



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DA AMAZÔNIA- UFRA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA APLICADA À AGROPECUÁRIA**

ALESSANDRA CRISTINA OLIVEIRA PINHEIRO

**NÍVEIS DE EXPRESSÕES DOS GENES DEFENSINAS (CBD1 E CBD103) EM
RASPADOS CUTÂNEOS DE CÃES DA RAÇA POODLE COM E SEM DERMATITE**

**BELÉM
2019**

ALESSANDRA CRISTINA OLIVEIRA PINHEIRO

**NÍVEIS DE EXPRESSÕES DOS GENES DEFENSINAS (CBD1 E CBD103) EM
RASPADOS CUTÂNEOS DE CÃES DA RAÇA POODLE COM E SEM DERMATITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biotecnologia aplicada à Agropecuária: área de concentração Biotecnologia Animal, para obtenção de título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses

Co-orientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho

BELÉM

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Bibliotecas da Universidade Federal Rural da Amazônia
Gerada automaticamente mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P654n Pinheiro, Alessandra Cristina Oliveira

Níveis de expressões dos genes defensinas (CBD1 E CBD103) em raspados cutâneos de cães da raça poodle com e sem dermatite / Alessandra Cristina Oliveira Pinheiro. - 2019.
66 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Programa de PÓS-GRADUAÇÃO em Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (PPGBAA), Campus Universitário de Belém, Universidade Federal Rural Da Amazônia, Belém, 2019.

Orientador: Prof. Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses
Coorientador: Prof. Dr. Ednaldo da Silva Filho .

1. Defensinas. 2. Genes. 3. Cães. I. Meneses, Andre Marcelo Conceição , *orient.* II. Título

CDD 591.35

ALESSANDRA CRISTINA OLIVEIRA PINHEIRO

**NÍVEIS DE EXPRESSÕES DOS GENES DEFENSINAS (CBD1 E CBD103) EM
RASPADOS CUTÂNEOS DE CÃES DA RAÇA POODLE COM E SEM DERMATITE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural da Amazônia, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Biotecnologia aplicada à agropecuária: área de concentração Biotecnologia Animal, para obtenção do título de Mestre.

Data da Aprovação: 28/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Andre M c Menes **Orientador**

Dr. Andre Marcelo Conceição Meneses
Universidade Federal Rural da Amazônia

Délia Cristina Figueira Aguiar **1º Examinador**

Dr. Délia Cristina Figueira Aguiar
Universidade Federal do Pará

C. Vieira **2º Examinador**

Dr. Conceição de Maria Almeida Vieira
Universidade Federal Rural da Amazônia

Sandro Patroca da Silva **3º Examinador**

Dr. Sandro Patroca da Silva
Instituto Evandro Chagas

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por abençoar meus caminhos e renovar minhas forças a cada dia.

A minha família por sempre me encorajar em todos os meus objetivos, em especial a minha amada mãe Maria Iraci Oliveira Corrêa, que sempre está ao meu lado.

Ao meu esposo por todo amor e companheirismo sempre me apoiando em todas as dificuldades.

A minha querida irmã Aline Zulima Oliveira Pinheiro, por alegrar todos os meus dias e me motivar a seguir em frente.

Ao meu Co-orientador professor Dr. Ednaldo da Silva filho, pelos ensinamentos, orientações, dedicação e paciência durante toda a realização do trabalho.

Ao meu orientador professor Dr. Andre Meneses.

A Dr. Sinerey Aragão e os médicos veterinários do HOVET que contribuíram com as coletas e amostras para realização desse trabalho.

A todos os proprietários dos cães que cederam amostras de raspados cutâneos de seus animais.

Ao professor Dr. Alexandre Casseb e todos do laboratório de biologia molecular que colaboraram para a realização do trabalho.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 – Mecanismo de morte bacteriana por meio de PAMs -----	13
FIGURA 2 – Mecanismo de resistência bacteriana aos PAMs-----	15
FIGURA 3 – Estrutura do gene e peptídeos de HBD-----	17
FIGURA 4 – Expressão das defensinas nos diferentes tecidos -----	19
FIGURA 5 – Atividades imunomoduladoras dos PAMs-----	21
FIGURA 6 – Determinação na coloração da pelagem de cães-----	23
FIGURA 7 – Piódermite superficial -----	26
FIGURA 8 – Demodicose-----	27
FIGIURA 9 – Sarna sarcóptica-----	28
FIGURA 10 – Malassezia pachydermatis-----	29
FIGURA 11 – Dermatite por Malassezia -----	30
FIGURA 12 – Cão com DAPP -----	32
FIGURA 13 – Dermatite atópica canina-----	35
FIGURA 14 – Coleta de raspado cutâneo em cão-----	41
FIGURA 15 – Expressões gênicas relativas das defensinas (CBD1 e CBD103)-----	43

RESUMO

As defensinas são um grupo importante de peptídeos antimicrobianos e são expressas na pele e em outros tecidos de várias espécies de mamíferos. Esses peptídeos participam da imunidade inata, auxiliando na resposta imunológica. O estudo teve como objetivo comparar os níveis de expressões de genes β -defensinas (CBD1 e CBD103) em raspados cutâneos de cães da raça Poodle com e sem dermatite. Foram utilizados oito cães com dermatites e 13 cães saudáveis, oriundos do Hospital veterinário e propriedade privada. Amostras foram coletadas por raspagens cutâneas e a extração de RNA obtida pelo reagente Trizol®. Os níveis de expressões de mRNA foram estimados através do RT-PCR utilizando o Kit SYBR® Green One-step no Termociclador CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Os dados foram comparados pelo teste t de Student a 5%. As expressões relativas dos genes CBD1 e CBD103 foram significativamente maiores nos cães que apresentavam dermatite. Cães com dermatite mostraram maiores níveis de expressões de defensinas, sugerindo uma possível resposta imunológica na pele desses animais.

Palavras – chave: β -defensina canina, cães, dermatite.

ABSTRACT

Defensins are an important group of antimicrobial peptides and are expressed on the skin and other tissues of various mammalian species. These peptides participate in innate immunity, aiding in the immune response. The aim of the study was to compare the levels of β -defensin gene expression (CBD1 and CBD103) in skin scrapings of Poodle dogs with and without dermatitis. Eight dogs with dermatitis and 13 healthy dogs from the Veterinary Hospital and privately owned were used. Samples were collected by skin scraping and RNA extraction obtained by Trizol® reagent. mRNA expression levels were estimated by RT-PCR using the SYBR® Green One-step Kit on the CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Data were compared by 5% Student's t-test. Relative expressions of the CBD1 and CBD103 genes were significantly higher in dogs with dermatitis. Dogs with dermatitis showed higher levels of defensin expression, suggesting a possible immune response in the skin of these animals.

Key - words: canine β -defensin, dogs, dermatitis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO -----	9
2. OBJETIVOS -----	11
2.1 Objetivo geral -----	11
2.2 Objetivos específicos -----	11
3. REVISÃO DE LITERATURA -----	12
 3.1 Peptídeos Antimicrobianos -----	12
3.1.1 Peptídeos Antivirais -----	13
3.1.2 Peptídeos Antibacterianos -----	14
3.1.3 Peptídeos Antifúngicos -----	15
3.1.4 Peptídeos Antiparasitários -----	15
3.1.5 Mecanismo de ação dos peptídeos antimicrobianos -----	16
3.1.6 PAM e seu potencial para o desenvolvimento de resistência bacteriana -----	18
 3.2 Defensinas -----	21
 3.3 Dermatites -----	29
3.3.1 Piodermites -----	29
3.3.2 Dermatites por ácaros -----	31
3.3.3 Dermatites fúngicas -----	33
3.3.4 Dermatite alérgica à picada de pulga -----	36
3.3.5 Dermatite atópica canina -----	37
 3.4 β-defensinas e as dermatites -----	41
4. MATERIAL E MÉTODOS -----	43
 4.1 Termo de Consentimento e ético -----	43
 4.2 Critério de inclusão -----	43
 4.3 Critério de exclusão -----	43
 4.4 Populações de cães -----	43
 4.5 Coleta de amostras -----	43
 4.6 Extração e quantificação de RNA -----	44
 4.7 Iniciadores utilizados na RT-PCR -----	44
 4.8 RT-PCR -----	45
 4.9 Análises estatísticas -----	45
5. RESULTADOS -----	46

6. DISCUSSÃO -----	47
7. CONCLUSÕES -----	49
REFERÊNCIAS -----	50

1. INTRODUÇÃO

Os Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são moléculas com um número variável de aminoácidos que atuam na proteção do hospedeiro contra vários tipos de micro-organismos, tais como as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, fungos, vírus e protozoários unicelulares (HANCOCK; SCOTT, 2000; REDDY et al., 2004; MARR et al., 2006). O principal mecanismo de ação de grande parte dos PAMs é através da ruptura das membranas bacterianas ou pela translocação do peptídeo para dentro da célula, atuando em alvos intracelulares (HANCOCK; SAHL, 2006).

As defensinas fazem parte do sistema imune inato, sendo um dos principais PAMs secretados nas células da pele de mamíferos (HAZLETT; WU, 2011). A estrutura protéica dessas moléculas se apresentam na forma de folha β , com três ligações dissulfeto e formadas por seis resíduos de cisteína (YANG et al., 2002). As defensinas são classificadas em três classes de acordo com suas características estruturais: α -defensina, β -defensin e θ -defensina (YANG et al., 2002). As α -defensinas são constituidas por 29 a 35 aminoácidos, as β -defensinas apresentam 38 a 42 aminoácidos e as θ -defensinas são as menores defensinas, com apenas 18 aminoácidos (YANG et al., 2002). As α -defensinas são secretadas por neutrófilos e células do intestino, as β -defensinas secretadas na membrana conjuntiva, pele, mucosa oral, sistemas urogenital e respiratório (YANG et al., 2002). Enquanto as θ -defensinas são encontradas apenas em primatas não-humanos (SELSTED; OUELLETTE, 2005).

A resistência bacteriana tem motivado o desenvolvimento de novos antibióticos, o que incentivou muitas pesquisas a cerca de novas estratégias para combater micro-organismos patogênicos através do potencial terapêutico dos PAMs (HANEY et al., 2017). Segundo Afshar e Gallo (2013), as várias funções dos PAMs como atividade antimicrobiana e estimuladores imunológicos sugerem que eles podem ser agentes terapêuticos promissores (AFSHAR; GALLO, 2013). Muitas defensinas atualmente foram estudadas na pele de cães com problemas dermatológicos, para determinar se existe um estímulo na produção dessas defensinas durante os processos inflamatórios e infecciosos na pele dos cães (VAN DAMME et al., 2009; SANTORO et al., 2011; LANCTO et al., 2013).

A Dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória da pele, na qual o principal sintoma é o prurido, podendo ocorrer posteriormente eritema, descamação e alopecia (HALLIWELL, 2006). A doença pode acometer várias espécies (equinos (WHITE, 2005), felinos (MARSELLA; BENEDETTO, 2017) e cães (BIZIKOVA et al., 2015), inclusive os

humanos (SILVESTRE-SALVADOR et al., 2017). A prevalência da DA pode chegar até 15% na população geral dos cães (HILLIER; GRIFFIN, 2001). A expressão das defensinas tem sido muito investigada em cães com dermatite atópica em comparação com cães saudáveis (VAN DAMME et al., 2009; LANCTO et al., 2013; SANTORO et al., 2013). No entanto, os resultados dos estudos ainda são divergente quanto ao perfil de expressão das defensinas. O uso de um modelo animal canino permite um controle mais eficiente das variáveis ambientais, intrínsecas e reduz a variabilidade genética (SANTORO et al., 2013). Além disso, os cães da raça poodle apresentam considerável predisposição a processos inflamatórios da pele como a adenite sebácea (PEDERSEN et al., 2012). Buscando entender melhor os efeitos dos peptídeos antimicrobianos na imunidade da pele dos cães, este estudo teve como objetivo avaliar os níveis de expressões de genes β -defensinas em raspados cutâneos de cães da raça Poodle com e sem dermatite.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar os níveis de expressões de genes β -defensinas em raspados cutâneos de cães da raça Poodle com e sem dermatite.

2.2 Objetivos específicos

- Estimar o perfil de expressão do gene β -defensina em cães com dermatite;
- Estimar o perfil de expressão do gene β -defensina em cães sem dermatite;
- Padronizar um método de análise de expressão do gene β -defensina em cães da raça poodle;
- Divulgar os resultados em revista científica.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Peptídeos antimicrobianos

Peptídeos antimicrobianos (PAMs) são oligopeptídeos com um número variável (de cinco a mais de cem) de aminoácidos e que possuem um amplo espectro de ação contra organismos direcionados que variam de vírus a parasitas. Historicamente, os PAMs também foram referidos como peptídeos de defesa do hospedeiro (RIEDL et al., 2011), peptídeos aniónicos antimicrobianos (HARRIS et al., 2009), peptídeos anfipáticos catiônicos (GROENINK et al., 1999) e peptídeos antimicrobianos α -helicoidais (HUANG et al., 2010).

A descoberta dos PAMs ocorreu em 1939, quando Dubos (1939) extraiu um agente antimicrobiano de uma cepa de *Bacillus* do solo. Este extrato foi demonstrado para proteger os ratos da infecção por *pneumococos*. No ano seguinte, Hotchkiss e Dubos (1940) fracionaram esse extrato e identificaram um PAM chamado gramicidina. Apesar de alguma toxicidade relatada associada à aplicação intraperitoneal, a gramicidina foi considerada eficaz para o tratamento tópico de feridas e úlceras (EPPS; DUBOS, 2006). Em 1941, outro PAM, a tirocidina, foi descoberta e considerada eficaz contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (DUBOS; HOTCHKISS, 1941). No entanto, a tirocidina exibiu toxicidade para as células sanguíneas humanas (RAMMELKAMP; WEINSTEIN, 1942). No mesmo ano, outro PAM foi isolado a partir de uma planta *Triticum estivum*, que posteriormente foi denominada purotonina e encontrada eficácia contra fungos e algumas bactérias patogênicas (OHTANI et al., 1977). O primeiro PAM de origem animal relatado é a defensina, que foi isolada a partir de leucócitos de coelho em 1956 (HIRSCH, 1956). Nos anos seguintes, bombinina de epitélios e lactoferrina de leite de vaca foram ambos descritos (KISS et al., 1962; GROVES et. al., 1965). Durante o mesmo tempo, também foi provado que os leucócitos humanos contêm PAMs em seus lisossomos (ZEYA; SPITZNAGEL, 1963). No total, mais de 5.000 PAMs foram descobertos ou sintetizados até o momento (ZHAO et al., 2013). Os PAM naturais podem ser encontrados em procariotas (por exemplo, bactérias) e eucariotas (por exemplo, protozoários, fungos, plantas, insetos e animais) (CONLON; SONNEVEND, 2010; LEIPPE, 1999).

Em animais, os PAMs são encontrados principalmente nos tecidos e órgãos expostos aos patógenos no ar, e acredita-se que seja a primeira linha da defesa imunológica inata (ZASLOFF, 2002; SCHÄUBER; GALLO, 2008) contra vírus, bactérias e fungos (RADEK;

GALLO, 2007). Assim, os PAM desempenham um papel importante em deter a maioria das infecções antes que causem quaisquer sintomas. Por exemplo, a pele de rã é a fonte de mais de 300 PAMs diferentes (MA et al., 2010). A maioria dos PAMs é produzida por células específicas em todos os momentos, enquanto a produção de alguns PAMs é indutível. Por exemplo, em um estudo, células epiteliais de diferentes tecidos de camundongos apresentaram aumento da taxa de transcrição de mRNA para a produção de defensina após a infecção por *Pseudomonas aeruginosa* (BALS et al., 1999).

Vários tipos de células eucarióticas estão envolvidas na produção de PAM, como as células epiteliais nos sistemas gastrintestinal e geniturinário (NIYONSABA et al., 2002; GANZ, 2003), fagócitos e linfócitos do sistema imunológico (OPPENHEIM et al., 2003). Além do envolvimento direto na imunidade inata, os PAMs também podem influenciar as respostas inflamatórias do hospedeiro durante uma infecção (KINDRACHUK et al., 2013). Sabe-se que as moléculas de lipopolissacarídeos (LPS), liberadas das bactérias como resultado do tratamento com antibiótico ou da imunidade do hospedeiro, podem induzir a produção de PAM em mamíferos (HANCOCK et al., 2000). Por exemplo, as células HEK293 produzem defensina em resposta à estimulação com LPS (BIRCHLER et al., 2001). Alguns PAMs, como por exemplo, CAP18 (LARRICK et al., 1995), CAP35 (BRACKETT et al., 1997) e um derivado de lactoferrina (ZHANG et al., 1999) também podem bloquear a liberação de citocinas induzida por LPS por macrófagos. Assim, esses PAMs podem reduzir a resposta inflamatória. Em comparação, os antibióticos não possuem esse tipo de regulação na resposta inflamatória do sistema imune do hospedeiro e a secreção de LPS após tratamento com antibiótico pode causar alta reação do sistema imune do hospedeiro. Em alguns casos extremos, isso pode até levar à sepse (LOPPNOW et al., 1990).

3.1.1 Peptídeos Antivirais

Os PAMs antivirais neutralizam os vírus integrando-se no envelope viral ou na membrana da célula hospedeira. Estudos anteriores mostraram que tanto os vírus de RNA como os de DNA envelopados podem ser alvo de PAMs antivirais (BASTIAN; SCHAFER, 2001; HORNE et al., 2005). Os PAMs ao se integrarem no envelope viral podem causar instabilidade da membrana, tornando os vírus incapazes de infectar as células do hospedeiro (SITARAM; NAGARAJ et al., 1999). Os PAMs também podem reduzir a ligação dos vírus às células hospedeiras (BELAID et al., 2002). Por exemplo, as defensinas ligam-se às

glicoproteínas virais, tornando o vírus herpes simples (VHS) incapaz de se ligar à superfície das células do hospedeiro (YASIN et al., 2004). Além de rompimento de envelopes virais e bloqueio de receptores virais, alguns PAMs antivirais podem impedir que partículas virais entrem nas células hospedeiras ocupando receptores específicos em células de mamíferos (SONG et al., 2004). Como o sulfato de heparano que é importante para a ligação das partículas virais do VHS à superfície da célula hospedeira. As moléculas de sulfato de heparano são moléculas de glicosaminoglicano carregadas negativamente. Assim, alguns péptidos catiónicos de α -hélice, por exemplo, lactoferrina, podem prevenir infecções por VHS, ligando-se a moléculas de heparano e bloqueando interações vírus-receptor (ANDERSEN et al., 2004; JENSSEN et al., 2004).

Alguns PAMs podem atravessar a membrana celular e localizar-se no citoplasma e organelas, causando mudanças no perfil de expressão gênica das células hospedeiras, o que pode ajudar o sistema de defesa do hospedeiro a lutar contra vírus ou bloquear a expressão gênica viral. Por exemplo, o NP-1, um PAM de neutrófilos de coelho, previne as linhas celulares Vero e CaSki da infecção pelo vírus herpes simples tipo 2 (VHS-2). Este PAM impede a migração de uma proteína viral importante, VP16, para o núcleo. Essa proteína é necessária para formar complexos com os fatores de transcrição do hospedeiro para induzir a expressão de genes virais imediatos, que são necessários para o vírus derrotar a resposta celular do primeiro estágio (LIU et al., 1999). Assim, este PAM não compete com partículas virais para se ligar ao receptor na superfície celular, mas impede a disseminação célula-a-célula de partículas virais (SINHA et al., 2003).

3.1.2 Peptídeos Antibacterianos

PAMs antibacterianos são os PAMs mais estudados até hoje e a maioria deles são PAM catiónicos, que têm como alvo membranas celulares bacterianas e causam a desintegração da estrutura da bicamada lipídica (SHAI, 2002; ZHANG et al., 2001). A maioria desses PAMs também é anfipática com os domínios hidrofílico e hidrofóbico. Tais estruturas fornecem aos PAMs a capacidade de se ligarem a componentes lipídicos (região hidrofóbica) e grupos fosfolipídicos (região hidrofílica) (JENSSEN et al., 2006). Curiosamente, os pesquisadores demonstraram que alguns PAMs em baixas concentrações podem matar bactérias sem alterar a integridade da membrana. Em vez de interagir diretamente com a membrana, esses PAMs matam as bactérias inibindo algumas vias

importantes dentro da célula, como a replicação do DNA e a síntese de proteínas (BROGDEN, 2005). Por exemplo, a buforina II pode se difundir nas células e se ligar ao DNA e ao RNA sem danificar a membrana celular (PARK et al., 1998). Em alguns casos, alguns PAMs demonstraram matar bactérias resistentes a antibióticos. Por exemplo, tanto a nisina (um PAM) quanto a vancomicina (um antibiótico) podem bloquear a síntese da parede celular. Entretanto, uma cepa de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina foi relatada como resistente à vancomicina, enquanto ainda é sensível à nisina (BRUMFITT et al., 2002).

3.1.3 Peptídeos Antifúngicos

Como os PAMs antibacterianos, os peptídeos antifúngicos podem matar os fungos, tendo como alvo a parede celular (DE LUCCA; WALSH, 1999) ou os componentes intracelulares (LEE et al., 1999). No entanto, a membrana bacteriana e a parede celular dos fungos têm diferentes conteúdos. Por exemplo, a quitina é um dos principais componentes da parede celular dos fungos e alguns dos peptídeos antifúngicos são capazes de se ligar à quitina (FUJIMURA et al., 2004). Essa capacidade de ligação ajuda os PAMs a atingir eficientemente as células fúngicas. Os PAM antifúngicos que atacam a parede celular matam as células-alvo ao romper a integridade das membranas fúngicas (TERRAS et al., 1992), aumentando a permeabilização da membrana plasmática (VAN DER WEERDEN et al., 2010) ou formando os poros diretamente (MOERMAN et al., 2002). Embora a maioria dos PAMs antifúngicos tenha aminoácidos polares e neutros em suas estruturas, (JENSSSEN et al., 2006) não parece haver uma correlação clara entre a estrutura de um PAM e o tipo de células que ele atinge. Por exemplo, os peptídeos antifúngicos têm membros de diferentes classes de estrutura tais como α -helicoidal (D-V13K e P18), estendida (indolicina) e folha β (defensinas) (LEE et al., 2003; BARBAULT et al., 2003).

3.1.4 Peptídeos Antiparasitários

Os peptídeos antiparasitários são um grupo menor em comparação com as outras três classes de PAM. O primeiro peptídeo antiparasitário relatado é a magainina, que é capaz de matar o *Paramecium caudatum* (ZASLOFF, 1987). Mais tarde, um peptídeo sintético foi desenvolvido contra o parasita *Leishmania* (ALBEROLA et al., 2004). Outro exemplo de peptídeo antiparasitário é a catelicidina, que é capaz de matar *Caenorhabditis elegans* pela

formação de poros na membrana celular (PARK et al., 2004). Embora alguns microrganismos parasitas sejam multicelulares, o modo de ação dos peptídeos antiparasitários é o mesmo de outros PAMs. Eles matam as células interagindo diretamente com a membrana celular (PARK, et. al., 2004).

3.1.5 Mecanismo de ação dos PAMs

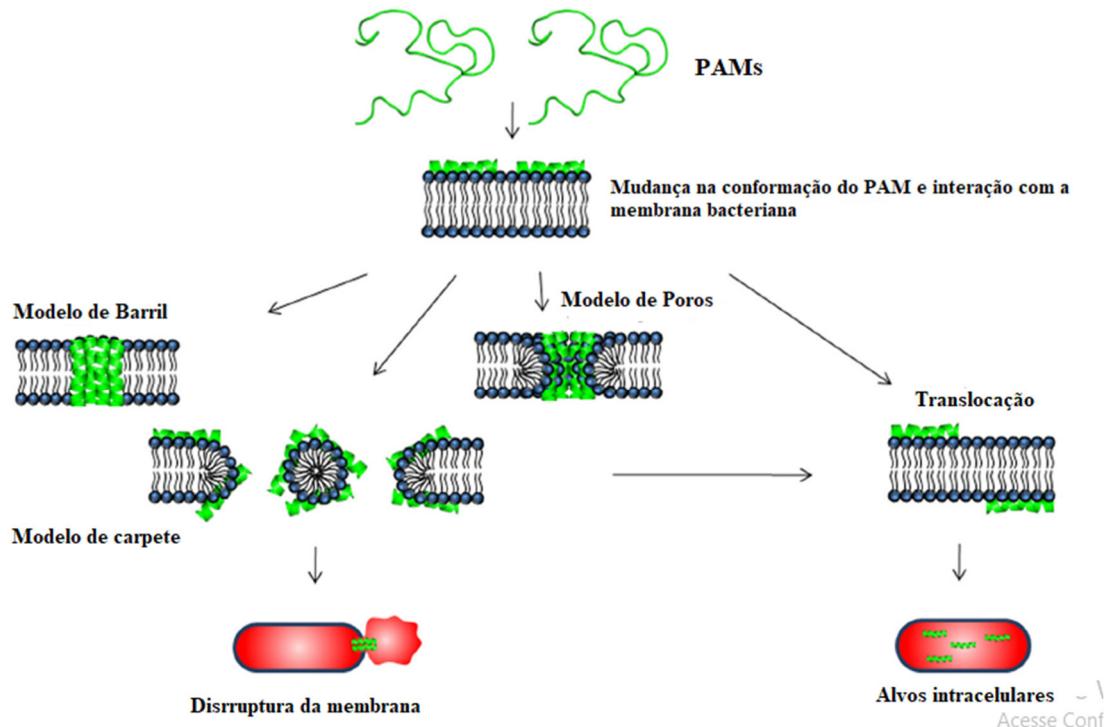
Os PAM matam as células ao romperem a integridade da membrana (via interação com a membrana celular carregada negativamente), inibindo a síntese de proteínas, DNA e RNA, ou interagindo com certos alvos intracelulares. Todos os PAMs conhecidos no final dos anos 90 são catiônicos. No entanto, o conceito de que os PAM precisam ser catiônicos foi alterado mais tarde com a descoberta de PAMs negativamente carregados em 1997 (BROGDEN et al., 1997). Por exemplo, a maximin-H5 da pele de rã e a dermicidina (STEFFEN et al., 2006) segregada a partir dos tecidos das glândulas sudoríparas do humano são ambos péptidos aniônicos. Geralmente, um PAM só é eficaz contra uma classe de micro-organismos (por exemplo, bactérias ou fungos) (HANCOCK; SCOTT, 2000). No entanto, existem exceções e alguns PAMs são conhecidos por terem diferentes modos de ação contra diferentes tipos de micro-organismos. Por exemplo, a indolicidina pode matar bactérias, fungos e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SELSTED et al., 1992). Exibe atividades antifúngicas, causando danos à membrana celular (LEE et al., 2003). No entanto, mata *Escherichia coli* penetrando nas células e inibindo a síntese de DNA (SUBBALAKSHMI; SITARAM, 1998), e mostra atividades anti-HIV inibindo a integrase do HIV (KRAJEWSKI et al., 2004). Em comparação, alguns PAMs têm o mesmo modo de matar tipos diferentes de células. Por exemplo, o PAM P-23 pode matar tanto os fungos quanto os parasitas, formando poros em suas membranas celulares (LEE et al., 2002).

Um terço das proteínas totais de uma célula bacteriana está associado à membrana e estas proteínas têm muitas funções que são críticas para a célula, incluindo o transporte ativo de nutrientes, respiração, força motriz de prótons, geração de ATP e comunicação intercelular (ZHANG; ROCK, 2009). A função dessas proteínas pode ser alterada pelo tratamento com PAM, mesmo que a lise celular completa não ocorra. Portanto, o efeito de morte rápida por PAMs não provém apenas da ruptura das membranas, mas também pode vir da inibição dessas proteínas funcionais (BAHAR; REN, 2013).

Os PAMs podem ser divididos em dois grupos principais com base no seu efeito final sobre as membranas alvo, 1) PAMs disruptivos de membrana, que causam permeabilização de membrana, e 2) PAMs não disruptivos de membrana, que atuam em alvos intracelulares (Toke, 2005) (Figura 1). Em ambos os grupos, a associação de PAMs com a membrana celular bacteriana ocorre por meio de interações eletrostáticas entre os PAM catiônicos e lipopolissacarídeos aniônicos (LPS, no caso de bactérias Gram-negativas) ou lipoteicóicos (no caso de bactérias Gram-positivas), seguidos por invasão do PAM dentro da célula. A ruptura das membranas microbianas pelos PAMs pode ocorrer através de diferentes mecanismos, incluindo o rompimento da bicamada lipídica (modelos de poros torácicos), e o adelgaçamento da membrana lipídica da bicamada seguida pela dissolução da membrana (modelo carpete) (EPAND; VOGEL, 1999; HANCOCK; CHAPPLE, 1999; JENSSSEN et al., 2006).

Com relação aos PAMs não disruptivos da membrana, eles podem atravessar a membrana sem ruptura e se ligar as estruturas celulares essenciais, como DNA e RNA; alternativamente, eles podem inibir outros alvos intracelulares (CUDIC; OTVOS, 2002; JENSSSEN et al., 2006). A inibição das vias intracelulares devido à captação celular de PAMs pode ocorrer através de mecanismos diferentes, incluindo penetração direta e endocistose. A membrana celular se dobra para dentro e forma vesículas que se assemelham a pequenas células envolvidas por uma membrana (CUDIC; OTVOS, 2002; NICOLAS, 2009; MADANI et al., 2011).

Figura 1. Esquema de ilustração de mecanismos de morte bacteriana por meio de PAMs.



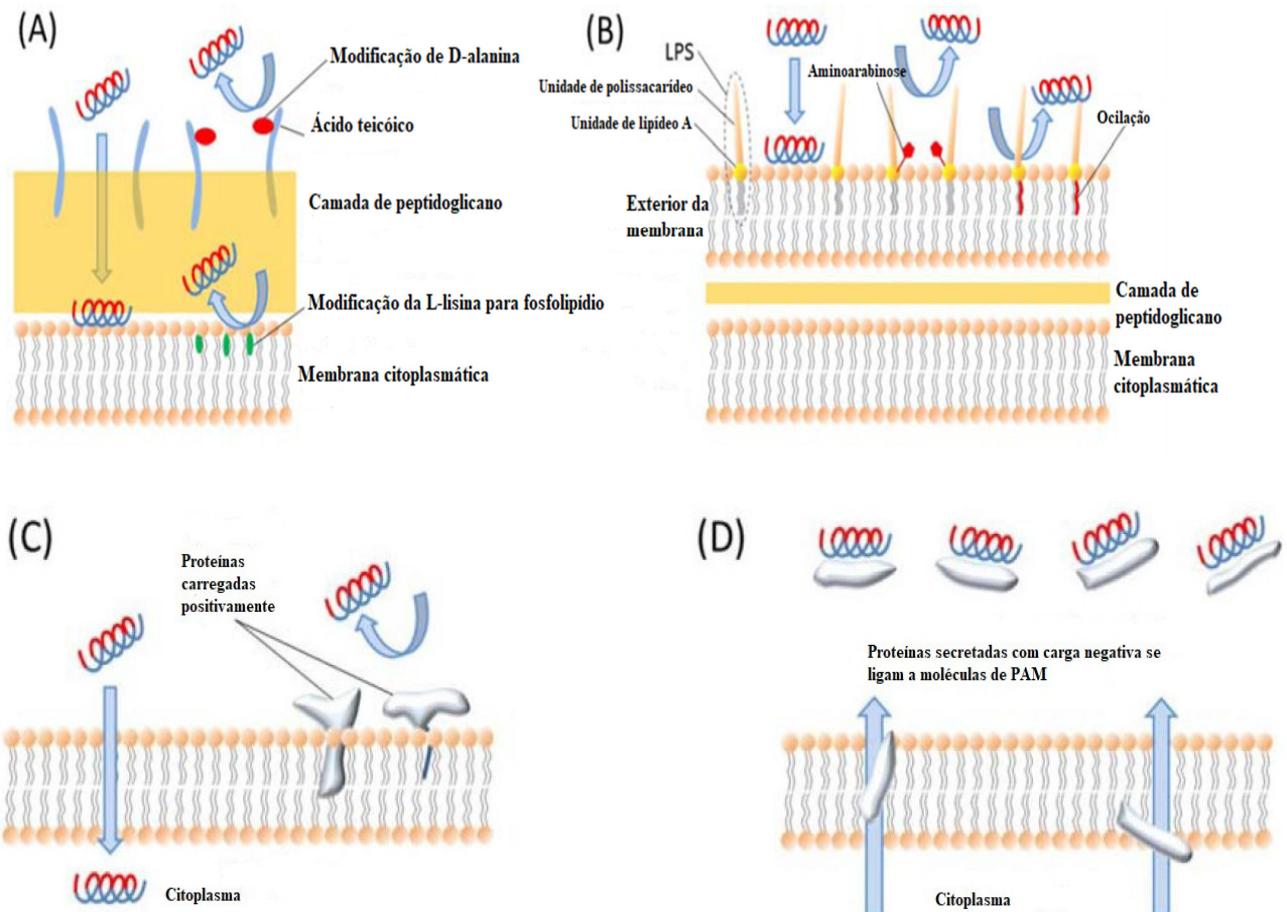
Fonte: MAHLAPUU1 et al., 2016.

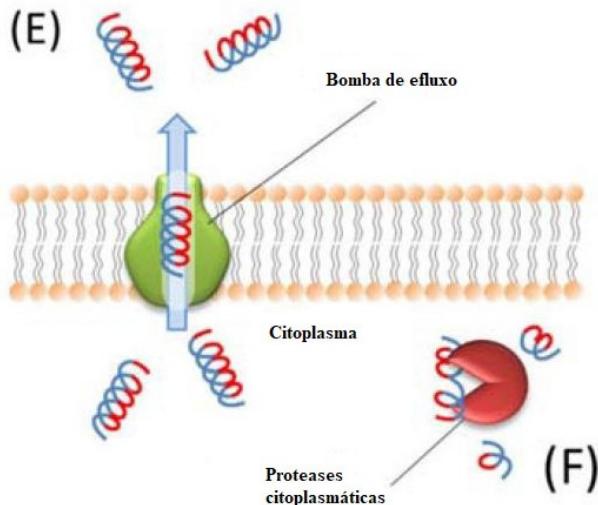
3.1.6 PAM e seu potencial para o desenvolvimento de resistência bacteriana

O amplo desenvolvimento de resistência bacteriana em relação aos PAMs tem sido considerado improvável, devido ao mecanismo de ação dos PAMs envolvendo o ataque a múltiplos alvos de baixa afinidade em vez de um alvo definido e de alta afinidade para antibióticos convencionais, o que torna mais difícil escolher micróbios para defender-se por um único mecanismo de resistência (PESCHEL; SAHL, 2006; LAI; GALLO, 2009; FJELL et al., 2012). Em particular, dado que a membrana celular bacteriana é o alvo primário dos PAMs, é desafiador para estes micro-organismos preservar a integridade funcional e estrutural da membrana celular, evitando ao mesmo tempo a atividade disruptiva das membranas dos PAMs (LAI; GALLO, 2009). No entanto, dados experimentais consideráveis surgiram recentemente descrevendo mecanismos pelos quais as bactérias podem desenvolver resistência a PAMs sob pressão de seleção *in vitro* (PRANTING et al., 2008; LOFTON et al., 2013), garantindo novas investigações sobre os riscos potenciais de resistência bacteriana aos PAMs.

Existem basicamente dois tipos diferentes de mecanismos de resistência contra os PAMs: resistência constitutiva e resistência indutível (YEAMAN; YOUNT, 2003). Os mecanismos de resistência indutíveis incluem substituição (LEWIS et al., 2009), modificação (GUNN, 2001) e ocilação (GUO et al., 1998) das moléculas de membrana, ativação de algumas enzimas proteolíticas (GUINA et al., 2000) e bombas de efluxo (SHAFER et al., 1998) e modificações de alvos intracelulares (DEL CASTILLO et al., 2001). Os mecanismos de resistência constitutivos incluem blindagem eletrostática (FRIEDRICH et al., 1999), mudanças no potencial de membrana durante diferentes estágios de crescimento celular (YEAMAN et al., 1998) e formação de biofilme (YEAMAN; YOUNT, 2003). Esses mecanismos de resistência estão ilustrados na Figura 2. Por exemplo, a atividade de alguns PAMs contra *S. aureus* pode ser inibida por moléculas de adesina na superfície celular desta bactéria. Estas moléculas de adesina são substâncias poliméricas e permanecem na superfície da célula após sua secreção. Como a adesina é um polímero carregado positivamente, ela pode formar uma barreira repulsiva contra PAMs carregados positivamente (VUONG et al., 2004).

Figura 2 - Representação esquemática dos mecanismos de resistência dos PAMs. (A) bactérias Gram-positivas resistem aos PAMs via modificação do ácido teicóico de moléculas LPS e modificação L-lisina de fosfolipídios. (B) As bactérias Gram-negativas resistem aos PAMs modificando as moléculas de LPS com aminoarabinose ou ocilação da unidade Lipídeo A das moléculas LPS. (C) As bactérias expressam algumas proteínas carregadas positivamente e as integram na membrana, de modo que as cargas positivas repelem umas às outras e as bactérias podem resistir a tais PAMs. (D) As bactérias produzem proteínas carregadas negativamente e segregam em ambiente extracelular para se ligar e bloquear os PAMs. (E) Os PAMs intracelulares são extrudidos por bombas de efluxo. (F) Os PAMs dentro da célula são degradados por proteases.





Fonte: BAHAR; REN, 2013.

A *Salmonella typhimurium* também possui um sistema de modificação do lipídio A ligado à membrana, que se defende contra os PAMs do hospedeiro (MILLER et al., 1999). Neste sistema, o PhoQ é um sensor quinase ligado à membrana e o PhoP é um regulador da resposta intracelular. O PhoQ é ativado na presença de cargas positivas de alto nível fora das células. Em seguida, ele fosforila o PhoP causando regulação positiva de alguns genes, incluindo aqueles relacionados à resistência ao PAM. Este sistema não está ativo quando o nível extracelular de íons Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Mn^{2+} é baixo, uma vez que os cátions divalentes interagem com o PhoQ e alteram sua conformação (BADER et al., 2005). Embora as bactérias possuam diversos mecanismos para resistência aos PAMs, é encorajador notar que a estrutura geral da bicamada lipídica das membranas bacterianas dificulta o desenvolvimento de uma resistência completa contra os PAMs. Além disso, a resistência contra os PAMs relatados até o momento não é tão forte quanto a dos antibióticos e cobre apenas um número limitado de PAMs (BAHAR; REN, 2013).

3.2 Defensinas

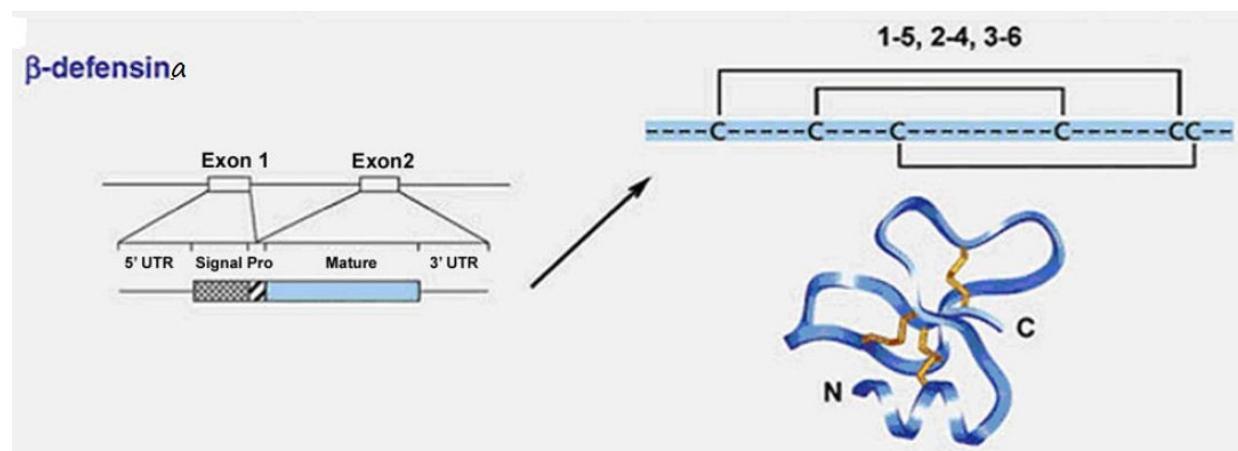
As defensinas representam uma classe de peptídeos antimicrobianos catiônicos que desempenham papéis fundamentais na imunidade inata e adaptativa, bem como nos papéis em processos não imunológicos. Eles constituem uma antiga e diversa família de genes, presente na maioria dos organismos multicelulares, desde plantas, fungos, insetos, moluscos e aracnídeos até mamíferos, incluindo humanos. Durante sua história evolutiva, as defensinas se

tornaram altamente diversificadas e adquiriram novas funções em diferentes espécies. As defensinas evoluíram para serem altamente eficientes em suas respostas antimicrobianas a um grande número de patógenos (MACHADO; OTTOLINI, 2015).

As defensinas são categorizadas em três subfamílias, α , β e θ , com base em sua matriz de ligação dissulfeto e seqüência primária de aminoácidos (GANZ, 2003). Evolutivamente falando, as β -defensinas são as mais antigas das defensinas, traçando sua ancestralidade até os caranguejos-ferraduros. O repertório genômico do hospedeiro de defensinas varia grandemente entre as espécies, tanto no número de defensinas codificadas quanto na diversidade de sequências (PATIL et al., 2005). As α -defensinas foram encontradas em primatas, glírios e cavalos, mas não em cães, enquanto que as β -defensinas foram documentados em todos os mamíferos e também em algumas espécies de ordem inferior (GANZ, 2003; PATIL et al., 2005). As θ -defensinas são únicas, pois são codificadas nos genomas de humanos e primatas não humanos, embora um produto gênico funcional tenha sido encontrado apenas em primatas não humanos (TANG et al., 1999).

As defensinas clássicas de mamíferos são estruturalmente pequenos peptídeos catiônicos e ricos em cisteína, com massa molecular entre 3 e 5 kDa (VERMA et al., 2007). Eles são caracterizados por uma estrutura de folha β ligada por três ligações dissulfeto, que são formadas por seis resíduos de cisteína (Figura 3) (YANG et al. 2002).

Figura 3 – Estrutura do gene e peptídeo de uma β -defensina humana.



Fonte: Hazlett; Wu, 2011. Modificado por Selsted e Ouellette (2005).

Diferentes β -defensinas estão presentes em diferentes tecidos epiteliais e mucosas e podem ser constitutivamente expressas ou induzidas em resposta a vários estímulos (MATHEWS et al., 1999; KAO et al., 2003). Sua distribuição anatômica reflete claramente sua capacidade de neutralizar diferentes patógenos e eles são mais abundantes em locais

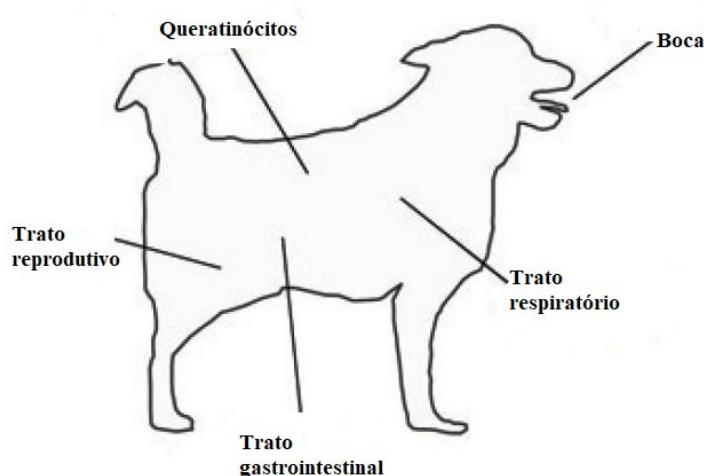
propensos às infecções microbianas para as quais são específicos. Por exemplo, a β -defensina humana 2 (HBD2) é fortemente expressa no pulmão (BALS et al., 1998), a HBD4 é altamente expressa no estômago e testículos (GARCÍA et al., 2001) e HBD3 na pele e no tecido tonsilar (HARDER et al., 2001).

As β -defensinas expressas na pele humana incluem a β -defensina humana 1 (HBD1), HBD2 e HBD3 (ALI et al., 2001; HARDER et. al., 2001). A pele canina expressa altamente β -defensinas CBD1 e CBD103 (WINGATE et al., 2008), os homólogos de HBD1 e HBD3, respectivamente (PATIL et al., 2005). Não existe um homólogo claro de HBD2. De fato, devido às diferenças na estrutura gênica e na expressão tecidual, o CBD102 não é semelhante ao HBD2 (PATIL et al., 2005). Inicialmente, a HBD1 foi identificada no hemofiltrado de pacientes em diálise e subsequentemente localizada em células epiteliais de muitos tecidos, incluindo pâncreas, rim e pele (BENSCH et al, 1995; VALORE et al., 1998). A expressão de HBD-1 é constitutiva. A região promotora da HBD1 não possui sítios de ligação do fator de transcrição frequentemente envolvidos em inflamação, como fator nuclear-jB ou AP-1 (proteína ativadora-1), e o transcrito de HBD1 não é regulado durante a inflamação (O'NEIL et al., 1999). A expressão basal de HBD2 é baixa em queratinócitos humanos, mas pode ser regulada positivamente com inflamação ou estimulação patogênica. A análise da região promotora de HBD2 revelou dois sítios funcionais de ligação de fator nuclear-jB que são responsáveis, em parte, pela sua regulação (KAO et al., 2008). Outra β -defensina que exibe expressão indutível na pele humana é a HBD3, homóloga do CBD103 em cães. A expressão da HBD3 pode ser induzida pelo fator de necrose tumoral- α ou pelo contato com bactérias e nas respostas de cicatrização de feridas (WOLK et al., 2004).

Vários estudos começaram a explorar a expressão e a função da β -defensina em cães. A expressão foi identificada nos testículos (SANG et al., 2005), no rim, tonsila palatina, traquéia, pulmão, trato gastrointestinal, fígado, baço, células mononucleares do sangue periférico, medula óssea e pele (Figura 4) (CANDILLE et al., 2007; WINGATE et al., 2008; VAN DAMME et al., 2009; SANTORO et al., 2010; ERLES; BROWNLIE, 2010). Para avaliar possíveis induções da expressão de β -defensina, células epiteliais da traquéia de cães foram tratadas com lipopolissacarídeo e coronavírus respiratório canino, no entanto, nenhum estímulo foi suficiente para regular positivamente a expressão de CBD103 (ERLES; BROWNLIE, 2010). Na dermatite atópica canina, o CBD1 demonstrou ter expressão aumentada na pele lesionada e não lesionada quando comparado com animais controle saudáveis. Em contraste, a pele lesionada e não lesionada exibiu expressão reduzida de CBD103. Essa redução da expressão de CBD103 pode predispor os cães com dermatite

atópica a desenvolver infecções secundárias por *S. pseudintermedius* (VAN DAMME et al., 2009).

Figura 4. Expressão diferencial de defensinas. As defensinas são expressas em células epiteliais em muitos órgãos diferentes, incluindo boca, pele, trato reprodutivo, trato gastrointestinal e pulmões



Fonte: LEONARD et al., 2012a.

As β -defensinas contêm 38 a 50 aminoácidos (JARCZAK et al., 2013) e são sintetizadas em diferentes tipos de células, incluindo linfócitos, monócitos, neutrófilos, células epiteliais e queratinócitos, em forma de pré e pro-peptídeos e armazenadas em grânulos na região citoplasmática, permitindo rápida liberação quando necessário (ZOU et al., 2007). As β -defensinas identificadas na pele de mamíferos incluem as β -defensina humana (HBD) 1, 2 e 3, defensina-3 em galinhas, PAM lingual de bovino, β -defensina 2, 3, 4 e 129 em suínos, β -defensina 2 em equinos e β -defensina canina (CBD) 1, 2, 3, 102, 103, 122 e 127 (ZHAO et al., 2001; SANG et al., 2006; WINGATE et al., 2008; VAN DAMME et al., 2009). Das CBD, apenas a CBD1 e CBD103 têm expressão cutânea prontamente detectável, com a CBD103 com a expressão mais alta (LEONARD et al., 2012b).

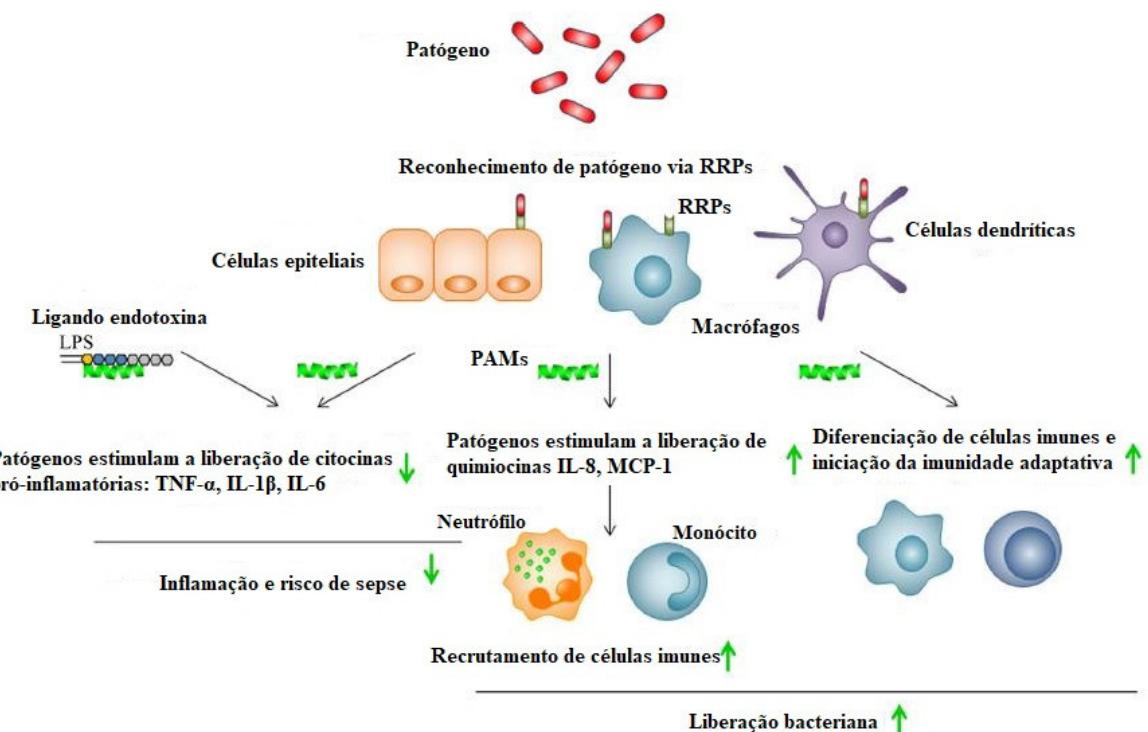
A função mais estudada para as β -defensinas é a sua atividade antimicrobiana direta, através da permeabilização da membrana do patógeno. Seu exato mecanismo de ação não é completamente compreendido e dois modelos diferentes foram propostos. O primeiro é um modelo de tapete, onde vários peptídeos antimicrobianos opsonizam a superfície do patógeno, provocando necrose, possivelmente interrompendo a carga eletrostática através da membrana (VYJKOVA et al., 2007). O outro é um modelo de poros, com vários peptídeos

oligomerizando e formando defeitos de membrana semelhante a poros que permitem o efluxo de íons essenciais e nutrientes (HARDER et al., 2001).

A HBD1 exibe menor atividade antimicrobiana em comparação com outras defensinas (ZAALOUK et al., 2004; YADAVA et al., 2006). Embora HBD1 e HBD2 demonstrem forte atividade contra bactérias Gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, nenhuma delas é particularmente ativa contra bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus* (HARDER et al., 1997). A HBD3, no entanto, tem atividade de amplo espectro contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, particularmente *S. aureus* e fungos (GARCÍA et al., 2001; KISICH et al., 2007).

Além da defesa antimicrobiana, as β -defensinas também exibem diversos papéis imunomoduladores (Figura 5). A HBD2 promove a secreção de histamina a partir de mastócitos, sugerindo um papel desta defensina na via alérgica (BEFUS et al., 1999). A HBD2 é quimiotática para células dendríticas imaturas e células T de memória. As HBD2, HBD3 e HBD4 estimulam queratinócitos a aumentar a expressão gênica de muitas citocinas, quimiocinas e proteínas pró-inflamatórias, incluindo a interleucina-6, interleucina-10, proteína-1 quimioatrativa de monócitos e macrófagos. As HBD também induzem a mobilização de Ca^{2+} intracelular e participam do reparo de feridas aumentando a migração e proliferação de queratinócitos (NIYONSABA et al., 2007).

Figura 5- Desenho esquemático de atividades imunomoduladoras dos PAMs. Reconhecimento de patógenos por receptores de reconhecimento de patógenos (RRPs), como TRLs, células epiteliais, macrófagos e células dendríticas, levando ao combate aos fagócitos, bem como à liberação de citocinas inflamatórias pró-ativas e quimiocinas por essas células, subsequentemente, o recrutamento de um agente patogénico leva à maturação das células dendríticas. Subseqüente iniciação da imunidade adaptativa. Os anticorpos são diretamente direcionados à eliminação da patogênese por estimulação da quimiotaxia e da diferenciação imunológica, assim como prevenir a inflamação e as lesões alérgicas por inibição da citocina inflamatória pró-inflamatória e evitar a captura de endotoxinas bacterianas, como LPS. A regulação negativa das respostas pelos PAMs é indicada por setas verdes.



Fonte: MAHLAPUU et al., 2016.

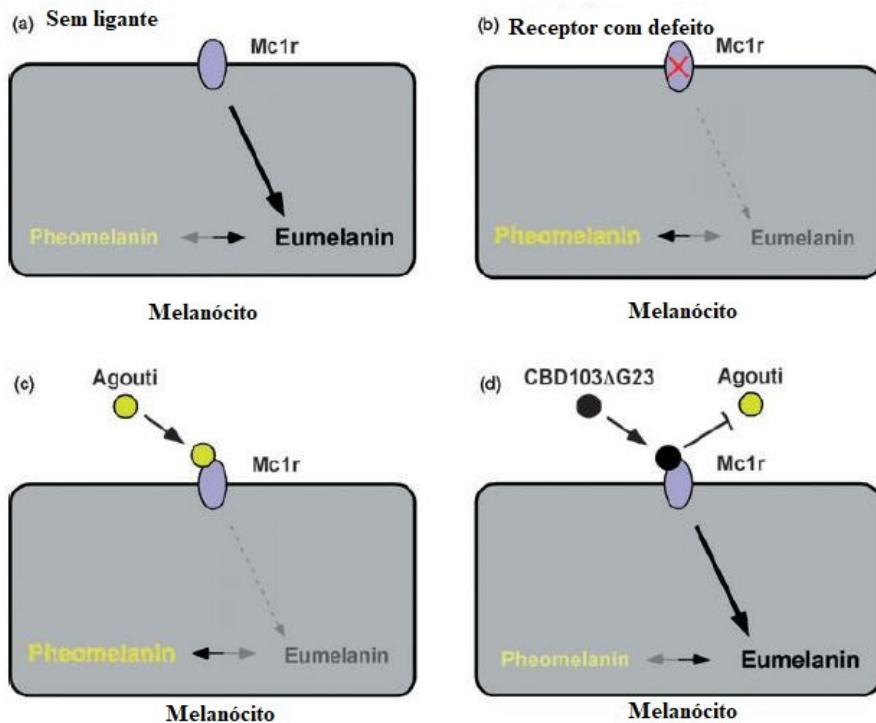
Os membros da família defensina possuem uma infinidade de atividades não imunes e é importante conhecer alguns exemplos da natureza divergente da função das defensinas (MACHADO; OTTOLINI, 2015). Alguns membros da família das β -defensinas têm um papel importante na reprodução de mamíferos. Por exemplo, há cinco genes de defensina humana (HBD125 – HBD129) agrupados no cromossomo 20, que são altamente expressos na camada de células epiteliais do ducto epididimal, que secretam fatores responsáveis pela espermaturação (RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ et al., 2003). Além disso, o HBD118 humano mostrou ser um potente peptídeo antimicrobiano capaz de se ligar ao esperma, provavelmente fornecendo proteção contra micro-organismos presentes nos ductos espermáticos (YENUGU

et al., 2004). É perceptível como em macacos de cauda longa (*Macaca fascicularis*) e em macacos rhesus (*Macaca mulatta*), existe uma β -defensina similar, denominada β -defensina 126, que é a principal proteína que reveste os espermatozoides (TOLLNER et al., 2008), este revestimento é perdido no oviduto permitindo que a fertilização ocorra. Em apoio a isso, a deleção de um grupo de nove genes de β -defensina em um modelo de camundongo resultou em esterilidade masculina (ZHOU et al., 2013). Em estudos em humanos, uma mutação comum no HBD126 demonstrou prejudicar a função espermática e a fertilidade (TOLLNER et al., 2011).

Estudos recentes sugeriram que alguns produtos genéticos da β -defensina, incluindo HBD1 e HBD3, podem interagir com uma família de receptores de melanocortina, modulando a expressão de pigmentos em cães e possivelmente em humanos (CANDILLE et al., 2007). Tipicamente, existem dois genes que controlam a troca de tipos de pigmentos: o receptor de melanocortina 1 (Mc1r) e Agouti, que codifica um ligante para o Mc1r, que inibe a sinalização de Mc1r. Ativação Mc1r determina produção de pigmento escuro eumelanina exclusivamente, enquanto a inibição de Mc1r causa a produção do pigmento mais leve, a feomelanina. Alguns estudos conduzidos em melanócitos humanos descobriram um novo papel da HBD3 como um antagonista do hormônio estimulador de melanócito (a-MSH, um agonista conhecido do Mc1r, que estimula a sinalização de PAM para induzir a produção de eumelanina). Como a HBD3 é produzida pelos queratinócitos, ela pode atuar como um fator parácrino nos melanócitos modulando os efeitos do a-MSH na pigmentação humana (SWOPE et. al., 2012). Além disso, sabe-se que os receptores da melanocortina também estão envolvidos na modulação da resposta inflamatória e imunológica (MAASER et al., 2006).

De acordo com Erles e Brownlie (2010), o gene CBD103 é expresso na pele de cães e nas vias respiratórias, sendo a expressão tecidual padrão semelhante ao da HBD3. A CBD103 apresenta dois tipos de polimorfismos genéticos: um alelo variante com uma deleção de 3 pares de bases na sua sequência de codificação e uma variação no número de cópias do gene, onde a deleção na CBD103, denominado CBD103 Δ G23, foi identificada como uma variante alélica responsável pela cor preta da pelagem dominante em cães (CANDILLE et al., 2007), pois este pode ligar-se com mais afinidade do que CBD103 para o receptor de melanocortina (Figura 6). Os cães da raça Golden retriever e Labrador retriever codificam o alelo variante CBD103DG23 e o polimorfismo do número de cópias do gene CBD103 (LEONARD et al., 2012a).

Figura 6 - Determinação da cor do pelo no cão. (a) Sinalização constitutiva do receptor Mc1r, localizado na superfície dos melanócitos, na ausência de um ligante, resultando na produção de eumelanina (pigmento preto). (b) A sinalização defeituosa do Mc1r resulta na síntese da feomelanina (pigmento amarelo ou vermelho). (c) O peptídeo Agouti antagoniza a sinalização de Mc1r, resultando na síntese de feomelanina. (d) A forma variante do CBD103, CBD103DG23, serve como um antagonista neutro do Mc1r e permite que o melanócito sintetize a eumelanina.



Fonte: LEONARD et al., 2012a. Figura adaptada de CANDILLE et al., 2007; com colaboração BARSH, 2006.

A atividade das β -defensinas contra infecções também tem sido estudada na pele canina. A CBD103 recombinante e a CBD103DG23 exibiram uma capacidade de gerar morte antimicrobiana potente e semelhante tanto de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente a meticilina como sensível a meticilina. Ambos os conjuntos de CBDs apresentaram potente atividade antimicrobiana contra bactérias endógenas encontradas na pele canina (*Bacillus licheniformis*, *Micrococcus spp.* e *Bacillus cereus*), além de uma cepa laboratorial de *Escherichia coli* D31 (LEONARD et al., 2012b).

3.3 Dermatites

Os problemas dermatológicos em cães são bastante comuns, podendo ser causados por diferentes agentes, entre eles: bactérias, fungos, parasitas, contato com produtos químicos, e ainda problemas hormonais e questões psicológicas, que podem desenvolver dermatites em função de um estado depressivo ou de estresse. As dermatites geralmente causam coceira constante e inchaços na pele, ainda podendo ocorrer o surgimento de manchas, bolhas e crostas, e a pele tornar-se áspera e descamativa. O prurido é o principal sintoma e maior indicativo de que alguma dermatite está se manifestando no animal, associada com o aparecimento de lesões e de áreas alopecicas (PATEL; FORSYTHE, 2010).

3.3.1 Piodermites

A piodermitite canina geralmente ocorre em decorrência do supercrescimento das bactérias consideradas residentes da microbiota normal da pele ou da microbiota transitória. De acordo Huerta (2011) os microrganismos que são comumente encontrados na piodermitite canina são os *Staphylococcus* coagulase positiva, sendo que a espécie mais isolada é o *Staphylococcus pseudintermedius* e outros como *S. aureus* e *S. scheiferi* spp. *coagulans* também são encontrados, porém em menor número. O *Staphylococcus pseudintermedius* é responsável pela produção de enterotoxinas, toxinas, toxinas esfoliativas, leucotoxinas, proteína A e hemolisinas, sendo assim tais toxinas estão relacionadas com a virulência do agente, adesão do patógeno ao queratinócito e resposta imune de hipersensibilidade (MILLER et al., 2013).

As piodermites segundo Ihrke (2006) podem ser classificadas em: externa, superficial e profunda, ou seja, de acordo com a profundidade da lesão. Desta forma, nas piodermites externas as bactérias colonizam a superfície epidérmica, enquanto que nas piodermites superficiais tem-se o comprometimento da epiderme e epitélio folicular e na piodermitite profunda observa-se envolvimento da derme e em alguns casos do tecido subcutâneo (CONCEIÇÃO; FABRIS, 2000; LARSSON jr, 2008).

Nas piodermites superficiais, a foliculite é a mais comum das dermatoses, além de ser a de maior incidência entre os cães. As pústulas de impetigo e foliculite são muitas vezes apresentadas como desafios no diagnóstico, pois elas rompem facilmente. Na piodermitite superficial ocorre uma invasão bacteriana da epiderme que pode se manifestar de duas formas. Na primeira, as bactérias podem penetrar no estrato córneo com a subsequente

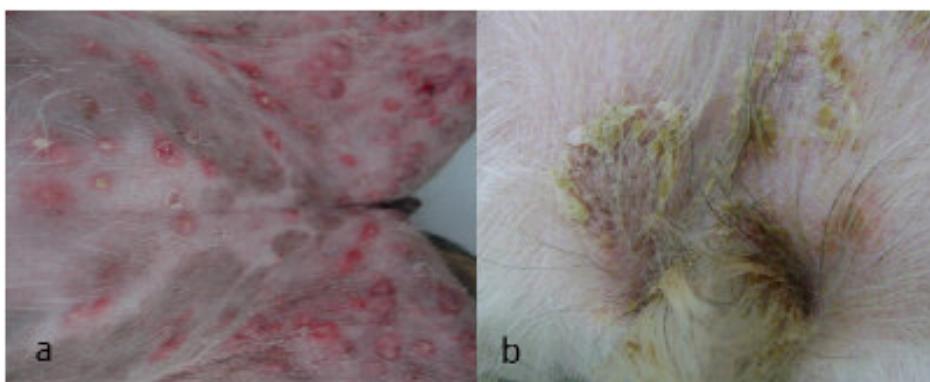
formação de pústulas subcorneanas. Na segunda, as bactérias podem invadir a abertura do folículo piloso, causando inflamação sendo chamada foliculite (SCOTT et al., 2001).

As piodermites profundas são infecções bacterianas grave que envolvem os tecidos mais profundos do que o folículo piloso. Estas piodermites não ocorrem espontaneamente em cães normais, pois, sempre há uma causa da infecção, e quando a infecção permanece localizada em uma pequena área, o traumatismo externo é a causa mais frequente. Por outro lado, quando as lesões estão amplamente disseminadas pelo corpo ou generalizadas, o animal possui uma doença de base que deve ser pesquisada. Desta forma, os fatores que predispõem a uma piodermite profunda incluem a imunoincompetência do hospedeiro, lesão dérmica ou folicular grave causada por uma doença primária (demodicose grave) ou por um trauma (pressão, lambadura ou mordedura intensas e raspados) na região infectada (SCOTT et al., 2001).

A piodermite canina acomete cães que apresentam qualquer faixa etária, qualquer sexo e raça, porém algumas raças são mais predispostas como Bull Terrier e Pastor Alemão. Em relação às raças de pelo curto como Doberman, Pinsher, Dogue Alemão, Boxer e Teckel estão mais predispostos a foliculite superficial (PATEL; FORSYTHE, 2010). As lesões cutâneas primárias observadas são as pápulas eritematosas estas podem ser vistas nas piodermites superficiais e profundas. O acúmulo de pus nos locais intraepidérmicos ou foliculares é notado à medida que a infecção avança dando origem às pústulas e colaretes epidérmicos (Figura 7) (LARSSON jr, 2008). Os colaretes epidérmicos que ocorrem em decorrência das piodermites, são resultados da separação do estrato córneo nas margens da lesão pustular. Já as áreas de alopecias são lesões secundárias observadas, isto é decorrente da perda dos pelos dos folículos infectados, denominado por Vieira (2012) como “ruído de traça”. A formação de nódulos podem ocorrer nos casos de piodermites profundas, que podem vir a romper em decorrência do autotraumatismo e dar origem a pápulas crostosas, a presença de lesões hemorrágicas pode também acontecer proveniente da ruptura folicular (IHRKE, 2006).

O diagnóstico para piodermite canina deve ser baseado no histórico clínico, exame físico e exames complementares (CARLOTTI, 1996), uma vez que algumas doenças apresentam sintomatologias semelhantes ou podem predispor a piodermite. Desta forma, a solicitação de exames complementares laboratoriais é de fundamental importância para a confirmação do diagnóstico e possível tratamento (CODNER; RHODES, 2003; CONCEIÇÃO et al., 2004).

Figura 7. Lesões (a: pústulas e b: colaretes epidérmicos) em cães com piodermitite superficial.



Fonte: SOUZA, 2009.

3.3.2 Dermatites por ácaros

A demodicose canina é uma dermatose parasitária não contagiosa comum causada pelo ácaro folicular *Demodex canis* que é excessivamente proliferante na pele do hospedeiro (RAVERA et al. 2013; SINGH; DIMRI, 2014). Na demodicose canina, a inflamação cutânea está associada à proliferação excessiva de ácaros e a recuperação clínica dos cães doentes geralmente acarreta o tratamento parasitário e a redução da população de ácaros (FORTON, 2012; MILLER et al., 2013). O *Demodex canis* é um artrópodo aracnídeo da Família *Demodicidae*, membro da microbiota cutânea normal no cão, que causa dermatopatias em algumas situações especiais, quando ocorre superpopulação (NUTTING; DESCH, 1978; HENPF et al., 1988). Segundo Yager e Scott (1992), não se trata de uma zoonose, e relatos brasileiros dão conta que o *D. canis* é o agente causal de 40,0 a 48,0% dos casos de sarna canina atendidos em hospitais universitários (BELLATO et al., 2003; SANTARÉM, 2007).

A transmissão ocorre por contato direto da cadela com seus filhotes durante o período de amamentação, o que é confirmado pelo fato de filhotes abortados ou nascidos por meio de cesariana não albergarem esses ácaros (SAKO, 1964; SCOTT et al., 1974). A mãe geralmente não apresenta sinais clínicos. Em parte da população canina, o *Demodex* tem uma ocorrência "normal" em animais aparentemente saudáveis. Mais tarde, somente alguns cães apresentarão sinais da doença, em função de superpopulação parasitária, acreditando-se que isso seja devido a uma predisposição genética individual, que causa inibição generalizada dos linfócitos T de forma que a pele dos cães portadores de demodicose é ecologicamente favorável à reprodução e crescimento dos parasitos (SCOTT et al., 1974; TIZARD, 2000).

São reconhecidos dois tipos de demodicose: a demodicose localizada (DL) e a demodicose generalizada (DG), sendo curso e prognóstico bastante diversos (MULLER et. al., 1985). Quanto à idade dos pacientes, a demodicose pode ser separada em forma juvenil e forma adulta, de acordo com o surgimento dos primeiros sinais clínicos (Ghubash, 2006). A forma juvenil ocorre entre três e seis meses (PARADIS, 1998). Dos seis aos 12 meses ocorre resolução espontânea das lesões, sendo que a partir dos dois anos, as lesões podem recrudescer, iniciando-se a forma adulta da doença (WOLBERG, 1998).

As lesões típicas da DL são manchas eritematosas e alopecicas na cabeça (figura 8) e/ou membros torácicos. Pode haver prurido e descamação fina, e ocorre recuperação espontânea na maioria dos pacientes (KWOCHKA, 1993). Não existe uma definição universalmente aceita para a diferenciação entre DL e DG (SCOTT et. al., 2001), sendo que Mueller (2004) considera indicativos de DG o envolvimento de toda uma região do corpo, a existência de mais de cinco áreas focais e/ou o envolvimento das patas. A DG é uma das doenças caninas mais severas, iniciando como progressão da DL, entre três e dezoito meses de idade e se evidenciando como DG adulta, após os dois anos de idade (PARADIS, 1998; SCOTT et. al., 2001). A técnica de escolha para o diagnóstico da demodicose é o exame parasitológico de material colhido por raspagem cutânea profunda, que apresenta fácil execução, baixo custo e alta sensibilidade (BOND, 1996).

Figura 8 - Lesões na face e membros em cão afetado por demodicose.



Fonte: pets e dicas, 2012. (Disponível em: <http://www.petsdicas.com>).

A sarna sarcóptica é uma dermatose papulocrostosa e intensamente pruriginosa dos cães, causada pelo acaro epidérmico *Sarcoptes scabiei*, que pode afetar cães, gatos, raposas e o homem por períodos variáveis de tempo. Os ácaros preferem a pele com pouco pelo, de forma que são mais comuns nas orelhas, cotovelos, abdome e jarretes. À medida que a doença se dissemina e o pelo cai, podem eventualmente colonizar áreas maiores do corpo do hospedeiro. (SCOTT et al., 1996). A doença dissemina-se rapidamente e pode envolver todo o corpo, mas o dorso geralmente é poupadão. A alopecia está presente e as lesões cutâneas precoces são características (figura 9). Estas são pruriginosas, erupções avermelhadas papulocrostosas. Frequentemente, apresentam crostas amareladas espessas e a coceira intensa e constante logo produz escoriação extensa (SCOTT et al., 1996).

Figura 9- Sarna sarcóptica. Alopecia e eritema focalmente extensos e acentuados



Fonte: SOUZA, 2009.

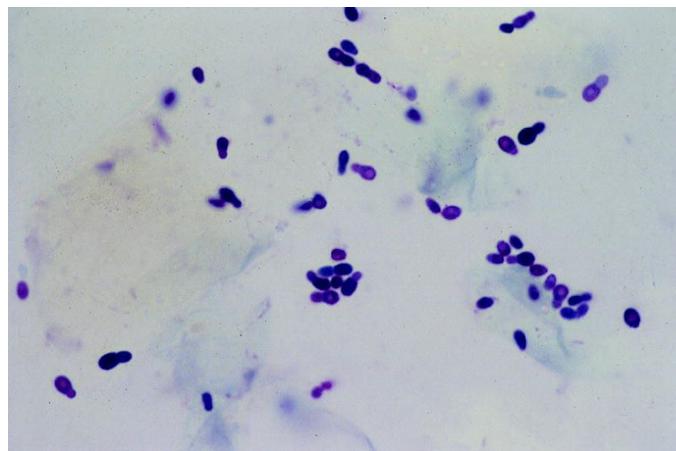
3.3.3 Dermatites fúngicas

Dermatofitose é uma micose superficial, causada por fungos denominados dermatófitos, microrganismos que possuem um biotropismo especial por tecidos de estruturas queratinizadas, como pelos, unhas e pele, raramente parasitando células vivas. Dermatófitos existem normalmente no solo, e sob determinadas condições, podem parasitar os animais e o homem. Há três gêneros, causadores das dermatofitoses, *Microsporum* (*M. audouinii*, *M. canis*, *M. gypseum*), *Trichophyton* (*T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *T. shoenleinii*) e *Epidermophyton* (*E. floccosum*), sendo uma zoonose de fácil disseminação e gerando um problema à saúde pública (MEDEIROS et. al., 2009).

A maioria dos casos clínicos de dermatofitose em gatos e cães é causada por três fungos: *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Em geral, o *M. canis* é a causa mais comum de dermatofitose em gatos e cães. Os dermatófitos são transmitidos por contato com pelo e caspa infectados ou com elementos fúngicos nos animais, no ambiente ou ainda nos fômites (SOUZA et al., 2002). Os cães infectados frequentemente apresentam áreas circulares clássicas de alopecia indo para a periferia, crosta, caspa, pápulas ou pústulas foliculares, em felinos ocorre com maior frequência nas áreas irregulares ou anulares de alopecia com ou sem caspa, os pelos aparecem quebrados e desgastados, a hiperqueratoose folicular pode resultar em comedões, a alopecia pode ser grave e disseminada, acompanhada de pouca evidência de inflamação (SOUZA et al., 2002).

Malassezia pachydermatis é uma levedura comensal que normalmente está presente em baixo número nos canais da orelha externa e locais mucocutâneos superficiais em cães. Essa levedura é caracterizada por sua forma arredondada a oval ou amendoim clássica com brotamento monopolar (figura 10) (MILLER et al., 2013).

Figura 10 - *Malassezia pachydermatis*



Fonte: vetpractica, 2016. (Disponível em: <https://practica.vet/2017/05/27/malassezia>)

A dermatite causada por *M. pachydermatis* em cães geralmente é um problema secundário devido a uma doença de pele subjacente, como doença alérgica (incluindo dermatite atópica canina e dermatite alérgica a pulga), pioderma bacteriano recorrente e doenças endócrinas (especialmente hipotireoidismo) (MAULDIN et. al., 1997). Muitos fatores predisponentes podem resultar que a *M. pachydermatis* comensal se torne um patógeno. Esses fatores incluem aumento da umidade, presença de dobras cutâneas, alteração

dos níveis de pH cutâneo, antibioticoterapia prévia e terapia prolongada com corticosteroides (MAULDIN et. al., 1997; HNILCA, 2011). Além de ser uma doença secundária, um número significativo de cães afetados pela dermatite por *Malassezia* é afetado por piodermite estafilocócica concomitante. Acredita-se que *M. pachydermatis* tenha uma relação simbiótica com os estafilococos comensais, que produzem fatores de crescimento mutuamente benéficos e alterações microambientais (MAULDIN et al., 1997).

A dermatite por *Malassezia* (Figura 11) é comum em cães e os locais acometidos incluem margens labiais, canais auditivos, axilas, virilha, pescoço ventral, pele interdigital, pregas faciais ou dobras da cauda, pele perivulvar e pele perianal (PATTERSON; FRANK, 2002). As lesões podem ser localizadas ou generalizadas. O prurido, um dos principais sinais, costuma ser grave e é acompanhado de odor desagradável. As lesões de pele podem se apresentar de várias formas, que podem ser afetadas pela cronicidade da doença, doença subjacente primária, terapia prévia e infecção bacteriana concomitante. Algumas apresentações comuns da dermatite por *Malassezia* incluem: Alopecia regional ou generalizada com eritema (eritrodermia esfoliativa), seborreia escamosa, crostas ou lesões papulocrustosas que se assemelham a infecção estafilocócica, liquenificação e / ou hiperpigmentação (pele semelhante a couro de elefante), hipotricose na margem dos lábios com formação de crostas e intertrigo (BAJWA, 2017).

Várias raças são predispostas como West Highland White Terrier, Basset hound, Cocker spaniel americano, Shih-tzu, Poodle, Boxer, Cavalier King Charles spaniel, Pastor alemão e Dachshund mostrando um aumento do risco de dermatite por *Malassezia* (BAJWA, 2017).

Figura 11. Dermatite por *Malassezia*



Fonte: BAJWA, 2017.

3.3.4 Dermatite alérgica à picada de pulga

A dermatite alérgica à picada de pulga (DAPP) é uma doença de pele comum em cães e gatos sensibilizados às proteínas da saliva da pulga por meio de picadas repetidas ou intermitentes (HNILICA, 2012). Sendo uma dermatose pruriginosa que resulta da hipersensibilidade imediata ou mediada por células a várias proteínas presentes na saliva das pulgas (HARVEY et al., 2004). Um dos antígenos revelados que causa a doença é denominado Cte f1, onde cerca de 80% dos cães alérgicos à pulga apresentam uma resposta IgE ao Cte f1. Este não é o único alérgeno, alguns cães alérgicos à pulga não reagem ao Cte f1 e nem todos manifestam a doença mediada por IgE (BIRCHARD et al., 2008).

Os sinais clínicos geralmente são sazonais, meses quentes e no outono, durante o verão é a doença mais comumente constatada pelo clínico, sendo uma razão comum de exacerbação de prurido em pacientes com DAPP. Em algumas áreas e quando a infestação ocorre em ambientes fechados, a DAPP pode não ser sazonal (BIRCHARD et al., 2008). Atinge animais de qualquer raça sendo mais comum em raças atópicas, afetando animais com idade em média 3-6 anos, mas pode ser observada em qualquer idade (KUHL et al., 2003). Normalmente, a distribuição envolve as áreas lombossacral (Figura 12) e caudodorsal, a ponta dorsal da cauda, as áreas caudomediais das coxas, o abdome e os flancos. As lesões incluem erupções pruriginosas, papulares e crostosas, com eritema secundário, seborreia, alopecia, escoriações, piôdermite, hiperpigmentação e liquenificação (HNILICA, 2012).

A DAPP é possivelmente diagnosticada em animais com prurido, envolvimento de pulga, sendo que o diagnóstico mais preciso de DAPP requer a constatação de lesão típica, um padrão típico, um teste intradérmico ou *in vitro* positivo ao Cte f1 (antígeno de pulga) e uma resposta completa ao controle efetivo de pulgas (BIRCHARD et al., 2008).

Figura 12 – Cão com DAPP apresentando lesão alopecica triangular na região dorsal lombossacral.



Fonte: OLIVEIRA et al., 2010.

3.3.5 Dermatite atópica canina

A dermatite atópica canina (DA) tem sido definida como uma doença inflamatória e pruriginosa da pele alérgica geneticamente predisposta, com características clínicas, associada a anticorpos IgE mais comumente direcionados contra alérgenos ambientais (HALLIWELL, 2006). A DA é uma das doenças de pele mais comuns em cães, com uma prevalência de 3-15% na população geral de cães e representando entre 3% e 58% dos cães afetados com doença de pele apresentados aos veterinários (HILLIER; GRIFFIN, 2001A; HILL et al., 2006).

O tema do papel das anomalias da barreira da pele na DA canina é relativamente novo em comparação com o que é conhecido na medicina humana há décadas. No entanto, há evidências crescentes de que existe alguma disfunção da barreira da pele, embora ainda não se saiba se existe um defeito primário na barreira cutânea (SANTORO et al., 2015). Todos os estudos até o momento se concentraram na comparação de cães atópicos com controles saudáveis e não compararam as alterações observadas na pele atópica com o que pode estar presente em cães com outras doenças de pele. Isto é de grande importância antes que qualquer declaração definitiva possa ser feita sobre a especificidade das mudanças no que se refere à DA. É de fato conhecido que a inflamação pode piorar a barreira da pele, portanto, é importante lembrar que algumas das alterações observadas na pele atópica inflamada podem ser, pelo menos em parte, devido à presença de inflamação, se isso é clinicamente evidente ou apenas histologicamente presente (MARSELLA; BENEDETTO, 2017).

Atualmente, vários estudos relatam reduções de ceramidas (YOON et al., 2011), alterações na expressão da filagrina (SANTORO et. al., 2013a) e maior expressão das enzimas envolvidas no metabolismo da filagrina (como calpaína-1, caspase 14 e matriptase) e aumento da perda de água transepidermica em cães com DA (HIGHTOWER et al., 2010). As alterações no teor de ceramida têm sido associadas ao aumento da perda de água Transepidermica e à barreira da pele prejudicada. A quantidade de lipídios totais e ceramidas, incluindo todas as classes de ceramida, é significativamente menor na pele lesionada e não lesionada de cães atópicos em comparação com a pele normal, com a redução sendo mais severa na pele lesionada (ANGELBECK-SCHULZE et al., 2014). Curiosamente, não há conexão entre composição lipídica e locais de predileção para lesões de dermatite atópica canina (HIGHTOWER et al., 2010). A consciência da diminuição dos lipídios epidérmicos desencadeou o foco na aplicação tópica de emulsões lipídicas como uma estratégia para a reparação da barreira da pele e melhora dos sinais clínicos (MARSELLA, 2013). Vários estudos relataram o efeito benéfico da aplicação tópica de formulações à base de ceramida na restauração da composição lipídica no estrato córneo, bem como na melhora dos sinais clínicos em cães com DA (JUNG et al., 2013; CERRATO et al., 2016).

A relação entre disfunção da barreira da pele e sensibilização alérgica e inflamação é uma via de mão dupla: a função de barreira da pele é agravada pela inflamação (STAHL et al., 2012) e quanto pior a barreira da pele, maior é a propensão para a sensibilização alérgica. O efeito negativo das citocinas T helper 2 (Th2) na integridade da barreira cutânea é bem conhecido (SEHRA et al., 2016). O fato de a barreira da pele estar prejudicada determina como os alérgenos são processados e promove uma resposta Th2. Aumento da propensão para a sensibilização alérgica foi demonstrado em um modelo experimental de DA canina após a remoção do estrato córneo por fita stripping (OLIVRY et al., 2011). Em um estudo controlado, demonstrou-se que os cães, em que o estrato córneo foi removido ficaram sensibilizados mais rápido e com níveis mais elevados de IgE, do que os cães no qual o estrato córneo foi deixado no lugar, destacando a importância da diminuição da barreira da pele, como um dos fatores que facilita sensibilização epicutânea a alérgenos (STAHL et. al., 2012). A exposição ao antígeno após a remoção do estrato córneo faz com que as células de Langerhans migrem e a apresentação do antígeno dê, predominantemente, uma resposta Th2. Assim, o defeito da barreira cutânea está ligado à propensão para a sensibilização alérgica após a exposição epicutânea em pacientes atópicos (STRID et al., 2004).

O microbioma refere-se à combinação de microorganismos e seu material genético. A grande maioria desses organismos é inofensiva para o hospedeiro e muitos deles são

realmente benéficos. O microbioma é, portanto, de importância crucial para o hospedeiro. Por um lado, os organismos “benéficos” ocupam um nicho, evitando a invasão por bactérias mais patogênicas. Além disso, esses microrganismos interagem com o sistema imune inato e adaptativo e educam o sistema imunológico (BELKAID; SEGRE, 2014). O microbioma é dinâmico e muda ao longo da vida de um indivíduo e é afetado por fatores endógenos e exógenos. A biodiversidade (variabilidade entre organismos vivos de todas as fontes) é essencial para educar o sistema imunológico e a perda de biodiversidade tem sido associada ao aumento do desenvolvimento de doenças inflamatórias e alérgicas crônicas nos últimos anos. Isso ocorre porque o microbioma tem uma função importante na educação do sistema imunológico e a diversidade é necessária para alcançar a tolerância (SALZMAN, 2014).

A maior parte da interação entre a microbiota comensal e o sistema imune inato visa prevenir o crescimento excessivo e a infecção, obtendo um equilíbrio delicado entre a regulação e a homeostase. As alergias são dirigidas por uma resposta anormal a desencadeadores antigênicos inofensivos, levando à inflamação crônica. A “hipótese da higiene” sugeriu que a falta ou diminuição da exposição microbiana leva à desregulação Th2 e ao desenvolvimento de alergia. Essa teoria foi agora revisada para algo relacionado, chamado de “hipótese da microflora”, que sugere que alterações na microbiota prejudicam a tolerância imunológica. Portanto, a perda de biodiversidade devido a mudanças no estilo de vida, sejam dietéticas ou ambientais, promove o desenvolvimento de um estado atópico, que então promove uma resposta inflamatória crônica (HAAHTELA et al., 2013).

Em um estudo publicado avaliando as diferenças entre cães saudáveis e alérgicos (RODRIGUES et. al., 2014), foi relatado que os cães alérgicos têm menos biodiversidade do que os cães normais com um número maior de *Staphylococcus* coagulase-positivos em comparação com cães saudáveis. Atualmente não está claro se essa menor diversidade é uma causa ou um efeito. O estudo feito por Rodrigues et al. em cães atópicos, não observaram a gravidade da doença ou a evolução das lesões de dermatite atópica. Em vez disso, foi apenas para avaliar as diferenças básicas entre a pele saudável e alérgica. Este é um importante ponto de partida para ver se existem diferenças fundamentais entre a pele canina saudável e atópica.

. A DA canina é caracterizada por eritema e prurido que afetam preferencialmente algumas áreas do corpo (Figura 13) (HENSEL et al., 2015). Essas áreas incluem o focinho, pescoço, tórax, áreas perioculares, pinças, área antebraquial e áreas axilares e inguinais. Curiosamente, essas áreas foram encontradas para ter maior permeabilidade em comparação com outras áreas do corpo (HIGHTOWER et al., 2010) por isso pode-se especular que isso pode ser uma razão para que elas tendam a ser preferencialmente afetados. O prurido é uma

característica consistente desta condição e tende a piorar quando as infecções secundárias se desenvolvem. A DA canina é agravada por outras alergias, como a alergia a pulgas, e muitos pacientes podem apresentar sinais de sobreposição de DA e alergia a pulgas. A presença de múltiplos gatilhos desempenha um papel muito importante no manejo do prurido, já que todos os gatilhos são aditivos. A DA desenvolve-se em indivíduos jovens e é inicialmente, na maioria dos casos, sazonal. Com o passar do tempo, a DA tem a propensão de se tornar o ano todo e de aumentar progressivamente a gravidade. Assim, o curso é cronicamente progressivo na maioria dos pacientes. Infecções secundárias, tanto bacterianas quanto de leveduras, frequentemente se desenvolvem com autotraumas e a inflamação torna a pele mais vulnerável (MARSELLA; BENEDETTO, 2017).

Figura 13 - Extremidades, face, pescoço e tórax são frequentemente afetados por eritema e prurido em cães com dermatite atópica.



Fonte: MARSELLA; BENEDETTO, 2017.

Apesar de muitos esforços para identificar um “teste diagnóstico” para DA canina, o diagnóstico permanece clínico. Uma variedade de critérios clínicos (FAVROT et al., 2010; OLIVRY, 2010) foram considerados ao longo dos anos com sensibilidade e especificidade variáveis. Independentemente dos critérios, o diagnóstico é baseado na história, nos sinais

clínicos e na exclusão de outras doenças pruriginosas. A detecção de IgE específica para alérgenos é considerada um critério menor. Assim, o teste de alergia para detectar IgE específica para alérgenos, tanto testes sorológicos como intradérmicos, não pode ser usado para fins de diagnóstico, pois eles não têm uma grande capacidade de discriminar entre pacientes normais e atópicos (PUCHEU-HASTON et al., 2015). O teste de alergia é melhor usado para identificar alérgenos a serem incluídos na imunoterapia específica a alérgenos, uma vez que o diagnóstico clínico da DA tenha sido feito (MARSELLA; BENEDETTO, 2017).

3.4 β-defensinas e as Dermatites

No surgimento de uma dermatite, a resposta imune inata é produzida, coordenada pelas células de defesa que produzem peptídeos de defesa do hospedeiro, com objetivo de eliminar os microrganismos. Esta é inicialmente mediada pelos queratinócitos, que são células formadas na camada mais profunda da epiderme (camada basal), cujos receptores de patógenos podem detectar os抗ígenos, iniciando uma coordenada reação inflamatória que inclui o recrutamento de células brancas e a produção de peptídeos, como as β-defensinas (LEONARD et al., 2012).

Em resposta à infecção, os epitélios montam uma resposta imune inata que inclui a produção de peptídeos antimicrobianos. No entanto, as vias que ligam infecção e inflamação com a indução de peptídeos antimicrobianos em epitélios não são compreendidas. Sørensen et. al (2005) analisaram as ligações moleculares entre a infecção e a expressão de três peptídeos antimicrobianos da família β-defensina, HBD1, HBD2 e HBD3 na epiderme humana. Após exposição a moléculas derivadas de micróbios, tanto os monócitos como os linfócitos estimularam a expressão epidérmica de HBD-1, HBD-2 e HBD-3 (SØRENSEN et. al., 2005).

A importância das defensinas na pele está implícita em estudos de doenças da pele, a pele lesionada de humanos com dermatite atópica apresenta expressão significativamente menor quando comparada à pele de pacientes com psoríase, sendo a dermatite atópica propensa a desenvolver infecções de pele. Isso contrasta com os pacientes com psoríase, embora ambos os distúrbios da pele estejam associados a uma barreira cutânea defeituosa (HOWELL, 2007). Similarmente ao seu homólogo humano, os cães com dermatite atópica são muito suscetíveis a infecções secundárias da pele que podem agravar o prurido do

paciente, complicar o tratamento e comprometer ainda mais a integridade da barreira cutânea (KYRA et al., 2008).

No estudo desenvolvido por Santoro et al. (2013b), os cães com dermatite atópica obtiveram significativamente maior expressão de mRNA de CBD103 do que os cães controle. Além disso, a pele atópica com infecção ativa apresentou maior expressão de mRNA de CBD103 e menor expressão de mRNA de CBD1 do que a pele atópica sem infecção. No entanto, outro estudo não observou diferenças significativas no nível de transcrição de CBD1, cBD103 ou TLR2 entre pele atópica infectada, atópica não infectada e pele saudável (MULLIN et. al., 2012). A expressão aumentada ou diminuída de defensinas na pele de cães atópicos sugere uma possível alteração no sistema imune inato desses animais, o que explica parcialmente as infecções bacterianas secundárias recorrentes em cães com dermatite atópica (VAN DAMME et al., 2009).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Termo de consentimento e ético

Todos os proprietários assinaram um termo de consentimento, autorizando as raspagens cutâneas dos cães. Este estudo foi desenvolvido seguindo as normas de bem estar da Comissão Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de Animais.

4.2 Critério de Inclusão

Cães apresentando lesões de pele e sinais clínicos (prurido e alopecia) característicos de dermatite. Esses animais foram avaliados através de anamnese, exame físico e exames laboratoriais, como os de raspados cutâneos, cultura fúngica e hemogramas.

Cães clinicamente saudáveis e sem histórico ou presença de doença dermatológica.

4.3 Critério exclusão

Os cães utilizados nesse estudo não estavam fazendo uso de glicocorticóides e antibióticos sistêmicos a no mínimo um mês. Segundo os proprietários foram utilizados apenas antiparasitários tópicos e sistêmicos em alguns cães com lesões de pele.

4.4 Populações de cães

Os cães com lesões de pele tinham idade entre 4 e 14 anos, 4 machos e 4 fêmeas, não castrados e com dieta a base de rações e comida caseira. Os cães saudáveis tinham idade entre 5 meses a 8 anos, 11 machos e 2 fêmeas, não castrados e com dieta a base de rações e comida caseira.

4.5 Coleta de amostras

As amostras foram coletadas no hospital veterinário e em área domiciliar de alguns animais. As raspagens cutâneas (Figura 14) foram realizadas utilizando lâminas de bisturi em 21 cães da raça Poodle: onde 13 amostras foram coletadas de animais clinicamente saudáveis e oito amostras de animais com lesões de pele suspeitas de dermatite. As amostras dos animais foram imersas em solução de trizol e armazenadas em -80 °C. As amostras coletadas em domicílio foram conservadas em *RNA later* e posteriormente armazenadas a -80°C.

Figura 14– Coleta de raspado cutâneo profundo em cão.



Fonte: QUEVEDO, 2011.

4.6 Extração e quantificação de RNA

O método de extração de RNA total foi realizado pelo reagente Trizol® (Life Technologies, Brasil), com adaptação do método original descrito por Chomczynski e Sacchi (1987), utilizando-se uma solução de fenol e isotiocianato de guanidina, empregando 1 ml de Trizol para cada 1g de amostra. Em seguida, as amostras foram quantificadas utilizando espectrofotômetro de densidade óptica – BioDrop µLITE. O aparelho BioDrop µLITE permite estimar a concentração de RNA, em ng/µL, de forma rápida. Também foi possível identificar a pureza do RNA através da razão de absorbâncias A260/280 nm.

4.7 Iniciadores utilizados na RT-PCR

Os iniciadores (tabela 1) utilizados foram os da cBD103, cBD1 e o GAPDH como gene constitutivo, todos a 60 °C. Os iniciadores (tabela 1) foram desenvolvidos com as respectivas sequências gênicas pelo programa PRIMER3 (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>).

Tabela 1. Iniciadores utilizados na RT-PCR para quantificar as expressões dos genes CBD1 e CBD103 na pele de cães com e sem de dermatite.

Genes	Oligonucleotídeos (Iniciadores)	Tamanho da Sequência (pb)
CBD103	Forward: GCCCTTGCTGTTCTGATGC Reverse: GCATTTCGGCCAGTGGAAAG	157
CBD1	Forward: TGCTGGCTTCCTTACGGG Reverse: TAACAGGTGCCATCGATCCT	118
GAPDH	Forward: GGGCCAAGAGGGTCATCATC Reverse: GATGCCGAAGTGGTCATGGA	167

4.8 RT-PCR

Os níveis de expressões dos mRNA foram quantificados utilizando o Kit SYBR® Green One-step (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) seguindo as recomendações do fabricante a um volume final de 10 µl e analisados no CFX96 TouchTM Real-Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

4.9 Análises estatísticas

Os valores de Ct foram obtidos através da RT-PCR e as expressões de cada um foram determinadas pelo método 2-ΔCt, onde o ΔCt corresponde a diferença entre o gene determinante e o gene endógeno (CtcBD – CtGAPDH). Os perfis de expressão foram testados quanto à normalidade e o Teste “t” de Student foi aplicado para diferenciar os níveis de expressões entre animais com e sem dermatite através do programa SAS (Versão Universitária). O nível de significância foi de p < 0,05.

5. RESULTADOS

Expressões gênicas das defensinas (cBD1 e cBD103)

Do grupo de cães com lesões de pele, sete foram diagnosticados com dermatite atópica canina e um com dermatite alérgica a picada de pulga (DAPP). As duas defensinas avaliadas estavam expressas na pele dos 21 cães (cães com dermatite e cães saudáveis). No entanto, os genes β -defensina 1 (cBD1) e β -defensina 103 (cBD103) obtiveram uma expressão mais significativa nos cães com lesões de pele diagnosticados com dermatites.

A expressão do gene cBD1 foi mais significativa do que a expressão do gene cBD103, tanto em cães com dermatite como nos cães clinicamente saudáveis. Os níveis de expressão mais significativos foram os do gene CBD1 nos cães com lesões de pele diagnosticados com dermatites. (Figura 15).

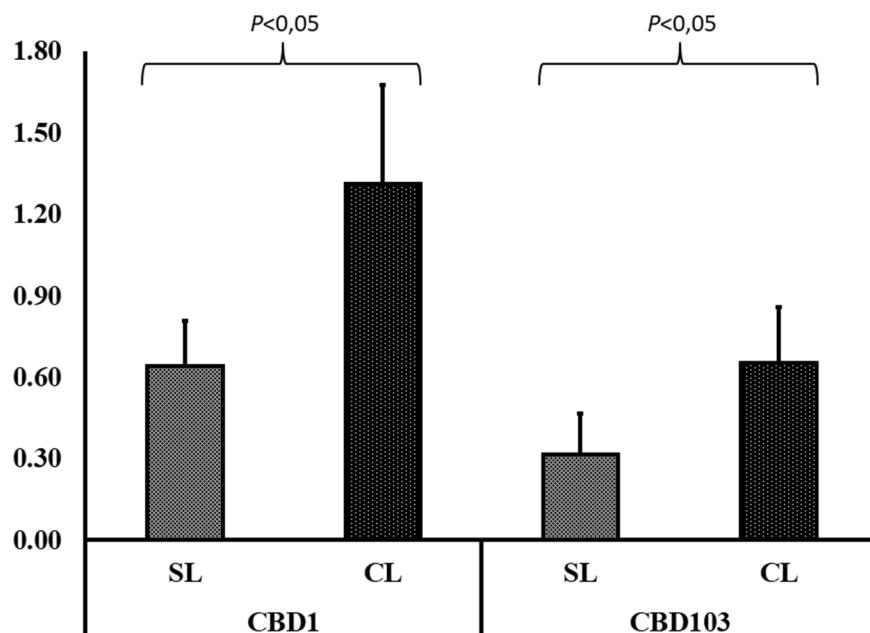


Figura 15. Expressões gênicas relativas da β -defensina canina 1 (CBD1) e β -defensina canina 103 (CBD 103) na pele de cães da raça poodle com lesão (CL) e sem lesão (SL) de pele.

6. DISCUSSÃO

As β -defensinas são consideravelmente expressas na pele de humanos e de várias espécies animais como os cães (HARDER et al., 2001; SANG et al., 2006; WINGATE et al., 2008). Neste estudo podemos observar a expressão de mRNA da cBD1 e cBD103 na pele de cães com dermatite atópica e cães saudáveis. Os cães com dermatite atópica apresentaram maiores níveis de expressão das defensinas cBD1 e cBD103 na pele, em comparação com os cães saudáveis. Esses resultados estão de acordo com outros trabalhos (VAN DAMME et al., 2009; SANTORO et al., 2011; SANTORO et al., 2013), que também avaliaram a expressão de mRNA de algumas defensinas (cBD1, cBD2, cBD3 e cBD103) na pele atópica e saudável de cães. Entretanto, MULLIN et al. (2012) que descreveram a expressão de mRNA para cBD1, cBD103 e TLR2 em amostras de pele atópica infectada, não infectada e saudável de cães, não encontrou diferenças significativas no nível de transcrição dessas defensinas entre cães atópicos e saudáveis.

A cBD103 é a β -defensina mais amplamente expressa na pele dos cães (WINGATE et al., 2008; LEONARD et al., 2012). No entanto, em nosso estudo observamos uma maior expressão da cBD1 na pele dos animais em relação a cBD103. O que corrobora com os resultados de van Damme et al. (2009) que descreveram um aumento significativo de doze vezes na expressão de cBD1 detectada na pele lesionada de cães atópicos em comparação com a pele saudável, enquanto a pele não lesionada apresentou um aumento de cinco vezes em relação a pele saudável. O interessante é que esses mesmos cães do estudo de van Damme et al. (2009) apresentaram uma expressão reduzida de cBD103, contrariando nossos achados, no qual encontramos maior expressão das duas defensinas (cBD1 e cBD103) avaliadas nos cães com dermatite em relação aos cães saudáveis. No estudo desenvolvido por Santoro et al. (2013) foi descrito uma expressão significativa apenas do gene cBD103 na pele de cães atópicos em relação aos cães saudáveis. Essas diferenças podem sugerir que algumas defensinas estejam envolvidas em determinados desafios imunológicos e também sua expressão pode variar dependendo do local e tipo de coleta, como foi relatado por Lancto et al. (2013) e Santoro (2018).

Os trabalhos que abordam a expressão de PAMs na pele de cães e humanos apresentam resultados divergentes em relação a expressão de defensinas. Alguns autores (GAMBICHLER et al., 2008; VAN DAMME et al., 2009; MULLIN et al., 2012; LEONARD et al., 2012) relatam que pode existir uma tendência para redução desses PAMs na pele atópica, devido uma alteração na barreira cutânea desses animais, o que poderia aumentar a

susceptibilidade a infecções bacterianas secundárias. Entretanto, Lancto et al. (2013) não observaram diferenças significativas para a expressão de cBD1 e cBD103 entre cães com dermatite atópica e cães com outras condições inflamatórias como a adenite sebácea e sugerem que a redução da expressão do gene da defensina não é uma característica específica da DA.

Santoro et al. (2013) levantaram algumas hipóteses baseadas em estudos anteriores (LAI; GALLO, 2009; AHRENS et al., 2011; SCHITTEK, 2011) para tentar explicar as alterações na produção de defensinas entre a pele atópica e saudável, na qual sugerem que pode ocorrer influencia do ambiente imunológico local, de alterações da barreira cutânea, degradação de proteínas e pela presença de células inflamatórias. As citocinas podem estar envolvidas com a regulação da expressão de defensinas na pele de humanos e cães com DA (HOWELL et al., 2006; VAN DAMME et al., 2009). De acordo com alguns trabalhos (MAEDA et al., 2002; NUTTALL et al., 2002) o nível de TNF- α pode estar elevado na pele lesionada de cães com dermatite atópica, regulando positivamente a expressão de cBD1 (VAN DAMME et al., 2009). A CBD1 foi a defensina que obteve maior expressão significativa em todos os animais, mas em nosso estudo não foram avaliados os níveis de expressões de citocinas inflamatórias para verificar tal relação.

Neste estudo os cães avaliados eram da raça poodle, mas algumas raças como golden retriever e labrador apresentam um polimorfismo no gene da cBD103, que é caracterizado pela coloração escura na pelagem desses cães (CANDILLE et al., 2007; LEONARD et al., 2012). A cBD103 também foi estudada na pele de cães com Leishmaniose visceral cutânea (LVC) através de métodos de imunohistoquímica (HERNANDEZ et al., 2012) e não houve aumento na concentração de cBD103 nos animais com LVC em relação ao grupo controle, segundo Hernandez (2012) é provável considerar que a cBD103 não tenha uma ação efetiva na imunidade da LVC. O papel das defensinas na dermatite atópica e outras infecções da pele de cães ainda não está totalmente esclarecido, e requer uma análise mais aprofundada desses peptídeos, considerando variáveis como espécie, raça, sexo, idade, dieta, condições ambientais, estado imunológico e infecções recorrentes.

7. CONCLUSÃO

As diferenças das expressões dos genes defensinas entre as peles atópica e saudável de cães da raça poodle pode nos sugerir que a pele lesionada desses animais poderia estar produzindo uma possível resposta imunológica através dessas defensinas. Entretanto são muitas as questões a serem esclarecidas sobre a imunidade da pele e a expressão de defensinas em cães com dermatite atópica e outros processos inflamatórios e infecciosos da pele. É importante a realização de outros trabalhos que avaliem a expressão de defensinas na pele de cães para uma melhor compreensão desses peptídeos na imunidade da pele.

REFERÊNCIAS

- AFSHAR, M.; GALLO, R. L. Innate immune defense system of the skin. *Vet Dermatol* 2013; 24: 32–9.
- AHRENS, K.; SCHUNCK, M.; PODDA, G.F. et al. Mechanical and metabolic injury to the skin barrier leads to increased expression of murine b-defensin-1, -3, and -14. *J Invest Dermatol* 2011; 131: 443–452.
- ALBEROLA, J.; RODRIGUEZ, A.; FRANCINO, O. et al. Safety and efficacy of antimicrobial peptides against naturally acquired leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 641–643.
- ALI, R.S.; FALCONER, A.; IKRAM, M. et al. Expression of the peptide antibiotics human b defensin-1 and human b defensin-2 in normal human skin. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 106–111.
- ANDERSEN, J.H.; JENSSEN, H.; SANDVIK, K. et al. Anti-hsv activity of lactoferrin and lactoferricin is dependent on the presence of heparan sulphate at the cell surface. *J. Med. Virol.* 2004 74, 262–271.
- ANGELBECK-SCHULZE, M.; MISCHKE, R.; ROHN, K. et al. Canine epidermal lipid sampling by skin scrub revealed variations between different body sites and normal and atopic dogs. *BMC Vet. Res.* 2014; 10, 152.
- BADER, M.W.; SANOWAR, S.; DALEY, M.E. et al. Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase. *Cell* 2005; 122: 461–472.
- BAHAR, A.A.; REN, D. Antimicrobial Peptides. *Pharmaceuticals* 2013. 6, 1543–1575.
- BAJWA, J. Canine Malassezia dermatites. *Diagnostic Dermatology*. 2017.
- BALS, R.; WANG, X.; WU, Z. et al. Human betadefensin 2 is a salt-sensitive peptide antibiotic expressed in human lung. *J Clin Invest.* 1998; 102:874–80.
- BALS, R.; WANG, X.; MEEGALLA, R. L. et al. Mouse beta-defensin 3 is an inducible antimicrobial peptide expressed in the epithelia of multiple organs. *Infect. Immun.* 1999, 67, 3542–3547.
- BARBAULT, F.; LANDON, C.; GUENNEUGUES, M. et al. Solution structure of alo-3: A new knottin-type antifungal peptide from the insect *Acrocinus longimanus*. *Biochemistry* 2003, 42, 14434–14442.
- BARSH, G.S. Regulation of pigment type switching by Agouti. In: Nordlund JJ, Boissy RE, Hearing VJ et al. eds. *The Pigmentary System*, 2nd edition. Oxford: Blackwell, 2006; 395–410.
- BASTIAN, A.; SCHAFER, H. Human alpha-defensin 1 (hnp-1) inhibits adenoviral infection in vitro. *Regul. Pept.* 2001, 101, 157–161.
- BEFUS, A.D.; MOWAT, C.; GILCHRIST, M. et al. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J Immunol*, 1999; 163: 947–953.
- BELKAID, Y.; SEGRE, J.A. Dialogue between skin microbiota and immunity. *Science* 2014; 346: 954–959.

BELAID, A.; AOUNI, M.; KHELIFA, R. et al. In vitro antiviral activity of dermaseptins against herpes simplex virus type 1. *J. Med. Virol.* 2002, 66, 229–234.

BENSCH, K.W.; RAIDA, M.; MAGERT, H.J. et al. hBD-1: a novel b-defensin from human plasma. *FEBS Lett* 1995; 368: 331–335.

BIRCHARD, S.J.; ROBERT, G.S. Manual Saunders de Clínica de pequenos animais. São Paulo, Editora Roca, 3 ed, 2008; 5: 415-617.

BIRCHLER, T.; SEIBL, R.; BUCHNER, K. et al. Human toll-like receptor 2 mediates induction of the antimicrobial peptide human beta-defensin 2 in response to bacterial lipoprotein. *Eur. J. Immunol.* 2001, 31, 3131–3137.

BOMAN, H.G. Peptide antibiotics and their oleininnate immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 1995; 13, 61–92.

BOND, R. Raspado de piel en el diagnóstico de las enfermedades cutáneas del perro y del gato. *Waltham Focus*, 1996; v. 6, p. 30-31.

BRACKETT, D.J.; LERNER, M.R.; LACQUEMENT, M.A. et al. A synthetic lipopolysaccharide-binding peptide based on the neutrophil-derived protein cap37 prevents endotoxin-induced responses in conscious rats. *Infect. Immun.* 1997, 65, 2803–2811.

BROGDEN, K.A. Antimicrobial peptides: Pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* 2005, 3, 238–250.

BROGDEN, K.A. ACKERMANN M, HUTTNER KM et al. Small, anionic, and charge-neutralizing propeptide fragments of zymogens are antimicrobial. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997, 41, 1615–1617.

BRUMFITT, W.; SALTON, M.R.; HAMILTON-MILLER, J.M. et al. Nisin, alone and combined with peptidoglycan-modulating antibiotics: Activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002, 50, 731–734.

CANDILLE, S.I.; KAELIN, C.B.; CATTANACH, B.M. et al. A b-defensin mutation causes black coat color in domestic dogs. *Science* 2007; 318: 1418–1423.

CARLOTTI, D.N. New Trends In Systemic Antibiotic Therapy of Bacterial Skin Diseases in Dogs. Supplement of the compendium on continuing Education for the Practicing Veterinarian, New York, 1996; n. 18, p. 40-47.

CERRATO, S.; RAMIÓ-LLUCH, L.; BRAZÍS, P. et al. Effects of sphingolipid extracts on the morphological structure and lipid profile in an in vitro model of canine skin. *Vet. J.* 2016; 212, 58–64.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. 1987;162(1):156-9.

CODNER, E.C.; RHODES, K.H. Pioderma In: Tilley LP, Smith FWK JR. Consulta veterinária em 5 minutos - Espécies canina e felina. 2^a. ed. São Paulo: Manol. 2003; p. 1136-1137.

CONCEIÇÃO, L.G.; LOURES, F.H.; CLEMENTE, J.T. et al. Biopsia e histopatologia da pele: um valioso recurso diagnóstico na dermatologia – revisão . Revista Clínica Veterinária, 2004; 36-44.

CONCEIÇÃO, L.G.; FABRIS, V.E. Piódermite Canina: etiopatogênese, diagnóstico e terapia antimicrobiana sistêmica. Uma breve revisão. Revista Cães e Gatos, 2000; 86:14.

CONLON, J.M.; SONNEVEND, A. Antimicrobial peptides in frog skin secretions. Methods Mol. Biol. 2010, 618, 3–14.

CUDIC, M.; OTVOS, L. Jr. Intracellular targets of antibacterial peptides. Curr. Drug Targets. 2002. 101–106.

DEL CASTILLO, F.J.; DEL CASTILLO, I.; MORENO, F. et al. Construction and characterization of mutations at codon 751 of the *Escherichia coli* *gyrB* gene that confer resistance to the antimicrobial peptide microcin b17 and alter the activity of DNA gyrase. J. Bacteriol. 2001, 183, 2137–2140.

DE LUCCA, A.J.; WALSH, T.J. Antifungal peptides: Novel therapeutic compounds against emerging pathogens. Antimicrob. Agents Chemother. 1999, 43, 1–11.

DUBOS, R.J.; HOTCHKISS, R.D. The production of bactericidal substances by aerobic sporulating bacilli. J. Exp. Med. 1941, 73, 629–640.

DUBOS, RJ. Studies on a bactericidal agent extracted from a soil bacillus: I. Preparation of the agent. Its activity in vitro. J. Exp. Med. 1939, 70, 1–10.

EPAND, R.M.; VOGEL, H.J. Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. Biochim. Biophys. 1999. Acta 1462, 11–28.

ERLES, K.; BROWNLIE, J. Expression of beta-defensins in the canine respiratory tract and antimicrobial activity against *bordetella bronchiseptica*. Vet. Immunol. Immunopathol. 2010; 135: 12–19.

EVAN, F.H.; SARAH, C.M.; ROBERT, E. et al. Antimicrobial Peptides: An Introduction. Methods in Molecular Biology. 2016.

FAVROT, C.; STEFFAN, J.; SEEWALD, W. et al. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. Vet. Dermatol. 2010; 21: 23–31.

FJELL, C.D.; HISS, J.A.; HANCOCK, R.E. et al. Designing antimicrobial peptides: form follows function. Nat. Rev. Drug Discov. 2012. 11,37–51.

FORTON, F.M. Papulopustular rosacea, skin immunity and Demodex: pityriasis folliculorum as a missing link. European Academy of Dermatology and Venereology. 2012; 26: 19–28.

FRIEDRICH, C.; SCOTT, M.G.; KARUNARATNE, N. et al. Salt-resistant alpha-helical cationic antimicrobial peptides. Antimicrob. Agents Chemother. 1999, 43, 1542–1548.

FUJIMURA, M.; IDEGUCHI, M.; MINAMI, Y. et al. Purification, characterization, and sequencing of novel antimicrobial peptides, Tu-AMP 1 and Tu-AMP 2, from bulbs of tulip (*Tulipa gesneriana* L.). Biosci. Biotechnol. Biochem. 2004, 68, 571–577

GANZ, T.; LEHRER, R.I. Defensins. Pharmacol Ther, 1995; 191-205..

GANZ, T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 710–720.

GAMBICHLER, T.; SKRYGAN, M.N.S.; NICK, T.O. et al. Differential mRNA Expression of Antimicrobial Peptides and Proteins in Atopic Dermatitis as Compared to Psoriasis Vulgaris and Healthy Skin. *Int Arch Allergy Immunol* 2008; 147:17–24.

GARCÍA, J.R.; JAUMANN, F.; SCHULZ, S. et al. Identification of a novel, multifunctional b-defensin (human b-defensin 3) with specific antimicrobial activity. *Cell Tissue Res* 2001; 306: 257–264.

GHUBASH, R. Parasitic miticidal therapy. *Clinical Techniques in Small Practice*, 2006; v. 21, p. 123-144.

GROENINK, J.; WALGREEN-WETERINGS, E.; VAN'T, H.O.F.W, et al. Cationic amphipathic peptides, derived from bovine and human lactoferrins, with antimicrobial activity against oral pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 1999, 179, 217–222.

GROVES, M.L.; PETERSON, R.F.; KIDDY, C.A. Poliomorphism in the red protein isolated from milk of individual cows. *Nature* 1965, 207, 1007–1008.

GUINA, T.; YI, E.C.; WANG, H. et al. A phosph-regulated outer membrane protease of *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* promotes resistance to alpha-helical antimicrobial peptides. *J. Bacteriol.* 2000; 182: 4077–4086.

GUO, L.; LIM, K.B.; PODUJE, C.M. et al. Lipid a acylation and bacterial resistance against vertebrate antimicrobial peptides. *Cell* 1998, 95, 189–198.

GUNN, J.S. Bacterial modification of LPS and resistance to antimicrobial peptides. *J. Endotoxin Res.* 2001; 7: 57–62.

HAAH TELA, T.; HOLGATE, S.; PAWANKAR, R. et al. WAO Special Committee on Climate Change and Biodiversity. The biodiversity hypothesis and allergic disease: World allergy organization position statement. *World Allergy Organ. J.* 2013; 6, 3.

HALLIWELL, R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2006; 114: 207-208.

HANCOCK, R.E.; CHAPPLE, D.S. Peptide antibiotics. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. 43, 1317–1323..

HANCOCK, R.E.; SCOTT, M.G. The role of antimicrobial peptides in animal defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000, 97, 8856–8861.

HARDER, J.; BARTELS, J.; CHRISTOPHERS, E. et al. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997; 387: 861.

HARDER, J.; BARTELS, J.; CHRISTOPHERS, E. et al. Isolation and characterization of human b-defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001; 276: 5707–5713.

HARRIS, F.; DENNISON, S.R.; PHOENIX, D.A. Anionic antimicrobial peptides from eukaryotic organisms. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2009, 10, 585–606.

HARVEY, R.G.; MCKEEVER, P.J. Manual colorido de dermatologia do cão e do gato: diagnóstico e tratamento, Rio de Janeiro: Revinter, 2004; 111-206.

HERNANDEZ, FAP. Expressão cutânea das β -defensinas (CBD102 e CBD103) em cães acometidos com Leishmaniose visceral. Dissertação de mestrado, Programa de pós-graduação em medicina veterinária, Universidade federal de viçosa, 2012.

HENPF, C.; OLSCHEWSKI, C.; OLSCHEWSKI, C.H. Hat jeder hautgesunde Hund Demodexmilben Histologische Faulitat. Berlin: Freie Universität Berlin, 1988. p. 141.

HENSEL, P.; SANTORO, D.; FAVROT, C. et al. Canine atopic dermatitis: Detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet. Res.* 2015; 11, 196.

HORNE, W.S.; WIETHOFF, C.M.; CUI, C. et al. Antiviral cyclic D,L- α -peptides: Targeting a general biochemical pathway in virus infections. *Bioorg. Med. Chem.* 2005, 13, 5145–5153.

HOTCHKISS, R.D.; DUBOS, R.J. Fractionation of the bactericidal agent from cultures of a soil *Bacillus*. *J. Biol. Chem.* 1940, 132, 791–792.

HOWELL, M.D. The role of human beta defensins and cathelicidins in atopic dermatitis. *Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology* 2007; 7: 413–7.

HIRSCH, J.G. Phagocytin: A bactericidal substance from polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* 1956, 103, 589–611.

HIGHTOWER, K.; MARSELLA, R.; FLYNN-LURIE, A. Effects of age and allergen exposure on transepidermal water loss in a house dust mite-sensitized beagle model of atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 2010; 21, 88–95.

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

HILL, P.B.; LO, A.; EDEN, C.A. et al. Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. *Veterinary Record*, 2006; 158: 533-539.

HNILCA, K.A. *Small Animal Dermatology: A Color Atlas and Therapeutic Guide*. 3rd ed. Elsevier Saunders, 2011; 83–84.

HUERTA, B.; MALDONADO, A.; GINEL, P.J et al. Riske factors associated with the antimicrobial resistance of staphylococci in canine pyoderma. *Vet Microbiol.* 2011; n. 150. P. 302-308.

HUANG, Y.B.; HUANG, J.F.; CHEN, Y.X. Alpha-helical cationic antimicrobial peptides: Relationships of structure and function. *Protein Cell* 2010, 1, 143–152.

IHRKE, P.J. Integumentary infections. In: Greene, C.E.(Ed). *Infectious diseases of the dog and cat.* 2006; 3 ed. p. 807- 823.

JARCZAK, J.; KOSCIUCZUK, E.M.; LISOWSKI, P. et al. Defensins: natural componente of human innate immunity. *Hum Immunol.* 2013; 1069-79.

JENSSEN, H.; ANDERSEN, J.H.; UHLIN-HANSEN, L. et al. O. Anti-hsv activity of lactoferricin analogues is only partly related to their affinity for heparan sulfate. *Antiviral Res.* 2004, 61, 101–109

JENSSSEN, H.; HAMILL, P.; HANCOCK, R.E.W. Peptide antimicrobial agents. *Clin. Microbiol. Rev.* 2006, 19, 491–511.

JUNG, J.Y.; NAM, E.H.; PARK, S.H. et al. Clinical use of a ceramide-based moisturizer for treating dogs with atopic dermatitis. *J. Vet. Sci.* 2013; 14, 199–205.

KAO, C.Y.; CHEN, Y.; ZHAO, Y.H. OR Feome-based search of airway epithelial cell-specific novel human [beta]-defensin genes. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003; 29:71–80.

KAO, C.Y.; KIM, C.; HUANG, F. et al. Requirements for two proximal NF- κ B binding sites and I κ B-f in IL-17A-induced human b-defensin 2 expression by conducting airway epithelium. *J Biol Chem* 2008; 283: 15309–15318.

KISICH, K.O.; HOWELL, M.D.; BOGUNIEWICZ, M. et al. The constitutive capacity of human keratinocytes to kill *Staphylococcus aureus* is dependent on b-defensin 3. *Journal of Investigative Dermatology* 2007; 127: 2368–80.

KISS, G.; MICHL, H. Über das giftsekret der gelbbauchunke, *Bombina variegata* L. *Toxicon* 1962, 1, 33–34.

KINDRACHUK, J.; JENSSSEN, H.; ELLIOTT, M. et al. Manipulation of innate immunity by a bacterial secreted peptide: Lantibiotic nisin z is selectively immunomodulatory. *Innate Immun.* 2013, 19, 315–327.

KRAJEWSKI, K.; MARCHAND, C.; LONG, Y.Q. et al.; Pommier, Y.; Roller, P.P. Synthesis and hiv-1 integrase inhibitory activity of dimeric and tetrameric analogs of indolicidin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004, 14, 5595–5598.

KUHL, K.A.; JEAN, S.G, In: Tilley LP, Smith JWK. Consulta Veterinária em cinco minutes: Espécies caninas e felinas. São Paulo: Editora Manole, 2 ed, 2003; 4: 396-1323

KWOCHKA, K.W. Demodicosis. In: Griffin CE, Kwochka KW, McDonald KM. Current Veterinary Dermatology. St. Louis: Mosby, 1993; p. 72- 84.

KYRA, V.W.; SHEILA, M.T.; KEVIN, A. et al. Expression of endogenous antimicrobial peptides in normal canine skin. *Revista veterinary dermatology*. 2008.

LANCTO, C.A.; TORRES, S.M.F.; HENDRICKSON, JÁ. et al. Altered expression of antimicrobial peptide genes in the skin of dogs with atopic dermatitis and other inflammatory skin conditions. *Vet Dermatol* 2013; 24: 414–90.

LARRICK, J.W.; HIRATA, M.; BALINT, R.F. et al. Human cap18: A novel antimicrobial lipopolysaccharide-binding protein. *Infect. Immun.* 1995, 63, 1291–1297.

LARSSON JUNIOR, C.E. Estudo comparativo da eficácia da imunoterapia com bacterina e de dois esquemas de pulsoterapia antibiótica no manejo de piodermites superficiais idiopáticas recidivantes caninas. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, 2008; p. 88p.

LEE, D.G.; KIM, H.K.; KIM, A.S. et al. Fungicidal effect of indolicidin and its interaction with phospholipid membranes. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 2003, 305, 305–310.

LEE, D.G.; KIM, P.I.; PARK, Y.K. et al. Design of novel peptide analogs with potent fungicidal activity, based on pmap-23 antimicrobial peptide isolated from porcine myeloid. *Biochem. Bioph. Res. Co.* 2002, 293, 231–238.

LEE, Y.T.; KIM, D.H.; SUH, J.Y. et al. Structural characteristics of tenecin 3, an insect antifungal protein. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 1999, 47, 369–376

LEIPPE, M. Antimicrobial and cytolytic polypeptides of amoeboid protozoa—Effector molecules of primitive phagocytes. *Dev. Comp. Immunol.* 1999, 23, 267–279.

LEONARD, B.C.; AFFOLTER, V.K.; BEVINS, C.L. Antimicrobial peptides: agents of border protection for companion animals. *Veterinary Dermatology*, 2012a; 23: 177–36.

LEONARD, B.C.; MARKS, S.L.; OUTERBRIDGE, C.A. et al. Activity, expression, and genetic variation of canine b-defensin 103: a multifunctional antimicrobial peptide in the skin of domestic dogs. *J Innate Immun* 2012b; 4: 248–259.

LEWIS, L.A.; CHOUDHURY, B.; BALTHAZAR, J.T. et al. Phosphoethanolamine substitution of lipid a and resistance of *Neisseria gonorrhoeae* to cationic antimicrobial peptides and complement-mediated killing by normal human serum. *Infect. Immun.* 2009, 77, 1112–1120.

HAZLETT, L.; WU, M. Defensins in innate immunity. *Cell Tissue Res* (2011) 343:175–188.

LIU, Y.; GONG, W.; HUANG, C.C. et al. Crystal structure of the conserved core of the herpes simplex virus transcriptional regulatory protein vp16. *Genes Dev.* 1999, 13, 1692–1703.

LOFTON, H.; PRANTING, M.; THULIN, E. et al. Mechanisms and fitness cost of resistance to antimicrobial peptides LL-37, CNY100H and wheat germ histones. *PLoS ONE*. 2013. 8:e 68875.

LOPPNOW, H.; LIBBY, P.; FREUDENBERG, M. et al. Cytokine induction by lipopolysaccharide (LPS) corresponds to lethal toxicity and is inhibited by nontoxic *Rhodobacter capsulatus* LPS. *Infect. Immun.* 1990, 58, 3743–3750.

MA, Y.F.; LIU, C.B.; LIU, X.H. et al. Peptidomics and genomics analysis of novel antimicrobial peptides from the frog, *Rana nigrovittata*. *Genomics* 2010, 95, 66–71.

MAASER, C.; KANNENGIESSER, K.; KUCHARZIK, T. Role of the melanocortin system in inflammation. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1072:123–34.

MACHADO, L. R.; OTTOLINI, B. An evolutionary history of defensins: a role for copy number variation in maximizing host innate and adaptive immune responses. *Frontiers in Immunology Molecular Innate Immunity*. 2015. 6: 115- 2.

MADANI, F.; LINDBERG, S.; LANGEL, U. et al. Mechanisms of cellular uptake of cell-penetrating peptides. *J. Biophys.* 2011, 414729.

MAEDA, S.; FUJIWARA, S.; OMORI, K. et al. Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 88, 79–87.

MAHLAPUU, M.; HÅKANSSON, J.; RINGSTAD, L. et al. Antimicrobial Peptides: Na Emerging Category of Therapeutic Agents. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2016; 6: 194.

MARR, A.K.; GOODERHAM, W.J.; HANCOCK, R.E. Antibacterial peptides for therapeuticuse: obstacles and realisti cout look. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2006; 6, 468–472.

MARSELLA, R.; BENEDETTO, A. Atopic Dermatitis in Animals and People: An Update and Comparative Review. *Veterinary Sciences*. 2017; 4, 37.

MARSELLA, R. Fixing the skin barrier: Past, present and future-man and dog compared. *Vet. Dermatol.* 2013; 24, 73–76.

MAULDIN, E.A.; SCOTT, D.W.; MILLER, W.H. Jr. et al. Malassezia dermatites in the dog: A retrospective histopathological and immunopathological study of 86 cases (1990–1995). *Vet Dermatol* 1997; 8:191–202.

MATHEWS, M.; JIA, H.P.; GUTHMILLER, J.M. et al. Production of b-defensin antimicrobial peptides by the oral mucosa and salivar glands. *Infect Immun* 1999; 67: 2740–5.

MEDEIROS, F.C., TOGNOLI, N., PEREIRA, L., PERES, R.E. Dermatófitos - Revisão de literatura. revista científica eletrônica de medicina veterinária. 2009; 1679-7353.

MILLER, S.I.; KUKRAL, A.M.; MEKALANOS, J.J. A two-component regulatory system (phop phoq) controls *Salmonella typhimurium* virulence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989, 86, 5054–5058.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E.; CAMPBELL, K. et al. Small Animal Dermatology. Elsevier, 2013; 7ed. p. 184-223.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E.; CAMPBELL, K.L. Parasitic diseases. In Muller and Kirk's Small Animal Dermatology, Philadelphia, PA. 2013; pp. 284–342.

MOERMAN, L.; BOSTEELS, S.; NOPPE, W. et al. Antibacterial and antifungal properties of α -helical, cationic peptides in the venom of scorpions from southern Africa. *Eur. J. Biochem.* 2002, 269, 4799–4810.

MULLER, H.G.; KIRK, W.R.; SCOTT, W.D. Demodicose. *Dermatologia dos pequenos animais*. São Paulo: Manole, 1985. p. 349-369.

MULLIN, J.; CARTER, S. WILLIAMS, N. et al. Transcription of canine toll-like receptor 2, b-defensin 1 and b-defensin 103 in infected atopic skin, non-infected atopic skin, healthy skin and the CPEK cell line. *Veterinary Microbiology*. 2012.

NICOLAS, P. Multifunctional host defense peptides: intracellularartargeting antimicrobial peptides. *FEBS J.* 2009. 276, 6483–6496.

NUTTALL, T.J.; KNIGHT, P.A.; MCALEESE, S.M. et al. T-helper 1, Thelper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2002; 87: 379–384.

NUTTING, W.B.; DESCH, C.E. *Demodex canis* redescription and reevaluation. *Cornell Veterinarian*, 1978; 68: 49-139.

NIYONSABA, F.; IWABUCHI, K.; MATSUDA, H. et al. Epithelial cell-derived human beta-defensin-2 acts as a chemotaxin for mast cells through a pertussis toxin-sensitive and phospholipase c-dependent pathway. *Int. Immunol.* 2002; 14, 421–426.

NIYONSABA, F.; USHIO, H.; NAKANO, N. et al. Antimicrobial peptides human b-defensins stimulate epidermal keratinocyte migration, proliferation and production of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 594–604.

OHTANI, S.; OKADA, T.; YOSHIZUMI, H. et al. Complete primary structures of two subunits of purothionin a, a lethal protein for brewer's yeast from wheat flour. *J. Biochem.* 1977, 82, 753–767.

OLIVRY, T.; WOFFORD, J.; PAPS, J.S. et al. Stratum corneum removal facilitates experimental sensitization to mite allergens in atopic dogs. *Vet. Dermatol.* 2011; 22: 188–196.

OLIVRY, T.; SOUSA, C.A. The ACVD task force on canine atopic dermatites (XIX): general principles of therapy. *Vet Immunol Immunopathol*; 2001; 81: 311–316

OLIVRY, T. International Task Force of Canine Atopic Dermatitis. New diagnostic criteria for canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 2010; 21: 123–126.

O'NEIL, D.A.; PORTER, E.M.; ELEWAUT, D. et al. Expression and regulation of the human b-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol* 1999; 163: 6718–6724.

PEDERSEN, N.C.; LIU, H.; LAUGHLIN, B. et al. Genetic characterization of healthy and sebaceous adenitis affected Standard Poodles from the United States and the United Kingdom. *Tissue Antigens*, 2012; 80: 46–57.

PARK, C.B.; KIM, H.S.; KIM, S.C. Mechanism of action of the antimicrobial peptide buforin ii: Buforin ii kills microorganisms by penetrating the cell membrane and inhibiting cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1998, 244, 253–257.

PARK, Y.; JANG, S.H.; LEE, D.G. et al. Antinematodal effect of antimicrobial peptide, pmap-23, isolated from porcine myeloid against *Caenorhabditis elegans*. *J. Pept. Sci.* 2004, 10, 304–311.

PARADIS, M. Ivermectin in small animal dermatology. Part II. Extralabel applications. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian, 1998; v. 20, p. 459–469.

PESCHEL, A.; SAHL, H.G. The co-evolution of host cationic antimicrobial peptides and microbial resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006. 4, 529-536.

PATEL, A.; FORSYTHE, P. *Dermatologia em pequenos animais*. Elsevier, 2010; p 15-25.

PATTERSON, A.P.; FRANK, L.A. How to diagnose and treat Malassezia dermatites in dogs. *Vet Med* 2002; 97:612–623.

PATIL, A.A.; CAI, Y.; SANG, Y. et al. Cross-species analysis of the mammalian b-defensin gene family: presence of syntenic gene clusters and preferential expression in the male reproductive tract. *Physiol Genomics* 2005; 23: 5–17.

PATIL, A.; HUGHES, A.L.; ZHANG, G. Rapid evolution and diversification of mammalian a-defensins as revealed by comparative analysis of rodent and primate genes. *Physiol Genomics* 2004; 20: 1–11.

PRANTING, M.; NEGREA, A.; RHEN, M. et al. Mechanisms and fitness cost of PR-39 resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2008; 52, 2734–2741.

PUCHEU-HASTON, C.M.; BIZIKOVA, P.; EISENSCHENK, M.N. et al. Review: The role of antibodies, autoantigens and food allergens in canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 2015; 26.

RADEK, K.; GALLO, R. Antimicrobial peptides: Natural effectors of the innate immune system. *Semin. Immunopathol.* 2007, 29, 27–43.

RAMMELKAMP, C.H.; WEINSTEIN, L. Toxic effects of tyrothricin, gramicidin and tyrocidine. *J. Infect. Dis.* 1942, 71, 166–173.

RAVERA, I.; ALTET, L.; FRANCINO, O. et al. Small Demodex populations colonize most parts of the skin of healthy dogs. *Veterinary Dermatology.* 2013; 24: 168–172.

REDDY, K.V.; YEDERY, R.D.; ARANHA, C. Antimicrobial peptides: premises and promises. *Int.J. Antimicrob. Agents.* 2004; 24, 536–547.

REEDY, L.M. Results of allergy testing and hyposensitization in selected feline skin diseases. *J Am Anim Hosp Assoc* 1982; 18: 618–623.

RIEDL, S.; ZWEYICK, D.; LOHNER, K. Membrane-active host defense peptides - challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chem. Phys. Lipids* 2011, 164, 766–781.

RODRÍGUEZ-JIMÉNEZ, F.J.; KRAUSE, A.; SCHULZ, S. et al. Distribution of new human beta-defensin genes clustered on chromosome 20 in functionally different segments of epididymis. *Genomics* 2003; 81: 175–83.

RODRIGUES, H. A.; PATTERSON, A.P.; DIESEL, A. et al. The skin microbiome in healthy and allergic dogs. *PLoS ONE* 2014; 9: 83 197.

SAKO, S. Studies on canine demodicosis: examination of the oral-internal infection, intrauterine infection and infection through the respiratory tract. *Japanese Journal of Parasitology*, 1964 v. 11, p. 499.

SALZMAN, N.H. The role of the microbiome in immune cell development. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2014; 113: 593–598.

SANG, Y.; ORTEGA, M.T.; BLECHA, F. et al. Molecular cloning and characterization of three b-defensins from canine testes. *Infect Immun* 2005; 73: 2611–2620.

SANG, Y.; PATIL, A.; ZHANG, G. et al. Bioinformatic and expression analysis of novel porcine b-defensins. *Mamm Genome* 2006; 17: 332–339.

SANTARÉM, V.A. Demodicose canina: revisão. *Clinica Veterinária (São Paulo)*, 2007 v. 69, p. 86-98.

SANTORO, D.; BUNICK, D.; GRAVES, T.K. et al. Expression and distribution of antimicrobial peptides in the skin of healthy beagles. *Vet Dermatol* 2010; 22: 61–67.

SANTORO, D.; MARSELLA, R.; BUNICK, D. et al. Expression and distribution of canine antimicrobial peptides in the skin of healthy and atopic beagles. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 144: 382–388.

SANTORO, D.; MARSELLA, R.; AHRENS, K. et al. Altered mRNA and protein expression of filaggrin in the skin of a canine animal model for atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 2013a; 24: 329–336.

SANTORO, D.; BUNICK, D.; THOMAS, K. et al. Evaluation of canine antimicrobial peptides in infected and noninfected chronic atopic skin. *Vet Dermatol* 2013b; 24: 39–10

SANTORO, D.; MARSELLA, R.; PUCHEU-HASTON, C.M. et al. Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: Skin barrier and host-micro-organism interaction. *Vet. Dermatol.* 2015; 26.

SANTORO, D. Evaluation of the secretion of antimicrobial peptides and antimicrobial effect of skin wash in atopic and healthy dogs: a preliminary study. *Vet Dermatol*, 2018.

SCHAUBER, J.; GALLO, R.L. Antimicrobial peptides and the skin immune defense system. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2008, 122, 261–266.

SCOTT, D.W.; FARROW, B.R.H.; SCHULTZ, R.D. Studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 1974; v. 10, p. 233-244.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Bacterial Skin Diseases. In: Muller & Kirk's Small Animal Dermatology, 6 a ed. Pennsylvania: Elsevier, 2001; p.1- 65.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E. Muller & Kirk. Dermatologia de pequenos animais. 5^a ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996.

SEHRA, S.; KRISHNAMURTHY, P.; KOH, B. et al. Increased Th2 activity and diminished skin barrier function cooperate in allergic skin inflammation. *Eur. J. Immunol.* 2016; 46, 2609–2613.

SELSTED, M.E.; NOVOTNY, M.J.; MORRIS, W.L. et al. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 4292–4295.

SELSTED, M.E.; OUELLETTE, A.J. Mammalian defensins in the antimicrobial immune response. *Nat Immunol.* 2005; 6: 551–557.

SHAFER, W.M.; QU, X.; WARING, A.J. et al. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 1829–1833.

SHAI, Y. Mode of action of membrane active antimicrobial peptides. *Biopolymers* 2002, 66, 2 Sinha S, Cheshenko N, Lehrer RI et al. Np-1, a rabbit alpha-defensin, prevents the entry and intercellular spread of herpes simplex virus type 2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003, 47, 494–500.

SINGH, S.K.; DIMRI, U. The immuno-pathological conversions of canine demodicosis. Veterinary Parasitology. 2014; 203: 1–5.36–248. 82.

SITARAM, N.; NAGARAJ, R. Interaction of antimicrobial peptides with biological and model membranes: Structural and charge requirements for activity. Biochim. Biophys. Acta 1999, 1462, 29–54.

SITE PETS E DICAS. Sarna Demodéica. Disponível em: <http://www.petsedicas.com/2014/05/Sarna-demodecica-e-escabiose-em-caes-e-gatos-Sintomas-Diagnostico-e-Tratamento.html>. Acessado em 10 de dezembro de 2018.

SITE ANA QUEVEDO VET PET DICAS. Dermatites. Disponível em: <http://anaquevedodicasvet.blogspot.com/2011/11/sindrome-seborreica.html>. Acessado em 15 de julho de 2018.

SITE PRACTICA VET. Malassezia. Disponível em: <https://practica.vet/2017/05/27/malassezia/malassezia-2>. Acessado em 20 novembro de 2018.

SONG, B.H.; LEE, G.C.; MOON, M.S. et al. Human cytomegalovirus binding to heparan sulfate proteoglycans on the cell surface and/or entry stimulates the expression of human leukocyte antigen class I. J. Gen. Virol. 2001, 82, 2405–2413.

SØRENSEN, O.E.; THAPA, D.R.; ROSENTHAL, A. et al. Differential Regulation of -Defensin Expression in Human Skin by Microbial Stimuli1. The Journal of Immunology. 2005; 1550-6606.

SOUZA, T.M. Dermatopatias não-tummorais em cães: Bases para o diagnóstico e dados de prevalência em Santa Maria, Rio Grande do Sul (2005-2008). Tese de doutorado. Universidade Federal de Santa Maria. 2009.

SOUZA, A.E.F. Dermatofitose associadas a fungos do gênero Microsporum. Clínica Veterinária, São Paulo, 2002; v. 13, n. 5, p. 24-26.

STAHL, J.; PAPS, J.; BÄUMER, W. et al. Dermatophagoides farinae house dust mite allergen challenges reduce stratum corneum ceramides in an experimental dog model of acute atopic dermatitis. Vet. Dermatol. 2012; 23.3

STEFFEN, H.; RIEG, S.; WIEDEMANN, M. et al. Naturally processed dermcidin-derived peptides do not permeabilize bacterial membranes and kill microorganisms irrespective of their charge. Antimicrob. Agents Chemother. 2006, 50, 2608–2620.

STRID, J.; HOURIHANE, J.; KIMBER, I. et al. Disruption of the stratum corneum allows potent epicutaneous immunization with protein antigens resulting in a dominant systemic Th2 response. Eur. J. Immunol. 2004; 34, 2100–2109.

SUBBALAKSHMI, C.; SITARAM, N. Mechanism of antimicrobial action of indolicidin. FEMS Microbiol. Lett. 1998, 160, 91–96.

SWOPE, V.B.; JAMESON, J.A.; MCFARLAND, K.L. et al. Defining MC1R regulation in human melanocytes by its agonist α- melanocortin and antagonists agouti signaling protein and β-defensin 3. J Invest Dermatol 2012; 132: 2255–62.

TANG, Y.Q.; YUAN, J.; OSAPAY, G. et al. A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science* 1999; 286: 498–502.

TERRAS, F.R.; SCHOOPS, H.M.; DE BOLLE, M.F. et al. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus L.*) seeds. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 15301–15309.

TIZARD, I.R. Immunity to parasites. *Veterinary immunology introduction*. 5 ed. Roca. 2000.

TIZARD, I.R. Immunity to parasites. In: *Veterinary immunology: an introduction*. 6. ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2000. p. 280-294.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: new candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolymers*. 2005. 80, 717–735.

TOLLNER, T.L.; YUDIN, A.I.; TREECE, C.A. et al. Macaque sperm coating protein DEFB126 facilitates spermpenetration of cervicalmucus. *Hum Reprod* 2008; 23:2523–34.

TOLLNER, T.L.; VENNERS, S.A.; HOLLOX, E.J. et al. A common mutation in the defensin DEFB126 causes impaired sperm function and subfertility. *Sci Transl Med* 2011; 3:92-65.

VALORE, E.V.; PARK, C.H.; QUAYLE, A.J. et al. Human b-defensin-1: na antimicrobial peptide of urogenital tissues. *J Clin Invest* 1998; 101: 1633–1642.

VAN EPPS, H.L.; DUBOS, R. Unearthing antibiotics. *J. Exp. Med.* 2006, 203, 259.

VAN DER WEERDEN, N.L.; HANCOCK, R.E.; ANDERSON, M.A. Permeabilization of fungal hyphae by the plant defensin nad1 occurs through a cell wall-dependent process. *J. Biol. Chem.* 2010, 285,37513–3752.

VAN DAMME, C.M.M.; WILLEMSE, T.; VAN DIJK, A. et al. Altered cutaneous expression of b-defensins in dogs with atopic dermatitis. *Molecular Immunology* 2009; 46: 2449–55.

VERMA, C.; SEEBAH, S.; LOW, S.M. et al. Defensins: antimicrobial peptides for therapeutic development. *Biotechnol J.* 2007. 11:1353–1359.

VIERIRA, J.M. Tratamento da piôdermite recidivante em cães e gatos causada por microrganismos multirresistentes, 2012.

VUONG, C.; VOYICH, J.M.; FISCHER, E.R. et al. Polysaccharide intercellular adhesin (pia) protects *Staphylococcus epidermidis* against major components of the human innate immune system. *Cell Microbiol.* 2004, 6, 269–275.

VYLKOVA, S.; NAYYAR, N.; LI, W. et al. Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrobial Agents Chemother* 2007; 51:154–61.

WHITE, S.D. Advances in equine atopic dermatitis, serologic and intradermal allergy testing. *Clin Tech Equine Pract* 2005; 4: 311–313.

WINGATE, K.V.; TORRES, S.M.; SILVERSTEIN, K.A. et al. Expression of endogenous antimicrobial peptides in normal canine skin. *Vet Dermatol* 2008; 20: 19–26.

WOLK, K.; KUNZ, S.; WITTE, E. et al. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004; 21: 241–254.

WOLBERG, A.C. Canine demodicosis. In: Congress of the World small animal veterinary association. Proceedings. Buenos Aires, 1998.

YADAVA, P.; ZHANG, C.; SUN, J. et al. Antimicrobial activities of human b-defensins against Bacillus species. *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28: 132–137.

YAGER, J.A.; SCOTT, D.W. The skin and appendages. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N. *Pathology of domestic animals*. San Diego: Academic Press, 1992. p. 531-737.

YANG, D.; BIRAGYN, A.; KWAK, L.W. et al. Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol*, 2002; 23: 291–296.

YASIN, B.; WANG, W.; PANG, M. et al. Theta defensins protect cells from infection by herpes simplex virus by inhibiting viral adhesion and entry. *J. Virol.* 2004, 78, 5147–5156.

YEAMAN, M.R.; BAYER, A.S.; KOO, S.P. et al. Platelet microbicidal proteins and neutrophil defensin disrupt the *Staphylococcus aureus* cytoplasmic membrane by distinct mechanisms of action. *J. Clin. Invest.* 1998, 101, 178–187.

YEAMAN, M.R.; YOUNT, N.Y. Mechanisms of antimicrobial peptide action and resistance. *Pharmacol. Rev.* 2003, 55, 27–55.

YENUGU, S.; HAMIL, K.G.; RADHAKRISHNAN, Y. et al. The androgenregulated epididymal sperm-binding protein, human beta-defensin 118 (DEFB118) (formerly ESC42), is an antimicrobial beta-defensin. *Endocrinology* 2004; 145:3165–73.

YOON, J.S.; NISHIFUJI, K.; SASAKI, A. et al. Alteration of stratum corneum ceramide profiles in spontaneous canine model of atopic dermatitis. *Exp. Dermatol.* 2011; 20, 732–736.

ZAALOUK, T.K.; BAJAJ-ELLIOTT, M.; GEORGE, J.T. et al. Differential regulation of b-defensin gene expression during *Cryptosporidium parvum* infection. *Infect Immun* 2004; 72: 2772–2779.

ZASLOFF, M.M. A class of antimicrobial peptides from *Xenopus* skin: Isolation, characterization of two active forms, and partial cDNA sequence of a precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987, 84, 5449–5453.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 2002, 415, 389–395.

ZEYA, H.I.; SPITZNAGEL, J.K. Antibacterial and enzymic basic proteins from leukocyte lysosomes: Separation and identification. *Science* 1963, 142, 1085–1087.

ZHANG, G.H.; MANN, D.M.; TSAI, C.M. Neutralization of endotoxin in vitro and in vivo by a human lactoferrin-derived peptide. *Infect. Immun.* 1999, 67, 1353–1358.

ZHANG, L.; ROZEK, A.; HANCOCK, R.E. Interaction of cationic antimicrobial peptides with model membranes. *J. Biol. Chem.* 2001, 276, 35714–35722.

ZHANG, Y.M.; ROCK, C.O. Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *J. Lipid Res.* 2009, 50, S115–S119.

ZHAO, X.; WU, H.; LU, H. et al. Lamp: A database linking antimicrobial peptides. PLoS One 2013.

ZHAO, C.; NGUYEN, T.; LIU, L. et al. Gallinacin-3, an inducible epithelial b-defensin in the chicken. Infect Immun 2001; 69: 2684–2691.

ZHOU, Y.S.; WEBB, S.; LETTICE, L. et al. Partial deletion of chromosome 8 b-defensin cluster confers sperm dysfunction and infertility in male mice. PLoS Genet 2013; 9: 1003826.

ZOU, J.; MERCIER, C.; KOUSSOUNADIS, A. et al. Discovery of multiple beta defensin like homologues in teleost fish. Mol. Immunol. 2007; 44: 638- 647.

Anexo**FICHA DE DERMATOLOGIA**

IDADE: _____

QUEIXA PRINCIPAL: _____

INÍCIO DA LESÃO: _____

PRURIDO: _____

MEDICAÇÃO USADA: _____

BANHOS: _____

ACESSO À RUA: _____

CONTROLE PARASITÁRIO: _____

CONTACTANTES: _____

HABITAT: _____

PRODUTOS DE LIMPEZA: _____

LOCAL ONDE DORME: _____

PISO: _____

USA ROUPINHAS: _____

CARPETE / TAPETES: _____

TEMPERAMENTO: _____

CASTRADO (A): _____

ALIMENTAÇÃO: _____

ACESSO À ÁGUA: _____

CUIDADOS DE ORDEM GERAL/VACINA/VERMÍFUGO: _____

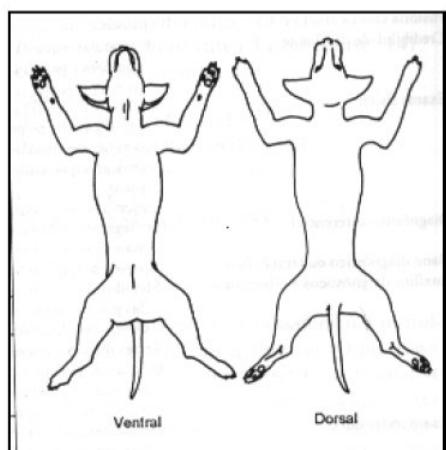
OUTROS SISTEMAS: _____

EXAME CLÍNICO: _____

T° _____

ECTOSCOPIA: _____

LESÃO: _____

**Lesões primárias**

- Mácula
- Pápula
- Placa
- Vesícula
- Pústula
- Nódulo
- Tumor
- Eritema
- Cisto

Lesões secundárias

- Comedos
- Colaretes
- Descamação
- Crosta
- Escoriação
- Erosão
- Úlcera
- Liqueinificação
- Hiperceratose
- Hiperpigmentação
- Hipopigmentação
- Alopecia
- _____

- | |
|-------------------------------------|
| <input type="checkbox"/> Pulgas |
| <input type="checkbox"/> Carrapatos |

ALTERAÇÕES NÃO DERMATOLÓGICAS: _____

OBSERVAÇÕES DURANTE A CONSULTA: _____

EXAMES COMPLEMENTARES: _____

DIAGNÓSTICO PROVISÓRIO: _____

DIAGNÓSTICO DEFINITIVO: _____

TRATAMENTO: _____

DATA DO RETORNO: _____