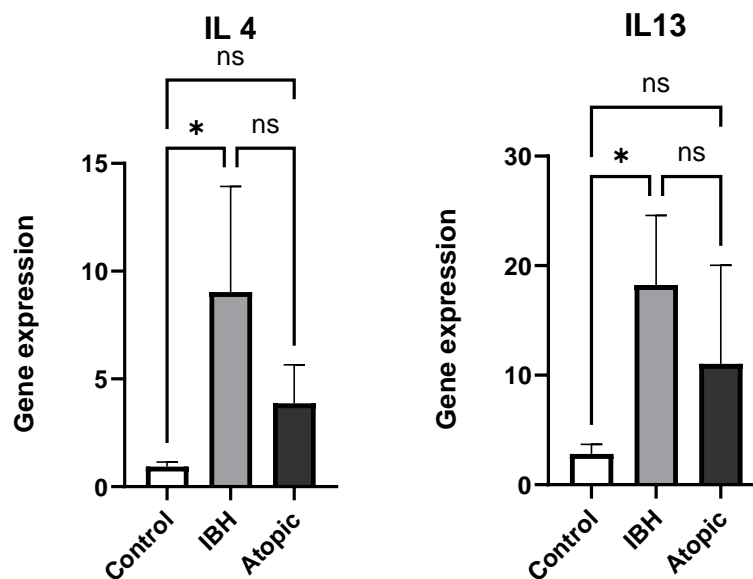


than controls. Differences were not observed in the gene expression of IFN-gamma, IL-1 $\beta$  and TNF-a.

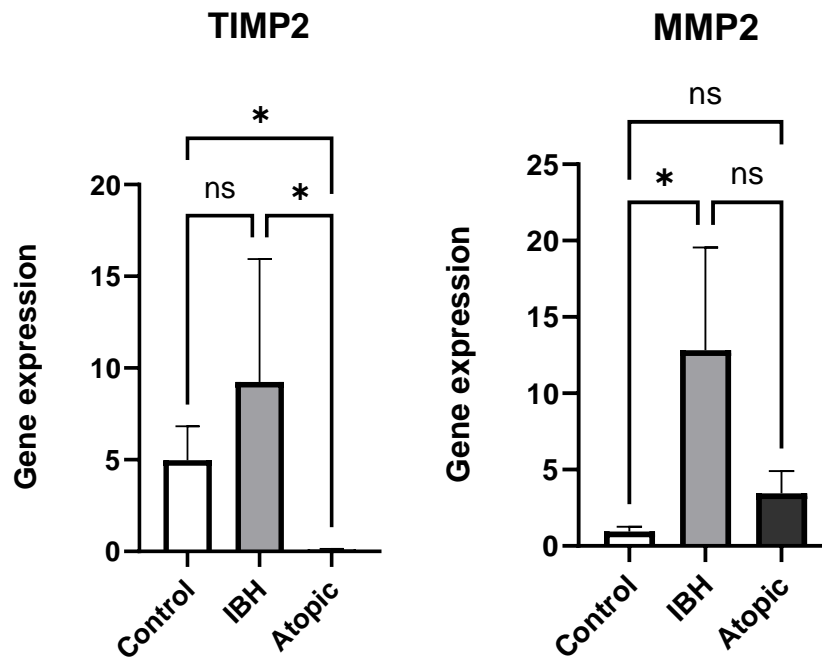
Spearman correlation of the target cytokines in the blood leukocytes from IBH group, showed significant positive correlations ( $P < 0.05$ ) between: IL4-IFN ( $P=0.024$ ), IL4-TIMP2 ( $P=0.022$ ), INF-TIMP2 ( $P=0.017$ ) (Fig. 5).

Spearman correlation of the target cytokines in the blood leukocytes from Atopic group, showed significant positive correlations ( $P < 0.05$ ) between: IL4-IFN ( $P=0.073$ ), IL4-IL1 ( $P=0.060$ ), INF-IL1 ( $P=0.00$ ) (Fig. 6).

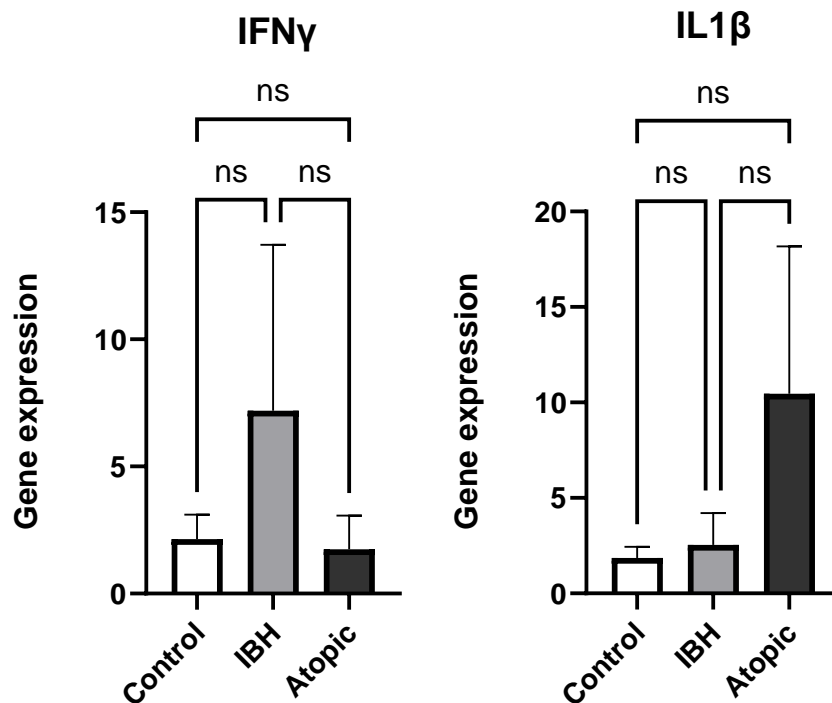
The figure 7 showed a horse of the Atopic Group showing self-induced excoriation, hypotrichosis and alopecia in dorsolateral region of the neck and trunk. The figure 8 showed a horse of the IBH Group showing self-induced abrasions, alopecia and crusts in rump and base of tail. The figure 9 showed a horse of the IBH Group showing papules, alopecia, lichenification and hyperpigmentation in ears and base of the mane.



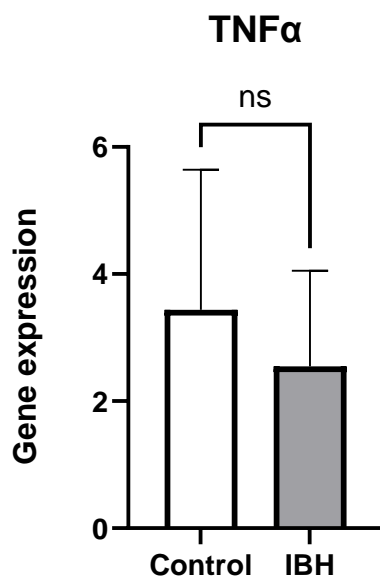
**Fig. 7.** Mean ( $\pm$ SD) gene expression of target cytokines (Interleukin-4, Interleukin-13) in the blood leukocytes from different study groups: Control, IBH, Atopic. NS no significant difference, (\*) represent significant differences ( $P < 0.05$ ) between groups.



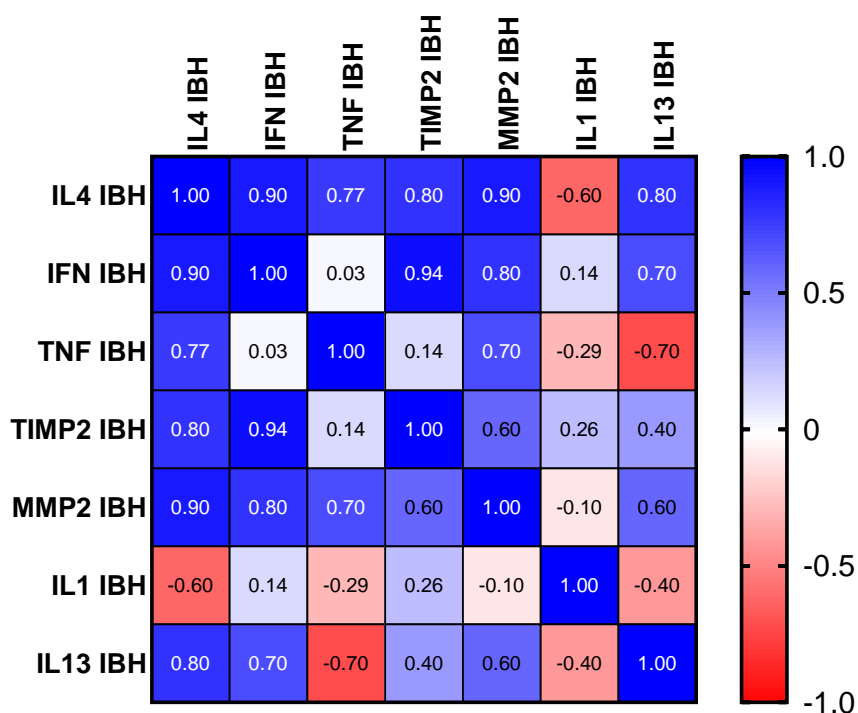
**Fig. 8.** Mean ( $\pm$ SD) gene expression of target cytokines (Tissue Inhibitor of Metalloprotease-2, Matrix Metalloproteinase 2) in the blood leukocytes from different study groups: Control, IBH, Atopic. NS no significant difference, (\*) represent significant differences ( $P < 0.05$ ) between groups.



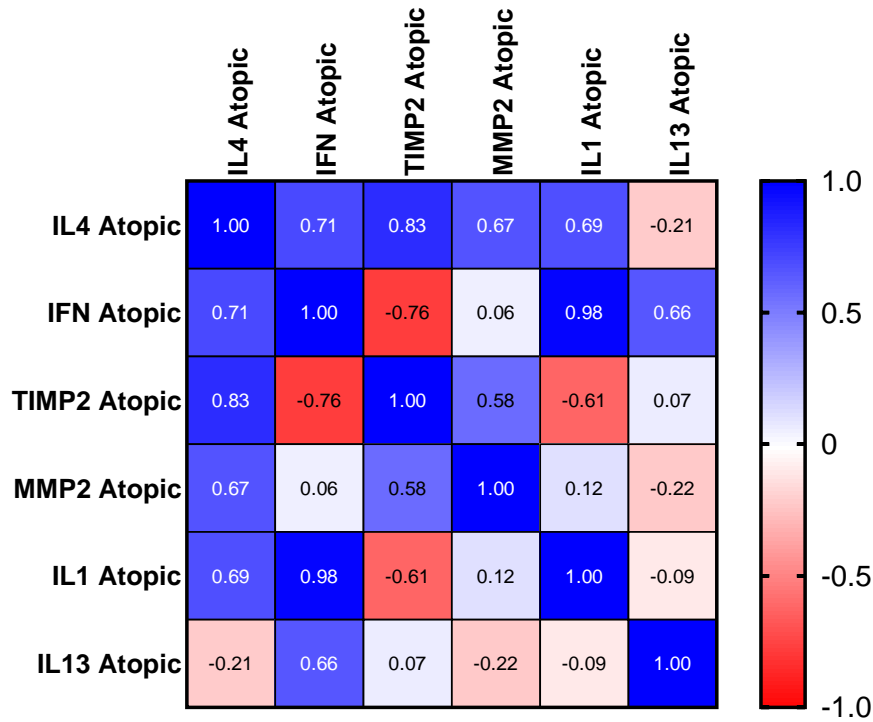
**Fig. 9.** Mean ( $\pm$ SD) gene expression of target cytokines (Interferon gamma, Interleukin-1 $\beta$ ) in the blood leukocytes from different study groups: Control, IBH, Atopic. NS no significant difference, (\*) represent significant differences ( $P < 0.05$ ) between groups.



**Fig. 10.** Mean ( $\pm$ SD) gene expression of target cytokines (TNF-alpha) in the blood leukocytes from different study groups: Control, IBH, Atopic. NS no significant difference, (\*) represent significant differences ( $P < 0.05$ ) between groups.



**Fig. 11.** Heatmap spearman correlation ( $R^2$ ) of the target cytokines in the blood leukocytes from IBH group. Significant correlations ( $P < 0.05$ ) between groups: IL4-IFN ( $P=0.024$ ), IL4-TIMP2 ( $P=0.022$ ), INF-TIMP2 ( $P=0.017$ ).



**Fig. 12.** Heatmap spearman correlation ( $R^2$ ) of the target cytokines in the blood leukocytes from Atopic group. Significant correlations ( $P < 0.05$ ) between groups: IL4-IFN ( $P=0.073$ ), IL4-IL1 ( $P=0.060$ ), INF-IL1 ( $P=0.00$ ).



**Fig. 13.** Horse of the Atopic Group showing self-induced excoriation, hypotrichosis and alopecia in dorsolateral region of the neck and trunk (personal).



**Fig. 14.** Horse of the IBH Group showing self-induced abrasions, alopecia and crusts in rump and base of tail (personal).



**Fig. 15.** Horse of the IBH Group showing papules, alopecia, lichenification and hyperpigmentation in ears and base of the mane (personal).

#### **4. DISCUSSION**

The exact prevalence of Atopic Dermatitis in horses is unknown, although it is considered the seventh most common equine dermatosis (Scott; Miller, 2011). In our study, Atopic Dermatitis was more prevalent than IBH, the opposite of what is observed in the literature that considers IBH the most common allergic skin disorder of the horse (Scott; Miller, 2011).

All horses of the Allergic Group presented pruritus as their main clinical sign. Pruritus is identified as self-biting, rubbing (against stalls, trees, fences, etc.), stomping feet, flicking tails and, rarely, shaking heads (Rees, 2003; Yu, 2006; Scott; Miller, 2011). Seasonality was not remarkable, as Atopic and IBH horses showed perennial pruritus, although with different intensity along the year. This is probably due to Rio Grande do Sul temperate climate (subtropical type).

Equine atopic dermatitis (AD) can have familial and breed-related predispositions (Littlewood, 2007). Clinical signs are firstly observed between 1,5 and 6 years old and no sex predilection is apparent (Scott; Miller, 2011). None of the horses of the Atopic Group were related, but most of them were pure breed and started clinical signs around 3 years old. There was no sex predilection.

As observed in Atopic Group, the most common clinical sign of AD is bilaterally symmetric pruritus affecting mainly the face, pinnae, ventral thorax and abdomen, legs and dorsolateral region of the neck (Figure 7). Besides frequently observed in literature (Scott; Miller, 2011), the mane, croup and base of the tail were not affected amongst the horses of the AD Group. Self-induced hypotrichosis and alopecia were common. Although commonly documented (Rees, 2003; White, 2005; Yu, 2006; Scott; Miller, 2011), no signs of excoriations or secondary bacterial infection, with or without lichenification and hyperpigmentation, were noticed.

IBH may be seen in any breed, all ages, either sex. Most horses first develop clinical signs at 3 to 4 years old. Coat color is not a risk factor (Scott; Miller, 2011; Littlewood, 2007; Bjornsdóttir et al., 2006; Broström et al., 2006). Familial involvement is documentable in around one-third of the cases (Scott; Miller, 2011). In our study, most of the IBH Group was from Criollo breed, age onset of clinical signs was 4 years old, and no sex predisposition was observed.

In the IBH Group, we observed that the ears, face, chest, limbs, withers, rump, base of tail, inguinal region and ventral midline were affected (Figures 8 and 9), in accordance with what is observed in literature (Petersen, 2009; Pilsworth, 2004; van den Boom, 2008; Scott; Miller, 2011). Horses of the IBH Group presented variable intensity of secondary lesions, as papules, self-induced abrasions, alopecia, lichenification and hyperpigmentation. Self-trauma and chronicity commonly lead to those secondary signs (Petersen, 2009; Pilsworth,

2004). None of the horses of the IBH Group presented involvement of the flanks, as observed by Pilsworth and Knottenbelt (2004).

IL-4 is a complex glycoprotein produced mostly by mast cells, basophils, eosinophils and neutrophils (Chomarat; Banchereau, 1998) with B-cell stimulatory, Th2-promoting properties and a T-cell suppressor role. IL-4 is also responsible for immunoglobulin isotype switching to IgE (Lebman; Coffman, 1988) and exerts potent inhibitory activity on macrophages. Among the molecules for which synthesis is inhibited by IL-4 are TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (Luzina et al., 2012). In our study, we found that IBH horses presented greater IL-4 expression than controls, but there was no statistical difference between gene expression of TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , thus showing an inhibition pathway.

IBH horses presented greater MMP-2 expression than Controls, and IBH and Control horses presented greater TIMP-2 expression than Atopic horses. IL-4 increases the TIMP-2/MMP-2 ratio, thereby supporting the profibrotic effect of this cytokine (Bergeron et al., 2003; Buttner et al., 2004). IL-4 acts as a regulator of inflammation levels, which reflects a physiologic effort to control tissue damage during immune responses (William, 2003).

IL-13 is homologous to IL-4 and shares many of its biologic activities on mononuclear phagocytic cells, endothelial cells, epithelial cells, and B cells (Sahiner et al., 2022). IL-13 plays a predominant role in allergic inflammation. The intracellular site of storage of IL-13 in eosinophils is associated with the crystalloid granules, suggesting that IL-13 is a preformed mediator that is released upon stimulation of degranulation (Davoine; Lacy, 2014). IL-13 also promotes isotype switching to IgE (Mak; Saunders, 2006). IBH horses presented greater IL-13 expression than controls. Like IL-4, IL-13 inhibits macrophage production of TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and pro-inflammatory chemokines (Mak; Saunders, 2006), thus showing an inhibition pathway as IL-4.

The biological actions of IFN $\gamma$  can be attributed to its ability to activate or inhibit the expression of specific target genes through its binding to specific cell surface receptors, expressed on virtually all types of cells (Jan Vilčekjunming, 1998), regulating immunity and bridge the innate and specific immune response pathways (Susan Payne, 2017).

Interleukin-1 $\beta$  (IL-1  $\beta$ ) is a product of monocytes, macrophages, and dendritic cells as well as B lymphocytes, neutrophils, and natural killer cells

(Garlanda; Jailom, 2016). It is a primary cytokine of the skin that has a pivotal role in keratinocyte differentiation, epidermal wound healing and host defense. Pathological increase of cutaneous IL-1 $\beta$  is associated with edema formation, epidermal hyperproliferation and atopic dermatitis (Kolm et al., 2006). Our data showed no statistical difference in gene expression of IL1 $\beta$  between groups. Horses of the Allergic Group had no edema formation, and only IBH horses presented mild hyperkeratosis.

Tumor necrosis factor (TNF) is mainly produced by activated macrophages, T lymphocytes, and natural killer (NK) cells. It plays an important role in controlling infection (Atzeni; Sarzi-Puttini, 2013). Our data showed no statistical difference in gene expression of TNF- $\alpha$  between groups. As none of the horses presented bacterial skin infection or allergic granulomas, these results are coherent with previous authors.

In conclusion, our study provides valuable insights into the prevalence and clinical presentation of AD and IBH in horses. Contrary to existing literature that identifies IBH as the most common allergic skin disorder in horses, our findings indicate a higher prevalence of AD. Pruritus was the predominant clinical sign in the allergic group, manifesting perennially with varying intensity, likely influenced by the subtropical climate of Rio Grande do Sul. Both AD and IBH showed no significant sex predilection and similar age onset of symptoms. AD primarily affected specific body regions such as the face, pinnae, ventral thorax, and abdomen, with some deviations from common literature findings. IBH affected a broader range of body parts with notable secondary lesions due to self-trauma. The study also highlighted significant molecular differences, including greater IL-4 and IL-13 expression in IBH horses, indicating a complex immunological landscape involving inhibition pathways and regulation of inflammation levels. Overall, these findings contribute to a better understanding of equine allergic dermatoses, emphasizing the need for further research to explore the underlying genetic and environmental factors influencing these conditions.



## REFERENCES

Aggarwal, N., Holmes, M. A. Characterization of equine T helper cells: demonstration of Th1- and Th2-like cells in long term equine T-cell cultures. **Research in Veterinary Science**. v. 66, p. 277–279. 1999.

Atzeni, F. et al., Immunogenicity and autoimmunity during anti-TNF therapy. **Autoimmunity reviews**. v. 12. n. 7. p. 703-8. 2013.

Bergeron et al., Regulation of procollagen I (a1) by interleukin-4 in human bronchial fibroblasts: a possible role in airway remodeling in asthma. **Clinical and experimental allergy**. v. 33. p. 1389–1397. 2003

Bjornsdóttir, S., et al. Summer eczema in exported horses: influence of environmental and genetic factors, **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 48. n. 3. 2006.

Broström, H., et al. Genetic parameters for allergic eczema in Icelandic horses, **Veterinary Dermatology**. v. 17. p. 357. 2006.

Buttner et al., Transcriptional Activation of the Type I Collagen Genes COL1A1 and COL1A2 in Fibroblasts by Interleukin-4: Analysis of the Functional Collagen Promoter Sequences. **Journal of cellular physiology**. v. 198. p. 248–258. 2004.

Caproni, M. et al. Infiltrating cells and related cytokines in lesional skin of patients with chronic idiopathic urticaria and positive autologous serum skin test. **Experimental Dermatology**. v. 12. n. 5. p. 621–8. 2003.

Chomarat, P.; Rybak, M. E., Bancereau, J. Interleukin-4. In: Thomson, A. W., **The Cytokine Handbook**. 3rd ed. San Diego. p. 133–174. 1998.

Davoine, F.; Lacy, P., Eosinophil cytokines, chemokines, and growth factors: emerging roles in immunity. **Frontiers in Immunology**. v. 5. p. 570. 2014.

Edwards, D. R., et al. The role of tissue inhibitors of metalloproteinases in tissue remodelling and cell growth. **Journal of Obesity**. v. 20. p. 9–15. 1996.

Edwards, D. R., et al., Transforming Growth Factor Beta Modulates the Expression of Collagenase and Metalloproteinase Inhibitor. **The EMBO Journal**. v. 6. p. 1899-1904. 1987.

Fettelschoss-Gabriel et al. Active vaccination against interleukin-5 as long-term treatment for insect-bite hypersensitivity in horses. **Allergy**. v. 74. p. 572–82. 2019.

Fettelschoss-Gabriel et al. Treating insect-bite hypersensitivity in horses with active vaccination against IL-5. **Journal of Allergy Clinical Immunology**. v. 142. n. 4. 2018.

Garlanda, C.; Jaillon, S. Molecular Immunology. in: **Encyclopedia of Immunobiology**. Elsevier. 2016.

Gonzales, A. J. et al. IL-31-induced pruritus in dogs: a novel experimental model to evaluate antipruritic effects of canine therapeutics. **Veterinary Dermatology**. v. 27. n. 34. p. e10. 2016.

Gonzales, A. J. et al. Interleukin 31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**. v. 24. p. 48–53. e11–2. 2013.

Hall et al. Simultaneous detection and quantification of six equine cytokines in plasma using a fluorescent microsphere immunoassay (FMIA). **MethodsX**. v. 2. p. 241-248. 2015.

Hamelmann, E., Gelfand, E. W. IL-5-induced airway eosinophilia the key to asthma? **Immunological Reviews**. v. 179. p. 182–191. 2001.

Hansen, S. et al., Age-related changes in intracellular expression of IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  in equine lymphocytes measured in bronchoalveolar lavage and

peripheral blood. **Developmental and Comparative Immunology**. v. 39. p. 228–233. 2013.

Jager, W. de et al. Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 10. n. 1. p. 133-9. 2003.

Kato, N. et al., Increased levels of serum tissue inhibitor of metalloproteinase-1 but not metalloproteinase-3 in atopic dermatitis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 127. p. 283–288. 2002.

Kerr, L. D., Miller, D. B.; Matrisian, L. M.: TGF- $\beta$  Inhibition of Transin/Stromelysin Gene Expression Is Mediated Through a Fos-Binding Sequence. **Cell**. v. 61. p. 267-278. 1990.

Klonowska, J. et al. New cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis-new therapeutic targets. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 9. n. 19. p. 3086. 2018.

Kolm G. et al., Increased interleukin-1 $\beta$  mRNA expression in skin biopsies of horses with Culicoides hypersensitivity following challenge with *Culicoides nubeculosus* extract. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 113. p. 90-98. 2006.

Lavoie-Lamoureux, A. et al., IL-4 activates equine neutrophils and induces a mixed inflammatory cytokine expression profile with enhanced neutrophil chemotactic mediator release ex vivo. **American Journal of Physiology: Lung Cellular and Molecular Physiology**. v. 299. p. 472–482. 2010.

Lebman, D. A.; Coffman, R. L. Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. **Journal of experimental medicine**. v. 168. p. 853-62. 1988.

Littlewood, J. D.: Equine allergic skin disease, **British Veterinary Dermatology Study Group**. Autumn, v. 53, 2007.

Littlewood, J. D.; Lloyd, D. H.; Craig, J. M. **Practical Equine Dermatology**. Wiley Brackwell. 2nd Edition. 2022.

Luzina, I. G. et al. Regulation of inflammation by interleukin 4: a review of “alternatives”. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 2. n. 4. p. 753–764. 2012.

Luzina, I. G. et al., Natural production and functional effects of alternatively spliced interleukin 4 protein in asthma. **Cytokine**. v. 58. p. 20–26. 2012.

Luzina, I. G. et al., Alternatively spliced variants of interleukin 4 promote inflammation differentially. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 89. p. 763–770. 2011.

Mak, T. W.; Saunders, M. E. The Immune Response: **Basic and Clinical Principles**. 1st Edition. Elsevier. 2006.

Marsella et al. Equine allergic skin diseases: Clinical consensus guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology, **Veterinary Dermatology**. v. 34. n. 3, 2023.

Michels, G. M. et al. A blinded, randomized, placebo-controlled, dose determination trial of lokivetmab (ZTS-00103289), a caninized, anti-canine IL-31 monoclonal antibody in client owned dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**. v. 27. p. 478-129. 2016.

Payne, S. Immunity and resistance to viruses. In: **Viruses**. 2nd Edition. p. 73-88. 2017.

Petersen, A. Insect hypersensitivity. In Robinson, N. E., Sprayberry, K. A. **Current therapy in equine medicine VI**, St. Louis, Saunders Elsevier. 2009.

Pilsworth, R. C., Knottenbelt, D. C. Equine insect hypersensitivity, **Equine Veterinary Education**. v. 16. p. 324, 2004.

Rees, C. A. Atopy. In Robinson, N. E.: **Current therapy in equine medicine V**, St. Louis. Saunders Elsevier, p. 181. 2003.

Rees, C. A. Disorders of the skin. In Reed, S. M. et al: **Equine internal medicine II**, St. Louis. Saunders Elsevier, p. 667. 2004.

Sahiner, U., Akdis, M., Akdis, C. A. Introduction to Mechanisms of Allergic Diseases. In: **Allergy Essentials**. 2nd Edition. Elsevier p. 1-24. 2022.

Scott, D., Miller, W. **Equine Dermatology**. 2nd Edition, Elsevier, 2011.

Shamji, M. H.; Durham, S. R., Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. **Journal of Allergy Clinical Immunology**. v. 140. p. 1485-98. 2017.

Spencer, L. A. et al., Human eosinophils constitutively express multiple Th1, Th2, and immunoregulatory cytokines that are secreted rapidly and differentially. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 85. p.117–23. 2009.

van den Boom, R. et al. Identification of factors associated with the development of insect-bite hypersensitivity in horses in the Netherlands, **Tijdschrift Diergeneesk.** v.133. p. 554, 2008.

VilčekJunming, J. L. **Encyclopedia of Immunology**. 2nd Edition San Diego: Academic Press. 1998.

Vonakis, B. M.; Saini, S. S. New concepts in chronic urticaria. **Current Opinion in Immunology**. v. 20. n. 6. p.709-16. 2008.

Wagner et al. IgE and IgG antibodies in skin allergy of the horse. **Veterinary Research**. v. 37. p. 813, 2006.

White, S. Advances in equine atopic dermatitis, serologic and intradermal allergy testing. **Clinical Techniques in Equine Practice**. Elsevier. v. 4. p. 311-313. 2005.

White, S. D. Advances in equine atopic dermatitis, serologic and intradermal allergy testing, **Clinical Techniques in Equine Practice**. v. 4. p. 311, 2005.

White, S. D. Diseases of the skin. In Smith BP editor: **Large animal internal medicine IV**, St. Louis. Saunders Elsevier, p. 1306. 2009.

Woessner, J. F. J. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodelling. **Journal of Federation of American Societies for Experimental Biology**. v. 5. p. 2145–54. 1991.

Yu, A. A. Atopy, **Proceedings American Association of Equine Practitioners** v. 52. p. 466, 2006.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presente pesquisa pode ser realizada com diferentes grupos de animais dermatopatas, o que permitiu a análise desses subgrupos em relação ao painel gênico selecionado.

A avaliação leucocitária do sangue periférico demonstrou grande sensibilidade na determinação da correlação entre as dermatopatias e a expressão gênica das citocinas selecionadas, indicando a sensível alteração sistêmica devido as reações alérgicas dos equinos enfermos.

Nossa hipótese foi confirmada parcialmente. Identificamos que as citocinas com função inflamatória estão aumentadas dos animais do Grupo Alérgico comparada aos animais do Grupo Controle. Porém, dentro do Grupo Alérgico, identificamos que os cavalos do Grupo HPI apresentaram maior expressão de citocinas inflamatórias do que os cavalos do Grupo Atópico. Há a necessidade de novas pesquisas para explorar novos marcadores que possam ser utilizados na elaboração de testes diagnósticos e terapias-alvo específicas.

## REFERÊNCIAS

Abbas, A. K., et al. **Cellular and molecular immunology**, 7th ed. Saunders/Elsevier: Philadelphia. 2012.

Anderson, G. S. et al., Immunotherapy trial for horses in British Columbia with *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) hypersensitivity. **Journal of Medical Entomology**. v. 33. p. 458–66. 1996.

Atzeni, F. et al., Immunogenicity and autoimmunity during anti-TNF therapy. **Autoimmunity reviews**. v. 12. n. 7. p. 703-8. 2013.

Baker, K. P., Quinn, P. J. Report on clinical aspects and histopathology of sweet itch. **Equine Veterinary Journal**. v. 8. p. 10:243. 1978.

Björnsdóttir, S., et al. Summer eczema in exported Icelandic horses: influence of environmental and genetic factors. **Acta Veterinaria Scandinavica**. v. 48. p. 3. 2006.

Bourdeau, P. J., Beis, C., Chouilly, C. Evaluation of permethrin and pyriproxyfen containing spray in the treatment of sweet itch in 25 horses. In: **Proceedings of the 15th annual Member's meeting of the American Academy of Veterinary Dermatology, American College of Veterinary Dermatology**. Maui, Hawaii. v. 4. p. 13. 1999.

Braverman, Y., Chizov-Ginzburg, A. Repellency of synthetic and plant-derived preparations for *Culicoides imicola*. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 11. p. 355–60. 1997.

Caproni, M. et al. Infiltrating cells and related cytokines in lesional skin of patients with chronic idiopathic urticaria and positive autologous serum skin test. **Experimental Dermatology**. v. 12. n. 5. p. 621–8. 2003.



Chomarat, P.; Rybak, M. E., Bancereau, J. Interleukin 4. In: Thomson, A. W., **The Cytokine Handbook**. 3rd ed. San Diego. p.133–174. 1998.

Cunningham, F. M., Dunkel, B. Equine recurrent airway obstruction and insect bite hypersensitivity: understanding the diseases and uncovering possible new therapeutic approaches. **Veterinary Journal**. v. 44. p. 177:334. 2008.

Curtis, J. L. Interleukins: IL-4. Em: **Encyclopedia of Respiratory Medicine**. Elsevier. p. 354-359. 2006.

Evans, A. G. et al. Intradermal testing of horses with chronic obstructive pulmonary disease and recurrent urticaria. **American Journal of Veterinary Research**. v. 53. p. 203–8. 1992.

FADOK, V. A. Overview of equine pruritus. **Veterinary Clinics of North America**, Equine Practice, v. 11, p. 1-9, 1995.

Fadok, V. A. Update on equine allergies. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**. v. 29. p. 541–550. 2013.

Fettelschoss-Gabriel et al. Treating insect-bite hypersensitivity in horses with active vaccination against IL-5. **Journal of Allergy Clinical Immunology**. v. 142. n. 4. 2018.

Fettelschoss-Gabriel, A. et al., Active vaccination against interleukin 5 as long-term treatment for insect-bite hypersensitivity in horses. **Allergy**. v. 74. p. 572–82. 2019.

Fitzpatrick, T. B. et al. **Dermatologia em medicina geral V**, McGraw-Hill, p. 365, Nova York. 1993.

Fujita et al., Mechanisms of Immune Tolerance to Allergens. **Chemical Immunology And Allergy**. v. 96. p. 30-8. 2012.

Gershwin, L. J. Comparative immunology of allergic responses. **Annual Review Of Animal Biosciences**. v. 3. p. 27–46. 2015.

Gildea, S. et al., Humoral response and antiviral cytokine expression following vaccination of thoroughbred weanlings--a blinded comparison of commercially available vaccines. **Vaccine**. v. 31. n. 45. p. 5216-22. 2013.

Goldstein, S.M, Wintroub, B. V.: The cellular and molecular biology of the human mast cell. Em: Fitzpatrick, T. B. et al. **Dermatology in general medicine V**, New York, McGraw-Hill, p 365. 1993.

Gomez, D. E et al., Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. **European Journal of Cell Biology**. v. 74, p.111–122. 1997.

Gómez, D. E., Alonso, D. F., Yoshiji, H., Thorgeirsson, U. P. Tissue inhibitors of metalloproteinases. Structure, regulation and biological functions. **European Journal of Cell Biology**. v. 74. p. 111-22. 1997.

Gonzales, A. J. et al. IL-31-induced pruritus in dogs: a novel experimental model to evaluate antipruritic effects of canine therapeutics. **Veterinary Dermatology**. v. 27. n. 34. p.10. 2016.

Gonzales, A. J. et al. Interleukin 31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**. v. 24. p. 48–53. 2013.

González, M. et al, A survey of Culicoides developmental sites on a farm in northern Spain, with a brief review of immature habitats of European species. **Veterinary Parasitology**. v. 93. n. 143. p. 191:81. 2013.

Greiner, E. C. et al. Equine Culicoides hypersensitivity in Florida: biting midges aspirated from horses. **Medical and Veterinary Entomology**. v. 4 p. 375–81. 1990.

Hall, S. A. et al., Simultaneous detection and quantification of six equine cytokines in plasma using a fluorescent microsphere immunoassay (FMIA). **MethodsX**. p. 241-248. 2015.

Hamji, M. H., Durham, S. R. Mechanisms of allergen immunotherapy for inhaled allergens and predictive biomarkers. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 140. p. 1485–98. 2017.

Hamza, E. et al., Modulation of allergy incidence in Icelandic horses is associated with a change in IL-4-producing T cells. **International Archives of Allergy and Immunology**. v. 37. n. 73. p. 144:325. 2007.

Hamza, E., Steinbach, F., Marti, E. CD4+CD25+ T cells expressing FoxP3 in Icelandic horses affected with insect bite hypersensitivity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 44. p. 148:139. 2012.

Hendrickx, G. et al. A wind density model to quantify the airborne spread of Culicoides species during North-Western Europe bluetongue epidemic, 2006. **Preventive Veterinary Medicine**. v. 81. p. 87:162. 2008.

Hinden, S. et al., Characterization of the inflammatory infiltrate and cytokine expression in the skin of horses with recurrent urticarial. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 6, p. 503- e99, 2012.

Igawa, K. Future trends in the treatment of atopic dermatitis. **Immunological Medicine**, v. 42, n. 1, p. 10-15, 2019.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M. **Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença**. 5ª ed., Editora Artmed, 2002.

Jose-Cunilleras, E. et al. Intradermal testing in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease, recurrent urticaria, or allergic dermatitis **Journal of American Veterinary Medical Association**. v. 219. n. 8. p. 1115-1121. 2001

Kähäri, V., Saarialho-Kere, U. Matrix metalloproteinases in skin. **Experimental Dermatology**. v. 6, n. 5, p. 199-213. 1997.

Kerkelä, E. et al., Differential patterns of stromelysin-2 (MMP-10) and MT1-MMP (MMP-14) expression in epithelial skin cancers. **British Journal of Cancer**. v. 84. p. 659-69. 2001.

Klonowska, J. et al. New cytokines in the pathogenesis of atopic dermatitis-new therapeutic targets. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 9. n. 19. p. 3086. 2018.

Knottenbelt, D. **Pascoe's principles and practice of equine dermatology**. 2nd ed. Maryland Heights, Missouri: Saunders Elsevier. p. 284–5. 2009.

Kolm-Stark, G., Wagner, R. Intradermal skin testing in Icelandic horses in Austria. **Equine Veterinary Journal**. v. 10. p. 34:405. 2002.

Krengel, S. et al., MMP-2, TIMP-2 and MT1-MMP are differentially expressed in lesional skin of melanocytic nevi and their expression is modulated by UVB-light. **Journal of Cutaneous Pathology**. v.29, n. 7, p. 390-396. 2002.

Lange, S. et al. Investigation of the prevalence of summer eczema in Icelandic horses in northern Germany. **Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift**. v. 9. p. 118:481. 2005.

Lanz, S., et al. Insect bite hypersensitivity in horses is associated with airway hyperreactivity. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 31. p. 1877–1883, 2017.

Lawrence, M. G., Steinke, J. W., Borish, L. Cytokine-targeting biologics for allergic diseases. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**. v. 120, n. 4, p. 376–381, 2018.

Lincoln, V. J. et al., Protection of horses against *Culicoides* biting midges in different housing systems in Switzerland. **Veterinary Parasitology**. v. 14. p. 210:206. 2015.

Littlewood, J. D. et al. **Practical Equine Dermatology**. Wiley Brackwell. 2nd Edition. 2022.

Logas, D. et al., Cholinergic pruritus in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 201. n. 1. p. 90-1. 1992.

Lorch, G. et al. Results of intradermal tests in horses without atopy and horses with atopic dermatitis or recurrent urticaria. **American Journal of Veterinary Research**. v. 62. p. 1051–1059. 2001.

Lorch, G. et al., Sweat hypersensitivity-induced urticaria and sebaceous adenitis in an American Saddlebred. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 27. n. 6. p. 1627-32. 2013.

Mak, T. W.; Saunders, M. E. **The Immune Response: Basic and Clinical Principles**. 1st Edition. Elsevier. 2006.

Marsella, R. Allergic skin diseases. **Manual of equine dermatology**. Wallingford, United Kingdom p. 32–8. 2019.

Marsella, R. et al. Equine allergic skin diseases: Clinical consensus guidelines of the World Association for Veterinary Dermatology. **Veterinary Dermatology**. v. 34. p.175–208. 2023.

Marsella, R., De Benedetto, A. Atopic Dermatitis in Animals and People: An Update and Comparative Review. **Veterinary Science**. v. 4. p. 3. p. 37. 2017.

Marsella, R., Johnson, C., Ahrens, K., First case report of ultrastructural cutaneous abnormalities in equine atopic dermatitis. **Research in Veterinary Science**. v. 97. n. 2. p. 382-5. 2014.

Marteles, D. et al. Assessment of serum allergen-specific IgE levels in horses with seasonal allergic dermatitis and recurrent airway obstruction in Spain. **Acta Veterinaria Hungarica**. v. 67. p. 11–21. 2019.

Marti, E. et al. Maternal transfer of IgE and subsequent development of IgE responses in horses (*Equus caballus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, p. 203– 211, 2009.

Meiswinkel, R., Baylis, M., Labuschagne, K. Stabling and the protection of horses from *Culicoides bolitinos* (Diptera: Ceratopogonidae), a recently identified vector of African horse sickness. **Bulletin of Entomological Research**. v. 90. p. 509–15. 2000.

Murray, K. N., Buggey, H. F., Denes, A., Allan, S. M. Systemic immune activation shapes stroke outcome. **Molecular and Cellular Neuroscience**. v. 53, p. 14–25. 2013.

Nakashima, C., Otsuka, A., Kabashima, K. Interleukin 31 and interleukin 31 receptor: New therapeutic targets for atopic dermatitis. **Experimental Dermatology**. v. 27 n. 4, p. 327-331, 2018.

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, 2016.

Olivry, T.; Deboer, D. J.; Griffin, C. E. The ACDV task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v.81, p.143-146, 2001.

Payne, S. Immunity and resistance to viruses. In: **Viruses**. 2nd Edition. p. 73-88. 2017.

Pérez-García, L. J. Metaloproteinasas y piel/Metalloproteinases and the skin. **Actas Dermo-Sifiliográficas**. v. 95, n. 7, p. 413-423. 2004.

- Radcliffe, R. M. Anaphylaxis. In: **Equine clinical Immunology**. p. 31-38, 2016.
- Robin, M. et al., Repellent effect of topical deltamethrin on blood feeding by Culicoides on horses. **Veterinary Records**. p. 176:574. 2015.
- Rüfenacht, S. et al. Immunoglobulin E-Bearing Cells and Mast Cells in Skin Biopsies of Horses With Urticaria. **Veterinary Dermatology**, v.16, p. 94-101, 2005.
- Schaffartzik, A et al., Equine insect bite hypersensitivity: what do we know? **Veterinary Immunology Immunopathology**. v. 147, p.113-26 2012.
- Scott, D., Miller, W. **Equine Dermatology**. 2nd. Edition, Elsevier, 2011.
- Sloet Van Oldruitenborgh-Oosterbaan, M. M. et al., Intradermal testing of horses with and without insect bite hypersensitivity in The Netherlands using an extract of native Culicoides species. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 607-14, 2009.
- Stepnik, C.; Outerbridge, C.; White, S.; Kass, P. Equine atopic skin disease and response to allergen specific immunotherapy: a retrospective study at the University of California-Davis (1991–2008). **Veterinary Dermatology**, v. 23, p. 29-e7, 2011.
- Venter, G. J. et al., Assessment of the repellent effect of citronella and lemon eucalyptus oil against south African Culicoides species. **Journal of the South African Veterinary Association**. v. 85. e 1–5. 2014.
- VilčekJunming, J. L. **Encyclopedia of Immunology**. 2nd Edition San Diego: Academic Press. 1998.
- Vonakis, B. M.; Saini, S. S. New concepts in chronic urticaria. **Current Opinion in Immunology**. v. 20. n. 6. p. 709-16. 2008.
- Wagner et al. IgE and IgG antibodies in skin allergy of the horse. **Veterinary Research**. v. 37. p. 813. 2006.

Wagner, B., Allergy. In: **Equine clinical Immunology**. p. 39-45, 2016.

Wakuri, H., Mutoh, K., Liu, B. Microscopic anatomy of the equine skin with special reference to the dermis. **Okajimas Folia Anatomica Japonica**. v. 72 n. 2-3, p. 177- 83. 1995.

White, S. D. Advances in equine atopic dermatitis, serologic and intradermal allergy testing, **Clinical Techniques in Equine Practice**. v. 4. p. 311, 2005.

William, E. P. Interleukin 4. Em: **Encyclopedia of Hormones**. Elsevier. p. 416-422. 2003.

Wilson, A. D. et al., Detection of IgG and IgE serum antibodies to Culicoides salivary gland antigens in horses with insect dermal hypersensitivity (sweet itch). **Equine Veterinary Journal**. v. 33, p. 707–713, 2001.

Woerly, G. et al., Human eosinophils express and release IL-13 following CD28-dependent activation. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 72, n. 4, p. 769-779. 2002.

Yoshimoto, T. et al., Interleukin 18 together with interleukin 12 inhibits IgE production by induction of interferon- $\gamma$  production from activated B cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 94. n. 8. p. 3948–3953. 1997.

Young, H. A.; Hodge, D. L. Interferon- $\gamma$ . Em: **Encyclopedia of Hormones**. Elsevier. p. 391-397. 2003.

Yu, A. A. Insect Hypersensitivity. **AAEP Proceedings**. 2006.



## APÊNDICE – FICHA DE ATENDIMENTO DERMATOLÓGICO

FICHA CADASTRAL				
Nome do pet		Espécie		Raça
Sexo		Idade		Peso
Temperamento		Tipo pelagem		Cor pelagem
Nome do tutor		Telefone		e-mail
CPF		Endereço		
Ocupação				

Histórico	
<p>Queixa principal</p>	<input type="checkbox"/> Prurido agudo <input type="checkbox"/> Prurido crônico <input type="checkbox"/> Infecções de repetição <input type="checkbox"/> Otite aguda <input type="checkbox"/> Otite crônica <input type="checkbox"/> Nódulo <input type="checkbox"/> Perda de pelos <input type="checkbox"/> Descamação <input type="checkbox"/> Mau odor <input type="checkbox"/> Eritema  Observações:
<p>Com que idade o problema começou?</p>	<input type="checkbox"/> < 1 ano <input type="checkbox"/> 1 a 3 anos <input type="checkbox"/> >4 anos
<p>Sazonalidade</p>	<input type="checkbox"/> Não observa <input type="checkbox"/> Primavera <input type="checkbox"/> Verão <input type="checkbox"/> Outono <input type="checkbox"/> Inverno
<p>O problema piorou progressivamente?</p>	<input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não
<p>Onde o problema começou?</p>	<input type="checkbox"/> Nariz <input type="checkbox"/> Focinho <input type="checkbox"/> Dorso <input type="checkbox"/> Periorcular <input type="checkbox"/> Orelhas <input type="checkbox"/> Abdômen <input type="checkbox"/> Pescoço <input type="checkbox"/> Flancos <input type="checkbox"/> Virilhas <input type="checkbox"/> Cauda <input type="checkbox"/> Anteriores <input type="checkbox"/> Posteriores <input type="checkbox"/> Peito <input type="checkbox"/> Patas posteriores <input type="checkbox"/> Patas anteriores

<p>Quais regiões do corpo o pet lambe, mastiga ou fricciona?</p>	<input type="checkbox"/> Focinho <input type="checkbox"/> Periocular <input type="checkbox"/> Orelhas <input type="checkbox"/> Abdômen <input type="checkbox"/> Pescoço <input type="checkbox"/> Costas <input type="checkbox"/> Flancos <input type="checkbox"/> Virilhas <input type="checkbox"/> Cauda <input type="checkbox"/> Anteriores <input type="checkbox"/> Patas anteriores <input type="checkbox"/> Posteriores <input type="checkbox"/> Patas posteriores <input type="checkbox"/> Pelto
<p>Outros sinais</p>	<input type="checkbox"/> Tosse <input type="checkbox"/> Espirro <input type="checkbox"/> Lacrimejamento <input type="checkbox"/> Vômito <input type="checkbox"/> Diarréia <input type="checkbox"/> Obstipação <input type="checkbox"/> Constipação <input type="checkbox"/> Muco nas fezes <input type="checkbox"/> Sangue nas fezes <input type="checkbox"/> Flatulência <input type="checkbox"/> Claudicação <input type="checkbox"/> Polidipsia <input type="checkbox"/> Poliúria <input type="checkbox"/> Ganho de peso <input type="checkbox"/> Perda de peso
<p>Contactantes</p>	<input type="checkbox"/> Cão <input type="checkbox"/> Gato <input type="checkbox"/> Galinhas <input type="checkbox"/> Equinos <input type="checkbox"/> Outro:
<p>Contactantes com problemas de pele?</p>	<input type="checkbox"/> Sim Qual? <input type="checkbox"/> Não
<p>Alguma das pessoas do convívio tem lesões?</p>	<input type="checkbox"/> Sim Quais? <input type="checkbox"/> Não
<p>Local onde vive</p>	<input type="checkbox"/> Cocheira <input type="checkbox"/> Campo <input type="checkbox"/> Parcialmente estabulado
<p>Atividade esportiva</p>	<input type="checkbox"/> Sim: <input type="checkbox"/> Não
<p>Atividade reprodutiva</p>	<input type="checkbox"/> Sim Frequência: <input type="checkbox"/> Não
<p>Banhos</p>	<input type="checkbox"/> 1x na semana <input type="checkbox"/> 2x na semana <input type="checkbox"/> A cada 2 semanas

	<input type="checkbox"/> A cada 3 semanas <input type="checkbox"/> Mensal <input type="checkbox"/> Irregular <input type="checkbox"/> Xampu terapêutico Qual:	
Controle de Ectoparasitas <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Produto	
	Frequência de uso	<input type="checkbox"/> Mensal <input type="checkbox"/> Trimestral <input type="checkbox"/> Semestral ou mais <input type="checkbox"/> Irregular
Controle de Endoparasitas <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Produto	
	Frequência de uso	<input type="checkbox"/> Mensal <input type="checkbox"/> Bimestral <input type="checkbox"/> Trimestral <input type="checkbox"/> Semestral ou mais <input type="checkbox"/> Irregular
Vacinação	<input type="checkbox"/> Atualizada <input type="checkbox"/> Desatualizada	<input type="checkbox"/> Influenza <input type="checkbox"/> Raiva <input type="checkbox"/> <input type="checkbox"/>
	Já teve reação vacinal? <input type="checkbox"/> Sim <input type="checkbox"/> Não	Qual vacina: Qual reação? <input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Urticária <input type="checkbox"/> Angioedema <input type="checkbox"/> Convulsão <input type="checkbox"/> Gastrointestinal <input type="checkbox"/> Lesões de pele <input type="checkbox"/> Alterações hematológicas
Testes de doenças infecciosas	<input type="checkbox"/> AIE: <input type="checkbox"/> Mormoc:	
Alimentação	<input type="checkbox"/> Ração: <input type="checkbox"/> Verde	
Mudanças recentes na casa e/ou rotina	<input type="checkbox"/> Sim Quais? <input type="checkbox"/> Não	
Tratamentos anteriores	Houve melhora	Não houve melhora

Doenças crônicas concomitantes	
Exames anteriores	

<b>Exame físico</b>	
<div style="border: 1px solid black; padding: 5px; display: inline-block; margin-bottom: 10px;">Pelagem:</div> <p>O diagrama ilustra o exame físico de um cavalo. No topo, duas vistas laterais do cavalo são mostradas, rotuladas como 'Lado direito' e 'Lado esquerdo'. No centro, há uma vista frontal da cabeça com uma linha horizontal rotulada 'Linha superior dos olhos'. Abaixo disso, há uma vista dorsal do corpo rotulada 'Pessoa vista inferior'. À esquerda e à direita das pernas, há vistas posteriores dos membros anteriores e posteriores, rotuladas como 'Esquerdo' e 'Direito'. No canto inferior direito, há uma pequena imagem rotulada 'Focinho'. No canto inferior direito, há uma marca d'água: 'www.Windor.pt' e 'Atividade de investigação'.</p>	
<b>Lesões Primárias</b>	<b>Lesões Secundárias</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Mácula</li> <li><input type="checkbox"/> Mancha</li> <li><input type="checkbox"/> Placa</li> <li><input type="checkbox"/> Cisto</li> <li><input type="checkbox"/> Pápula</li> <li><input type="checkbox"/> Nódulo</li> <li><input type="checkbox"/> Púrpura</li> <li><input type="checkbox"/> Tumor</li> <li><input type="checkbox"/> Pústula</li> <li><input type="checkbox"/> Vesícula</li> <li><input type="checkbox"/> Urticária</li> <li><input type="checkbox"/> Bolha</li> <li><input type="checkbox"/> Abscesso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li><input type="checkbox"/> Descamação</li> <li><input type="checkbox"/> Crosta</li> <li><input type="checkbox"/> Alopecia</li> <li><input type="checkbox"/> Hipotricose</li> <li><input type="checkbox"/> Comedo</li> <li><input type="checkbox"/> Erosão</li> <li><input type="checkbox"/> Úlcera</li> <li><input type="checkbox"/> Fissura</li> <li><input type="checkbox"/> Necrose</li> <li><input type="checkbox"/> Escoriação</li> <li><input type="checkbox"/> Colarete</li> <li><input type="checkbox"/> Eritema</li> <li><input type="checkbox"/> Hiperpigmentação</li> <li><input type="checkbox"/> Hipopigmentação</li> <li><input type="checkbox"/> Cicatriz</li> <li><input type="checkbox"/> Hiperqueratose</li> <li><input type="checkbox"/> Liquenificação</li> <li><input type="checkbox"/> Nikolsky</li> <li><input type="checkbox"/> Sinus</li> <li><input type="checkbox"/> Hiperhidrose</li> <li><input type="checkbox"/> Calo</li> </ul>

<b>Mudanças na pele</b>	
<input type="checkbox"/> Normal <input type="checkbox"/> Espessada <input type="checkbox"/> Fina <input type="checkbox"/> Frágil <input type="checkbox"/> Hipotônica <input type="checkbox"/> Hiperextensível <input type="checkbox"/> Aumento na elasticidade <input type="checkbox"/> Ressecamento	
<b>Qualidade da pelagem</b>	<b>Configurações das lesões</b>
<input type="checkbox"/> Brilhante <input type="checkbox"/> Baça <input type="checkbox"/> Quebradiça <input type="checkbox"/> Oleosa <input type="checkbox"/> Seca <input type="checkbox"/> Epliação fácil	<input type="checkbox"/> Lineares <input type="checkbox"/> Folliculares <input type="checkbox"/> Agrupadas <input type="checkbox"/> Anulares <input type="checkbox"/> Generalizadas
<b>Áreas afetadas</b>	<b>Escore de severidade</b>
<input type="checkbox"/> Região perilabial	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa
<input type="checkbox"/> Região côncava da orelha esquerda	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa
<input type="checkbox"/> Região côncava da orelha direita	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa
<input type="checkbox"/> Região axilar esquerda	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa
<input type="checkbox"/> Região axilar direita	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa
<input type="checkbox"/> Região cervical ventral	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa
<input type="checkbox"/> Peito	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa
<input type="checkbox"/> Pata torácica esquerda	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa
<input type="checkbox"/> Pata torácica direita	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa
<input type="checkbox"/> Pata pélvica esquerda	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa
<input type="checkbox"/> Pata pélvica direita	<input type="checkbox"/> Leve

	<input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa				
<input type="checkbox"/> Região de flanco esquerdo	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa				
<input type="checkbox"/> Região de flanco direito	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa				
<input type="checkbox"/> Região ventral/medial de MPE	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa				
<input type="checkbox"/> Região ventral/medial de MPD	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa				
<input type="checkbox"/> Região inguinal	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa				
<input type="checkbox"/> Região genital	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa				
<input type="checkbox"/> Cauda	<input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa				
<b>Dor na pele</b>					
<input type="checkbox"/> Ausente <input type="checkbox"/> Leve <input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Severa					
<b>Parasitas</b>					
<input type="checkbox"/> Carrapatos <input type="checkbox"/> Piolhos <input type="checkbox"/> Carrapatos <input type="checkbox"/> Ácaros de ouvido <input type="checkbox"/> Outros:					
<b>Outros achados</b>					
<input type="checkbox"/> Linfonodos periféricos aumentados <input type="checkbox"/> Prurido em consulta <input type="checkbox"/> Lesões em cavidade oral: <input type="checkbox"/> Lesões anogenitais: <input type="checkbox"/> Lesões em coxins: <input type="checkbox"/> Outros:					
<b>Parâmetros</b>					
Freq. Card.		b.p.m.	Freq. Resp.		b.p.m.
Mucosas	<input type="checkbox"/> Pálida <input type="checkbox"/> Rosa-pálida <input type="checkbox"/> Rosada <input type="checkbox"/> Hiperêmica				
Pulso	<input type="checkbox"/> Forte	TPC			segundos

	<input type="checkbox"/> Moderado <input type="checkbox"/> Fraco <input type="checkbox"/> Irregular			
Consciência	<input type="checkbox"/> Alerta <input type="checkbox"/> Prostrado <input type="checkbox"/> Embotado	Temp. retal		°C
Escore corporal	<input type="checkbox"/> Magro <input type="checkbox"/> Ideal <input type="checkbox"/> Acima do peso <input type="checkbox"/> Obeso <input type="checkbox"/> Caquexia			

**Exames complementares solicitados em consulta**

- Citologia de pele
- Citologia de ouvido
- Citologia de nódulo
- Tricograma (EPP)
- Bacteriológico + antibiograma
- Micológico
- Check up sanguíneo
- EQU
- Urocultura
- Ultrassom abdominal
- RX
- Ecocardiograma
- Biópsia de pele
- Outro:

**Diagnóstico presuntivo**
**Conduta/Tratamento**
**Período para Revisão**
**Diagnóstico definitivo**