

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in  
MEDICINA VETERINARIA

L'IMMUNITA' CELLULO – MEDIATA NELLA  
DERMATITE ATOPICA CANINA:  
RECENTI ACQUISIZIONI E IMPLICAZIONI  
TERAPEUTICHE

Relatore: Dott. Michele Berlanda  
Correlatore: Dott.ssa Helen Poser

Laureanda: Carlotta Valente  
Matricola n. 1031155

ANNO ACCADEMICO 2015-2016







## Sommario

|   |           |
|---|-----------|
| <b>INTRODUZIONE</b> .....   | <b>10</b> |
| <b>1 ANATOMIA DELLA CUTE</b> .....  | <b>14</b> |
| <b>1.1 STRUTTURA DELL'EPIDERMIDE</b> .....  | <b>15</b> |
| 1.1.1 Strato basale .....   | 15        |
| 1.1.2 Strato spinoso .....  | 16        |
| 1.1.3 Strato granuloso .....  | 16        |
| 1.1.4 Strato lucido .....   | 16        |
| 1.1.5 Strato corneo .....   | 16        |
| <b>1.2 GIUNZIONE DERMO - EPIDERMICA</b> .....   | <b>18</b> |
| <b>1.3 STRUTTURA DEL DERMA</b> .....  | <b>18</b> |
| <b>2 IMMUNOLOGIA</b> .....  | <b>20</b> |
| <b>2.1 IMMUNITA' "INNATA" NON SPECIFICA</b> .....   | <b>21</b> |
| <b>2.2 IMMUNITA' ACQUISITA SPECIFICA</b> .....  | <b>21</b> |
| 2.2.1 IMMUNITA' UMORALE .....   | 22        |
| 2.2.2 IMMUNITA' CELLULO - MEDIATA .....   | 22        |
| 2.2.3 REAZIONI DI IPERSENSIBILITA' .....  | 24        |
| <b>2.3 SISTEMA IMMUNITARIO DELLA CUTE (SKIN IMMUNE SYSTEM o SIS)</b> .....                        | <b>26</b> |
| <b>2.4 ELEMENTI E CELLULE DEL SISTEMA IMMUNITARIO CUTANEO</b> .....                               | <b>28</b> |
| 2.4.1 CITOCHINE .....   | 28        |
| 2.4.2 CHERATINOCITI .....   | 29        |
| 2.4.3 LINFOCITI .....   | 30        |
| 2.4.4 CELLULE "KILLER" E "NATURAL KILLER" .....   | 33        |
| 2.4.5 MACROFAGI TISSUTALI .....   | 34        |
| 2.4.6 MASTOCITI .....   | 34        |
| 2.4.7 CELLULE DEL LANGHERANS .....  | 35        |
| 2.4.8 CELLULE ENDOTELIALI .....   | 35        |
| 2.4.9 GRANULOCITI .....   | 36        |
| <b>3 DERMATITE ATOPICA CANINA</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>3.1 INTRODUZIONE</b> .....   | <b>38</b> |
| <b>3.2 SINTOMI</b> .....  | <b>42</b> |
| <b>3.3 METODI DI VALUTAZIONE DELLA GRAVITA' DELLE LESIONI E DELL'INTENSITA' DEL PRURITO</b> ..... | <b>47</b> |
| 3.3.1 METODI DI VALUTAZIONE DELLA GRAVITA' DELLE LESIONI .....                                    | 47        |
| 3.3.2 METODI DI VALUTAZIONE DELL'INTENSITA' DEL PRURITO .....                                     | 50        |
| <b>3.4 EZIOPATOGENESI: CENNI GENERALI</b> .....   | <b>54</b> |
| <b>3.5 DIAGNOSI</b> .....   | <b>61</b> |
| 3.5.1 DIAGNOSI CLINICA .....  | 62        |
| 3.5.2 DIAGNOSI LABORATORISTICA .....  | 64        |
| 3.5.3 DIAGNOSI ISTOPATOLOGICA .....   | 69        |
| <b>3.6 CENNI DI TERAPIA GENERALE</b> .....  | <b>70</b> |
| <b>4 EZIOPATOGENESI: RUOLO DELL'IMMUNITA' CELLULO - MEDIATA</b> .....                             | <b>80</b> |
| <b>4.1 VIE DI ESPOSIZIONE E DI PROCESSAZIONE DELL'ANTIGENE</b> .....                              | <b>80</b> |
| <b>4.2 CASCATA INFIAMMATORIA E ANOMALIE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA</b> .....                      | <b>81</b> |

|  |            |
|--|------------|
| <b>4.3 ESPRESSIONE QUALI–QUANTITATIVA DEI PRINCIPALI ELEMENTI CELLULARI E MOLECOLARI IMPLICATI .....</b> | <b>84</b>  |
| 4.3.1 LINFOCITI .....  | 84         |
| 4.3.2 CITOCHINE E CHEMOCHINE .....   | 89         |
| 4.3.3 MOLECOLE PROTEICHE .....   | 96         |
| <b>4.4 CORRELAZIONE TRA UNA RISPOSTA IMMUNITARIA ALTERATA E LA GRAVITA' DELLA PATOLOGIA</b>              | <b>97</b>  |
| <b>5 APPROCCIO TERAPEUTICO IMMUNO – MODULATORE.....</b>  | <b>100</b> |
| <b>5.1 CICLOSPORINA.....</b>   | <b>100</b> |
| <b>5.2 TACROLIMUS .....</b>  | <b>109</b> |
| <b>5.3 OCLACITINIB .....</b>   | <b>111</b> |
| <b>5.4 INTERFERONI .....</b>   | <b>113</b> |
| <b>5.5 ANTICORPI MONOCLONALI.....</b>  | <b>116</b> |
| <b>5.6 IMMUNOTERAPIA ALLERGENE – SPECIFICA.....</b>  | <b>119</b> |
| 5.6.1 MECCANISMO D’AZIONE .....  | 119        |
| 5.6.2 VIE DI SOMMINISTRAZIONE.....   | 124        |
| 5.6.3 QUANDO ESEGUIRLA E PERCHE’? .....  | 125        |
| 5.6.4 PROTOCOLLO .....   | 126        |
| 5.6.5 SCELTA DEGLI ALLERGENI .....   | 129        |
| 5.6.6 EFFETTI COLLATERALI .....  | 130        |
| 5.6.7 EFFICACIA/BENEFICI.....  | 131        |
| 5.6.8 CONSIDERAZIONI .....   | 133        |
| 5.6.9 PROSPETTIVE FUTURE .....   | 134        |
| <b>6 PREVENZIONE.....</b>  | <b>136</b> |
| <b>CONCLUSIONI.....</b>  | <b>144</b> |
| <b>BIBLIOGRAFIA .....</b>  | <b>146</b> |

## INDICE DELLE ABBREVIAZIONI

|                  |  |
|------------------|--|
| ASIT             | Allergen-specific immunotherapy                    |
| CAD              | Canine Atopic Dermatitis                           |
| CADESI           | Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index |
| CCL              | Chemokine ligand                                   |
| CCR4             | Chemokine receptor type 4                          |
| CD               | Cluster of differentiation                         |
| CADLI            | Canine Atopic Dermatitis Lesion Index              |
| CLA              | Cutaneous lymphocyte – associated antigen          |
| FoxP3            | Forkhead box P3                                    |
| GM-CSF           | Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor   |
| ICAM-1           | Intercellular Adhesion Molecule 1                  |
| IDT              | Intradermoreaction                                 |
| Ig               | Immunoglobulin                                     |
| IL               | Interleukin  |
| ILIT             | Intralymphatic immunotherapy                       |
| INF- $\gamma$    | Interferon- $\gamma$                               |
| MAPK             | Mitogen-activated protein kinase                   |
| MHC              | Major Histocompatibility Complex                   |
| PGE2             | Prostaglandin E2                                   |
| PICAD            | Pruritus Index for Canine Atopic Dermatitis        |
| PVAS             | Pruritus Visual Analog Scale                       |
| rCalFN- $\gamma$ | Recombinant canine interferon- $\gamma$            |
| rfeIFN- $\omega$ | Recombinant feline interferon- $\omega$            |
| SALT             | Skin - associated lymphoid tissue                  |
| SCIT             | Subcutaneous immunotherapy                         |
| SCORAD           | Scoring Atopic Dermatitis                          |
| SERPINB4         | Serpin Family B Member 4                           |
| SIS              | Skin-immune system                                 |
| SLIT             | Sublingual immunotherapy                           |
| SOCS             | Suppressor of cytokine signalling                  |
| SPINK5           | Serine protease inhibitor Kazal-type 5             |
| STAT             | Signal transducer and activator of transcription   |

|               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| TARC          | Thymus Activation Regulated Chemokine |
| TIMP1         | Metallopeptidase inhibitor            |
| Tcr           | T cell receptor                       |
| Th            | Lymphocyte T helper                   |
| TNF- $\alpha$ | Tumor Necrosis Factor- $\alpha$       |
| TNF- $\beta$  | Tumor Necrosis Factor- $\beta$        |
| T reg         | Regulatory T cell                     |
| TSLP          | Thymic Stromal Lymphopoietin          |
| VCAM-1        | Vascular cell adhesion protein 1      |





## INTRODUZIONE

Tra le patologie di interesse dermatologico più diffuse nella popolazione canina è d'importanza fondamentale la dermatite atopica; la sua incidenza ha subito un notevole aumento negli ultimi trent'anni, diventando uno dei motivi dermatologici più frequenti per i quali i proprietari portano il loro cane in visita.

A causa del suo sintomo principale, il prurito, ed a causa delle diverse manifestazioni cliniche con cui la patologia può manifestarsi, il *discomfort* che viene provato dal paziente è elevatissimo.

L'enorme interesse nello studio della dermatite atopica canina (CAD) è dovuto anche alle grandi potenzialità del cane come modello per la specie umana: è stato infatti appurato che molti sono gli aspetti che accomunano le due specie e le conoscenze ottenute nell'ambito della medicina veterinaria hanno contribuito di molto ad ampliare ciò che si sapeva sulla dermatite atopica umana. Anche nell'uomo tale malattia è causa di enormi disagi ed è ritenuta, nelle sue forme più gravi, una delle principali patologie invalidanti in ambito professionale.

Scoperta e studiata da non più di un centinaio d'anni, ancora oggi sono numerosi gli aspetti non del tutto compresi.

La dermatite atopica è una patologia di natura allergica e infiammatoria, la cui eziopatogenesi multifattoriale è il risultato dell'interazione tra la componente genetica, immunologica ed ambientale.

La complessità e la difficoltà nel comprendere le cause che la scatenano o la esacerbano rende difficile, una volta diagnosticata, procedere con un iter terapeutico mirato ed efficace.

È infatti richiesto che il paziente sia seguito con costanza dal medico veterinario, il quale si deve porre nella condizione di approcciarsi di volta in volta in modo diverso, seguendo degli iter terapeutici costruiti sulla base delle necessità e delle condizioni cliniche del soggetto, costruendo inoltre con il proprietario un rapporto di collaborazione mirato a gettare le basi per una gestione a lungo termine della patologia.

Anche da parte del proprietario è richiesta costanza e impegno nella gestione del proprio animale domestico: il veterinario deve riuscire a trasmettere il messaggio che, nonostante possano non esserci miglioramenti ingenti ed immediati dal punto di vista clinico, l'importante è che vengano somministrate le terapie prescritte regolarmente prestando attenzione a seguire le linee guida che di volta in volta il veterinario prescrive. D'altro canto è anche fondamentale evitare che le terapie, qualora apportino un miglioramento clinico precoce ed evidente, come ad esempio nel caso del

trattamento con antibiotici di infezioni secondarie, vengano sospese prematuramente, perché questo favorirebbe la comparsa di precoci recidive.

La migliore gestione terapeutica è quella multimodale, basata cioè sull'utilizzo di protocolli terapeutici differenti in modo tale che di ognuno vengano massimizzati i benefici e ridotti al minimo i rischi.

Ad oggi, i progressi che si sono ottenuti relativamente alle conoscenze dell'eziopatogenesi della dermatite atopica sono stati enormi: dalle scoperte relative alle alterazioni delle caratteristiche della barriera cutanea ai meccanismi immunologici alla base dell'insorgere della patologia e delle sue manifestazioni cliniche.

L'importanza di arrivare a delineare un quadro preciso e approfondito relativamente ai vari fattori, che nel complesso costituiscono le cause scatenanti la patologia, risulta di rilevanza fondamentale per formulare poi delle terapie innovative e più efficaci rispetto alle precedenti.

L'obiettivo finale potrebbe essere quello di riuscire, anche mediante le nuove biotecnologie, a lavorare sull'aspetto familiare ed ereditabile della patologia, qualora possibile, prevenendone l'insorgenza.

Lo scopo di questa tesi è quello di mettere in evidenza le nuove e recenti acquisizioni relative alla dermatite atopica canina attraverso la revisione dei dati forniti dalla letteratura scientifica, in particolare ponendo maggiore attenzione al ruolo dell'immunità cellulo–mediata nell'eziopatogenesi della patologia e delle possibilità terapeutiche mirate a ripristinare un equilibrio immunologico alterato.

## ABSTRACT

Canine atopic dermatitis is a very common condition which affects many dogs.

Since the last 30 years, its incidence has increased, becoming the main reason why dogs are presented to veterinarians.

The great discomfort felt by the patient is due to pruritus – the main symptom – and by all the others clinical manifestations.

The dog could be an experimental model to study human atopic dermatitis: the informations achieved through the veterinary studies have been helpful to enlarge knowledge in human medicine. Atopic dermatitis in human causes many problems and, in its severe form, is considered as one of the most common occupational disabilities.

Nowadays, several aspects of this disease are still unknown, even though a lot of studies has focused on it.

Atopic dermatitis is an inflammatory and pruritic allergic disease which multifactorial pathogenesis is the result of interaction between genetic, immunologic and environmental factors.

Due to the complexities of atopy's causes, might be difficult planning a specific and effective therapeutic protocol.

During the treatment, the collaboration between the veterinarian and the owner is fundamental for its success: the former should adjust the therapy to the specific case, following patient's necessities and considering its clinical conditions; the latter should apply veterinarian's prescriptions rigorously and constantly.

Many aspects could be controversial. First, the owners find difficult to understand that atopic dermatitis requires long term treatment. Second, the lack of early clinical improvement demotivates them to proceed; third, some therapeutic approaches allow to obtain immediate results so that owners stop them too early, increasing the risk of premature relapse.

Multimodal approach is the treatment of choice for canine atopic dermatitis. This approach is based on the combination of different protocols to reduce adverse events and to maximize benefits.

Significant progresses have been gained about the pathogenesis of the disease: abnormalities of skin barrier and immunological defects are the main alterations which cause or flare atopic dermatitis and its clinical manifestations.

The final goal is the diffusion of the new therapeutic protocol, more innovative and effective than the previous one: this could be possible only after the complete comprehension of all the factors implicated and responsible of the disease.

At last, through the new biotechnologies, should be put more attention on the prevention, working on the familiar and hereditary aspect of the atopic dermatitis.

The aim of this thesis is to evidence the new and recent acquisition about canine atopic dermatitis through the revision of data taken by scientific literature, focusing on the role of cell-mediated immunity in the pathogenesis of the disease and reviewing all the therapeutic strategies targeted to restore an abnormal immunologic balance.

# 1 ANATOMIA DELLA CUTE

La cute è uno degli apparati fondamentali per la sopravvivenza di un organismo e svolge numerose funzioni essenziali.

1. Protegge nei confronti di insulti esterni;
2. assicura una moderata dispersione di liquidi, elettroliti e macromolecole;
3. l'elasticità della cute permette il movimento corporeo;
4. la presenza degli annessi cutanei garantisce il mantenimento della temperatura corporea e la regolazione della pressione sanguigna;
5. favorisce la sintesi di vitamina D dal di - idro colesterolo;
6. svolge una funzione sensoriale: è un organo primario per il tatto, la pressione, il dolore, il prurito, il caldo e il freddo;
7. funge da deposito di lipidi, acqua, vitamine, carboidrati, proteine e altre sostanze nutritive;
8. la presenza dei cheratinociti, linfociti e cellule di Langherans permettono alla cute di svolgere una funzione antimicrobica e antimicotica e di prender parte all'immunità innata e adattativa;
9. favorisce il processo della pigmentazione che aiuta a determinare il colore del mantello e della cute stessa, prevenendo anche il danno derivante dall'esposizione ai raggi solari;
10. facilita la secrezione e l'escrezione di sostanze;
11. è un indicatore dello stato di salute del soggetto, come specchio anche di eventuali patologie sistemiche;
12. contribuisce infine alla definizione di un'identità fisica e sessuale (Miller et al., 2013).

La cute è l'organo più esteso del corpo, costituito da strati ed elementi diversi: l'epidermide, il derma, il sottocute (ipoderma) e gli annessi cutanei (follicoli piliferi, ghiandole sebacee, ghiandole sudoripare e altre ghiandole).

Secondo la zona corporea considerata e la specie in questione la struttura istologica della cute è variabile: la cute coperta da peli è più spessa nel dorso dell'animale e nelle zone laterali degli arti, più sottile nel ventre e nelle aree mediali delle cosce, così come l'epidermide.

Mentre l'epidermide delle superfici prive di pelo come naso e cuscinetti digitali è più spessa (McGavin, 2008).

## **1.1 STRUTTURA DELL'EPIDERMIDE**

L'epidermide è lo strato cutaneo più esterno ed è formato in gran parte da cheratinociti (circa 85% delle cellule epidermiche), si possono poi trovare in misura minore melanociti (circa il 5%), cellule di Langherans (dal 3% all'8%) e infine le cellule di Merkel (circa il 2%).

L'epidermide della cute è formata da cinque strati principali, dal più esterno al più interno: lo strato corneo (stratum corneum), lo strato lucido (stratum lucidum), lo strato granuloso (stratum granulosum), lo strato spinoso (stratum spinosum) e infine lo strato basale (stratum basale) (Miller et al., 2013).

Lo strato lucido si riscontra solo a livello di cute non rivestita di pelo (soprattutto nel cuscinetto digitale) (McGavin, 2008).

### **1.1.1 Strato basale**

Lo strato più profondo è quello basale costituito da un unico strato di cellule, da colonnari a cuboidali, situate sulla lamina basale che separa il derma dall'epidermide.

La maggior parte delle cellule in questo strato è costituita da cheratinociti che si replicano continuamente e si spostano negli strati sovrastanti per sostituire le cellule epidermiche che una volta arrivate allo strato corneo esfoliano.

Questa funzione proliferativa è tipica solo di alcuni cheratinociti dello strato basale, uniti tra loro da desmosomi, mentre altri svolgono la funzione di ancoraggio al derma sottostante al quale sono legati mediante emidesmosomi (Miller et al., 2013).

Frammisti alle cellule basali troviamo altri tipi cellulari, come i melanociti, alle volte riscontrabili anche tra le cellule più profonde dello strato spinoso e responsabili della colorazione cutanea e del pelo grazie alla produzione della melanina; le cellule del Langherans che si trovano a livello di strato basale, spinoso, granuloso ma soprattutto soprabasale, appartenenti alla categoria dei fagociti mononucleati provenienti dal midollo osseo la cui funzione è quella di processare e presentare l'antigene ai linfociti T sensibilizzati; infine le cellule di Merkel, di tipo neuroendocrino presenti sia nelle zone cutanee ricoperte da peli che non, soprattutto però a livello di labbra e dita e nella parte esterna dei follicoli piliferi. I granuli che sono presenti al loro interno sono simili a dei neurotrasmettitori e come funzione secondaria fungono anche da meccanoettori a lento adattamento (McGavin, 2008).

### **1.1.2 Strato spinoso**

Lo strato spinoso è di spessore variabile, a seconda della regione anatomica considerata, ed è formato da cellule prevalentemente poliedriche o cuboidali appiattite, lievemente basofile, nucleate ed unite tra loro e alle cellule dello strato basale sottostante mediante desmosomi (Miller et al., 2013)

Le cellule delle lamine più superficiali di questo strato contengono piccoli organuli ricoperti da membrana, definiti granuli lamellari (Dellmann, 2000).

### **1.1.3 Strato granuloso**

Lo strato granuloso è presente in spessore variabile nelle aree ricoperte da pelo, mentre è abbastanza spesso (da quattro a otto strati cellulari) nelle aree che ne sono prive.

Le cellule in questo strato sono appiattite, basofile, con nuclei piccoli ma contenenti nel citoplasma grandi granuli cheratoialini, privi di membrana, sintetizzati in questo strato.

Questi granuli sono l'equivalente morfologico della pro-filaggrina, proteina strutturale precursore della filaggrina, dei filamenti di cheratina e della loricrina (Miller et al., 2013).

Infine, all'interno delle cellule sono presenti i granuli lamellari, che migrando attraverso la membrana plasmatica liberano per esocitosi nello spazio intercellulare, tra lo strato corneo e lo strato granuloso, la matrice lipidica (più di frequente ceramidi, colesterolo, acidi grassi e anche esteri del colesterolo) che ricopre la membrana delle cellule dello strato corneo (Dellmann, 2000).

### **1.1.4 Strato lucido**

Nelle zone corporee in cui è presente, ossia quelle più spesse e prive di pelo, è una sottile linea traslucida costituita da più lamine di cellule dense, cheratinizzate, prive di nucleo e organuli cellulari (Dellman, 2000).

In questo strato troviamo anche una sostanza semifluida e con proprietà rifrangenti che è l'eleidina (Miller et al., 2013).

### **1.1.5 Strato corneo**

È lo strato più esterno dell'epidermide formato da più strati di cellule piatte cheratinizzate, definite corneociti (McGavin, 2008).

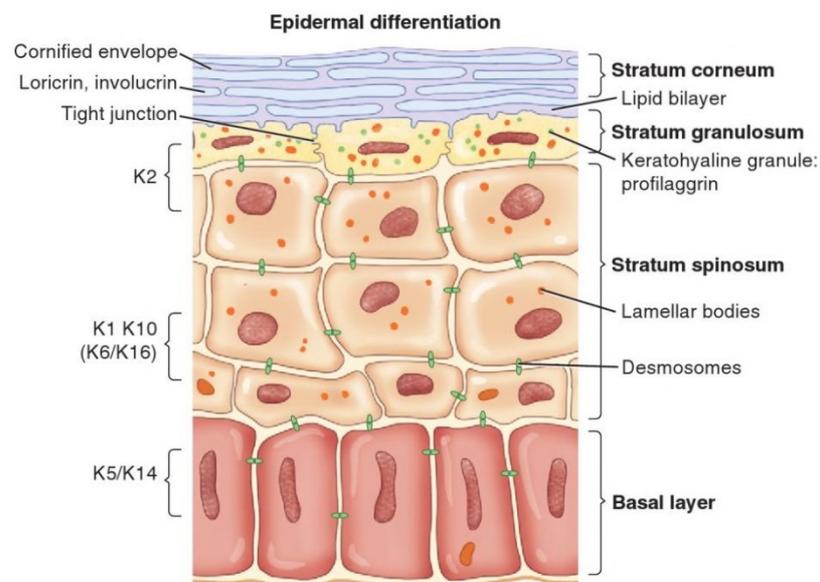
Questo strato è omogeneo e le cellule non presentano nuclei né organuli citoplasmatici. Le cellule sono altamente organizzate, molto unite tra loro, senza interstizio evidente tra l'una e l'altra e sono di forma poligonale. Questa struttura è funzionale a minimizzare le perdite di liquidi.

I corneociti sono immersi in una matrice lipidica che s'insinua tra le cellule, derivante dai granuli lamellari, finalizzata ad impedire l'ingresso di sostanze dannose e l'uscita di sostanza utile (Dellmann, 2000).

Una volta finito il processo maturativo che, eccezion fatta per alcune patologie, è di circa un mese, i cheratinociti raggiungono lo strato corneo, dove vengono esfoliati costantemente (McGavin, 2008).

Il processo di desquamazione è compensato dall'attività di proliferazione che avviene nello strato basale, finalizzato a mantenere costante lo spessore cutaneo (Miller et al., 2013).

Le porzioni più superficiali di cheratinociti che si distaccano continuamente prendono il nome di strato disgiunto (Dellmann, 2000).



**Figura 1. Strati cellulari dell'epidermide** (J Dtsch Dermatol Ges, 2009).

## **1.2 GIUNZIONE DERMO - EPIDERMICA**

Tra il derma e l'epidermide troviamo la membrana basale, importante mezzo di ancoraggio tra i primi due strati della cute. È di forma irregolare a livello delle aree cutanee senza pelo, dove si trovano delle proiezioni epidermiche che si interdigitano con le papille dermiche, conferendo maggiore resistenza. Nelle aree invece coperte di pelo la membrana basale si presenta più liscia perché l'area dermo-epidermica è rafforzata dalla presenza di follicoli piliferi (McGavin, 2008).

La membrana basale può essere suddivisa in quattro componenti, andando dall'epidermide al derma: la membrana plasmatica delle cellule dello strato basale, la lamina lucida, la lamina densa e l'area densa sublaminaire.

Svolge diverse funzioni:

1. mantiene l'epidermide attiva e funzionante;
2. mantiene l'architettura tissutale;
3. ripara le ferite;
4. funziona come una barriera;
5. regola il trasporto di nutrienti tra l'epitelio e il tessuto connettivo (Miller et al., 2013).

## **1.3 STRUTTURA DEL DERMA**

Il derma o corium fa parte del tessuto connettivo corporeo. È costituito da fibre insolubili (collagene ed elastina) e polimeri solubili (proteoglicani e acido ialuronico) atti a sopportare lo stress dei movimenti. Gran parte della matrice extracellulare dermica è sintetizzata dai fibroblasti. È una struttura di sostegno per i follicoli piliferi, le ghiandole, i vasi ed i nervi (Miller et al., 2013).

Si distinguono un derma superficiale ed un derma profondo. Il derma superficiale accoglie la parte superiore del follicolo pilifero e delle ghiandole sebacee. Il derma profondo sostiene la parte inferiore del follicolo pilifero e le ghiandole apocrine. Qui inoltre troviamo le fibre muscolari scheletriche dei muscoli cutanei, responsabili del movimento volontario della cute.

Nel derma in prossimità dei follicoli piliferi si trovano cellule muscolari lisce considerate muscoli erettori del pelo, responsabili dei fenomeni dell'orripilazione (McGavin, 2008).

Le cellule che si ritrovano più di frequente a questo livello sono: fibrociti, mastociti, adipociti, linfociti, plasmacellule e macrofagi (Dellmann, 2000).

L'irrorazione cutanea si basa su arterie che danno luogo a tre plessi vascolari: quello profondo che irrorata sottocute, porzioni profonde dei follicoli e ghiandole apocrine; quello medio che irrorata le ghiandole sebacee, le porzioni intermedie dei follicoli e i muscoli erettori del pelo; infine quello superficiale che irrorata le porzioni superficiali dei follicoli e l'epidermide.

I capillari linfatici originano nel derma superficiale per arrivare a un plesso sottocutaneo fino a raggiungere canali di dimensioni maggiori che poi arrivano a livello dei linfonodi periferici. (McGavin, 2008).

## 2 IMMUNOLOGIA

Da un punto di vista meccanico, la cute è la miglior barriera di protezione dell'organismo, essendo la prima componente con cui qualsiasi insulto esterno si interfaccia. Tuttavia, può anche essere parte attiva di un processo immunologico di protezione dell'individuo (Miller et al., 2013).

Ogni organismo possiede elaborati sistema di difesa, che nel loro insieme prendono il nome di sistema immunitario, finalizzati a proteggerlo da insulti esterni di varia natura, che potenzialmente possono portare a malattia.

I primi meccanismi di difesa sono quelli innati non specifici, cioè non in grado di discriminare caratteristiche molecolari degli agenti eziologici di malattia. Tali meccanismi sfruttano le caratteristiche chimico - fisiche dei tessuti stessi, cellule specializzate (granulociti) e i fattori umorali.

Se questa prima linea di protezione è inefficace, subentra un secondo sistema di difesa, la cosiddetta immunità adattativa specifica, che prevede la mobilitazione dei macrofagi che a loro volta coinvolgono e attivano la famiglia dei linfociti mediante specifici meccanismi molecolari.

A questo punto conseguono due possibili tipi di risposte: umorale o cellulo - mediata.

Nel primo caso, i linfociti B producono anticorpi, macromolecole glicoproteiche solubili, che reagendo con l'antigene ne determinano l'eliminazione.

Nel secondo caso, i linfociti T citotossici possono eliminare l'antigene o direttamente o mediante l'attivazione di altre cellule.

La tipologia di risposta immunitaria che si attiva dipende dal tipo di pericolo presente in quel momento: sovente i differenti sistemi interagiscono e operano in sinergia l'uno con l'altro ma può esserci un'esclusiva risposta umorale come ad esempio nel caso di tossine o microrganismi extracellulari, così come una risposta unicamente di tipo cellulo-mediata in presenza di microrganismi intracellulari, di cellule neoplastiche o di tessuti trapiantati.

Il sistema immunitario è formato da numerosi elementi cellulari diversi per natura, origine, localizzazione e la cui funzione è di intervenire nella difesa dell'organismo contro qualsiasi insulto che ne possa prevenire l'integrità.

Le cellule cardine sono i linfociti B e i linfociti T a cui si affiancano i neutrofili e i macrofagi. La grande differenza funzionale è che i primi sono ad azione specifica e svolgono un'attività maggiore

se già entrati a contatto con l'antigene, mentre i secondi non necessitano di una pregressa sensibilizzazione (Poli et al., 2005).

## **2.1 IMMUNITA' "INNATA" NON SPECIFICA**

L'immunità innata consiste in una risposta primitiva che riconosce ed elimina eventuali insulti esterni, senza la necessità che ci sia un recettore antigene – specifico.

La prima strategia messa in atto per impedire che vi sia attecchimento di microrganismi è data dalla barriera dello strato corneo che crea una superficie antimicrobica formata da peptidi antibatterici ( $\beta$ -defensine e catelecidine) e acidi grassi. Qui si trova anche la normale flora batterica cutanea che, oltre a competere con le sostanze nutritive con i microrganismi patogeni, produce sostanze antimicrobiche finalizzate a impedire che questi ultimi aderiscano alla cute.

Nel momento in cui avviene un'abrasione o una lesione cutanea questa prima linea di difesa è affiancata da un altro tipo di difesa innata rappresentata dai macrofagi tissutali e da altre cellule immunitarie che, tramite i loro recettori di superficie, si legano agli antigeni dei patogeni interessati. L'attivazione di macrofagi, cellule dendritiche e dei linfociti stimola il rilascio di citochine e chemochine che richiamano anche neutrofili e monociti nella sede dell'infezione e che attivano la cascata dell'acido arachidonico, coinvolta in tutti i meccanismi infiammatori.

Una volta attivata, la risposta immunitaria innata permette di innescare la risposta adattativa. È una linea di difesa priva di memoria immunologica che quando è bypassata dai patogeni rende necessaria l'attivazione della linea di difesa successiva (McGavin, 2008).

## **2.2 IMMUNITA' ACQUISITA SPECIFICA**

Se l'immunità innata si sviluppa velocemente, non vale lo stesso per quella acquisita perché l'espansione clonale linfocitaria che la caratterizza richiede tempi maggiori per essere completata.

La risposta immunitaria adattativa è innescata da uno stimolo tale per cui le cellule processanti e presentanti l'antigene, cellule del Langherans epidermiche e cellule dendritiche dermiche, lo fagocitano, lo processano e lo presentano sulla loro superficie.

Queste poi migrano a livello dei linfonodi regionali cutanei, dove lo presentano ai linfociti T non sensibilizzati, naïve.

I linfociti attivati esprimono quindi i recettori che consentono loro di tornare nella cute (“homing”) e interagiscono con le molecole di adesione, prodotte sotto stimolo di citochine, rilasciate dai vasi dermici della sede iniziale dello stimolo, sulle cellule endoteliali. Così i linfociti rilevano la sede iniziale di penetrazione del patogeno.

Solo dopo un secondo stimolo, i linfociti T cominciano il processo di espansione clonale e attivano i conseguenti meccanismi di protezione (Figura 2) (McGavin, 2008).

### **2.2.1 IMMUNITA' UMORALE**

L'immunità umorale è la risposta difensiva che si manifesta tramite la sintesi di anticorpi da parte dei linfociti B dopo la loro differenziazione in plasmacellule. L'azione anticorpale si manifesta mediante il legame con l'antigene per mezzo dei siti combinatori presenti sulla loro struttura.

Per ogni antigene esiste un solo clone linfocitario specifico con cui può interagire e nel caso di antigeni timo - dipendenti è necessario vi sia assenso da parte dei linfociti T helper 2, a loro volta attivati da cellule presentanti l'antigene, affinché i linfociti B possano sviluppare una sufficiente reazione anticorpale. Questo “consenso” o avviene per contatto diretto delle due cellule o per liberazione di citochine da parte dei linfociti T, in particolare dell'IL-4.

Il linfocita B dopo la stimolazione si divide in più cloni linfocitari differenziabili in due categorie: le plasmacellule atte a produrre immunoglobuline la cui specificità antigenica copia quella del recettore originale e le cosiddette “cellule della memoria” che si attiveranno producendo anticorpi a seguito di una seconda stimolazione con l'antigene.

La prima volta che un linfocita B incontra l'antigene presenta sulla sua superficie IgM che poi, secondo la localizzazione tissutale e il tipo di reazione che si scatena, può commutare a IgA, IgG o IgE. Ad esempio, nel caso di un soggetto atopico, predisposto quindi ad una condizione allergica, la commutazione è per lo più verso le IgE (Poli et al., 2005).

### **2.2.2 IMMUNITA' CELLULO - MEDIATA**

È la risposta difensiva che si realizza tramite l'attivazione e l'espansione clonale di cellule citotossiche appartenenti alla famiglia dei linfociti T che distruggono ed eliminano l'antigene attraverso meccanismi diretti o indiretti.

I linfociti T si legano ad un antigene tramite recettore e formano dei cloni immunocompetenti sia nel tessuto in cui l'antigene è localizzato sia nei linfonodi dove l'antigene viene trasportato dai macrofagi.

Le cellule linfocitarie coinvolte in questi meccanismi sono:

1. cellule regolatrici fra i quali i linfociti T helper che regolano l'intensità della risposta immunitaria e mediano tra il tipo di immunità cellulo-mediata ed umorale e i linfociti T suppressor che regolano la produzione di anticorpi;
2. cellule della memoria che permangono quiescenti per periodi variabili a seguito di una prima stimolazione antigenica, fintanto che non ricompare l'antigene e quindi possono attivarsi contro lo stesso;
3. cellule effettrici ossia linfociti T citotossici che si scagliano contro le cellule bersaglio, debellandole.

Affinché la risposta immunitaria si attivi è fondamentale che sia le cellule infettate che quelle presentanti l'antigene associno frammenti del patogeno, dopo che è stato processato, alle molecole del MHC sulla loro superficie.

I macrofagi dopo la fagocitosi di materiale extracellulare migrano ai linfonodi, dove presentano l'antigene processato e associato alle molecole del MHC di tipo 2 ai linfociti, in particolare ai T helper, che daranno avvio al processo finalizzato alla distruzione e all'eliminazione dell'antigene e delle cellule da questo infettate.

Oltre ai macrofagi, anche i linfociti B per mezzo delle immunoglobuline di superficie possono processare e presentare l'antigene, rivolgendolo sempre ai linfociti T helper; questi mediante l'IL-4 stimolano il linfocita B ad una produzione anticorpale potenziata.

Invece, per eliminare microrganismi intracellulari sono richiamati i linfociti T citotossici: le cellule infettate producono molecole MHC di classe 1 che si legano a frammenti del patogeno esponendoli nella loro superficie e richiamando così le cellule linfocitarie (Poli et al., 2005).

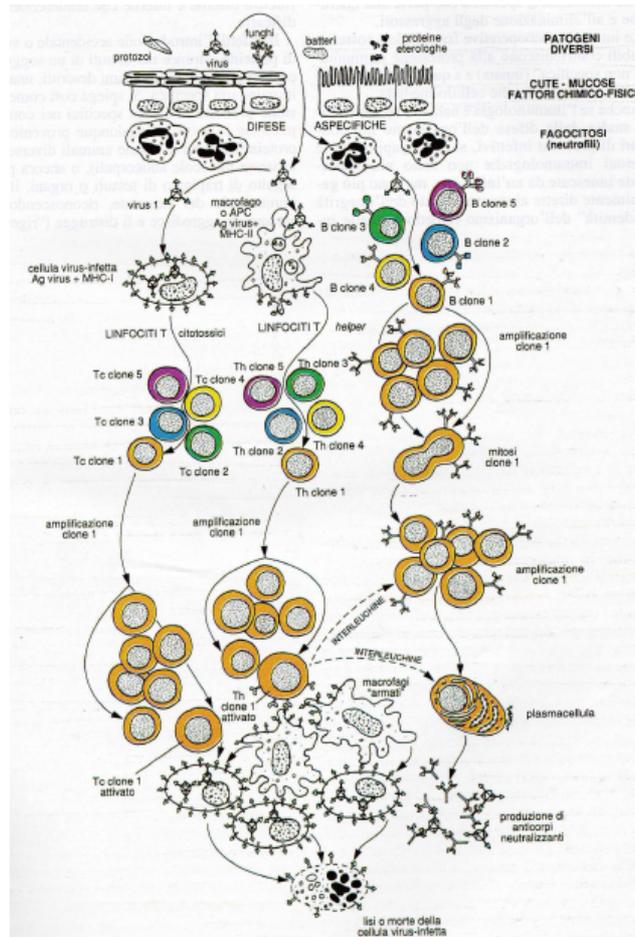


Figura 2. Sequenza di attivazione del sistema immunitario (Poli et al., 2005).

### 2.2.3 REAZIONI DI IPERSENSIBILITA'

L'attivazione del sistema immunitario può comportare talvolta una risposta immunologica inappropriata; questo fenomeno prende il nome di reazione di ipersensibilità. Di questo ne sono descritte quattro tipologie (Day, 1999).

In alcune condizioni patologiche, come nel caso della dermatite atopica, si può assistere ad una combinazione di più reazioni, in questo caso specifico della reazione di tipo 1 e di tipo 4 (Miller et al., 2013).

1. L' ipersensibilità di tipo 1 (anafilattica, immediata) è una risposta immunitaria che può ritenersi protettiva nel caso di penetrazione di agenti a carico delle mucose ed è patologica come risposta all'esposizione di allergeni ambientali che attraversano la cute, il tratto respiratorio o gastroenterico nelle condizioni allergiche. Consiste in una prima fase di sensibilizzazione all'allergene che può avvenire in periodi di tempo lunghi e che esita in una risposta che coinvolge i linfociti T helper 2. La liberazione di IL-4 e IL-13 comporta una

stimolazione dei linfociti B che produrranno IgE che a loro volta inducono la degranulazione dei mastociti.

Esita nella liberazione di potenti fattori dell'inflammazone che portano a condizioni di edema, prurito e broncocostrizione.

Questo primo passaggio prende il nome di ipersensibilità immediata a cui segue, 6-12 ore dopo, una fase tardiva, con accumulo di eosinofili, macrofagi e cellule T (Day, 1999).

2. L'ipersensibilità di tipo 2 consiste nella distruzione di cellule presentanti l'antigene a seguito del legame con una IgG o IgM (Day, 1999).
3. Nella reazione di ipersensibilità di tipo 3 si realizza la formazione e il deposito di immunocomplessi di antigeni e anticorpi con successiva fissazione del complemento e infiammazione localizzata. A seconda che prevalga la componente anticorpale o antigenica c'è un tipo diverso di immunocomplesso che si crea: con un eccesso anticorpale, l'immunocomplesso rimane localizzato nel tessuto dove è avvenuta l'esposizione all'antigene. Se viceversa, c'è un eccesso di antigeni, abbiamo la possibilità che questi si formino e si depositino a livello capillare, soprattutto del rene, delle giunzioni, degli occhi o della cute (Day, 1999).
4. L'ipersensibilità di tipo 4 coinvolge i linfociti T helper 1 e CD8 e si parla di ipersensibilità ritardata dal momento che ci vogliono circa 24-72 h per l'attivazione dei linfociti.  
Ci sono due reazioni da considerare: la prima prevede la stimolazione con un antigene solubile e riguarda il riconoscimento di questo da parte di un linfocita T helper 1 con conseguente rilascio di INF- $\gamma$ . Il secondo meccanismo riguarda la distruzione citotossica di cellule target dopo il riconoscimento da parte dei Th1 o CD8 (Day, 1999).

Accanto a queste quattro categorie ci sono altri due tipi di reazioni, ossia quella di fase ritardata nella reazione di ipersensibilità immediata e quella cutanea basofila.

Nel primo caso abbiamo una reazione che avviene a 4-8 ore dall'inizio della reazione dipendente dai mastociti e permane per 24 ore, a differenza delle reazioni di ipersensibilità di tipo 1.

Si presenta con un iniziale infiltrato di neutrofili ed eosinofili cui segue una dominanza di cellule mononucleari. Si sviluppa nel caso di ipersensibilità al morso di pulce e nei soggetti atopici.

Mentre l'ipersensibilità cutanea basofila è mediata dai linfociti T o dagli anticorpi IgE o IgG. Si caratterizza per un infiltrato basofilo e per la deposizione di fibrina. Avviene a 12 ore dall'iniezione di allergene e raggiunge il suo picco in 24-72 ore (Miller et al., 2013).

|  | CAD | RAC | DAP | IPERSENSIBILITA' DA CONTATTO | PEMFIGO | LUPUS ERITEMATOSO | REAZIONI AVVERSE AI FARMACI |
|--|-----|-----|-----|------------------------------|---------|-------------------|-----------------------------|
| <b>IPERSENSIBILITA' DI TIPO 1</b>                | ✓   | ✓   |     |                              |         |                   | ✓                           |
| <b>IPERSENSIBILITA' DI TIPO 2</b>                |     |     |     |                              | ✓       |                   | ✓                           |
| <b>IPERSENSIBILITA' DI TIPO 3</b>                |     |     |     | ✓                            |         | ✓                 | ✓                           |
| <b>IPERSENSIBILITA' DI TIPO 4</b>                |     |     | ✓   |                              |         |                   | ✓                           |
| <b>FASE RITARDATA IPERSENSIBILITA' IMMEDIATA</b> | ✓   |     | ✓   |                              |         |                   |                             |
| <b>IPERSENSIBILITA' CUTANEA BASOFILA</b>         |     |     | ✓   |                              |         |                   |                             |

**Tabella 1. Reazioni di ipersensibilità.** Principali patologie associate ai diversi tipi di ipersensibilità (Miller et al., 2013).

## 2.3 SISTEMA IMMUNITARIO DELLA CUTE (SKIN IMMUNE SYSTEM o SIS)

La cute è una delle parti più importanti ed attive del sistema immunitario e questo spiega la notevole affinità della struttura cutanea con il timo (i cheratinociti della cute sono molto simili alle cellule epiteliali del timo) e la presenza di numerosi tipi cellulari deputati alla risposta immunitaria. Qui si trovano infatti cellule di Langherans, macrofagi tissutali, mastociti e un pool di linfociti T epidermotropi (“homing T cells”) che si infiltrano e rimangono a livello cutaneo per periodi indeterminati (Poli et al., 2005).

Nello specifico, nella cute esiste un insieme di cellule specializzate che assieme al sistema linfatico afferente drena al tessuto linfoide regionale e prende il nome di “tessuto linfoide cute-associato” (SKIN-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE o SALT) (Figura 3) (Day, 1999).

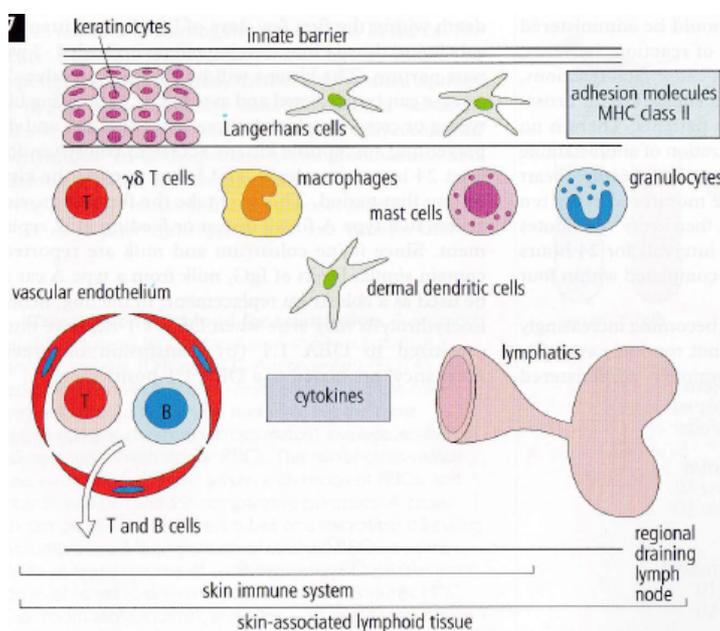
Anche il sistema immunitario della cute può attivare sia la componente cellulo-mediata sia quella umorale. In particolare la componente cellulo-mediata prevede il coinvolgimento di cheratinociti, cellule di Langherans, cellule dendritiche, linfociti, macrofagi, mastociti, cellule endoteliali e granulociti. La componente umorale invece include immunoglobuline, fattori del complemento, fibrinolisine, citochine, eicosanoidi, neuropeptidi e peptidi antimicrobici.

Questa dicotomia è essenziale dal momento che la grande maggioranza delle patologie, infiammatorie e non, che colpiscono la cute alterano o attivano, in parte o totalmente, il sistema immunitario cutaneo. Comprendere se e quale componente viene coinvolta è di fondamentale importanza per l'acquisizione di conoscenze precise e specifiche inerenti alle diverse malattie.

Prima dell'attivazione del sistema immunitario, qualsiasi agente considerato "non self" deve essere riconosciuto dall'organismo e ciò avviene nell'epidermide, se integra, o nel derma (Miller et al., 2013).

Tutti i meccanismi immunitari si innescano quando l'agente estraneo entra in contatto con lo strato corneo legandosi alle cellule del Langherans; si ha l'attivazione e quindi l'espansione clonale dei linfociti T antigene-specifici o direttamente o tramite la produzione di interleuchine (IL-1, IL-6 e IL-8 prodotte sia dai cheratinociti che dalle cellule del Langherans).

Una stimolazione prolungata dell'insulto esterno genera citochine pro infiammatorie che inducono le cellule del Langherans a ritrarre i loro processi dendritici e a migrare dall'epidermide al derma, quindi ai vasi linfatici e ai linfonodi, dove verrà presentato l'antigene (Poli et al., 2005).



**Figura 3. Skin-Associated lymphoid Tissue (SALT) (Day, 1999).**

## **2.4 ELEMENTI E CELLULE DEL SISTEMA IMMUNITARIO CUTANEO**

### **2.4.1 CITOCHINE**

Sono sostanze proteiche o glicoproteiche secrete dalle cellule, ad azione transitoria. Esercitano la loro attività sulle cellule target mediante recettori specifici permettendo la comunicazione intercellulare; in particolare, condizionano la crescita, la differenziazione, la funzione e l'attivazione delle altre cellule.

I loro effetti stimolatori o inibitori dipendono dal tessuto nel quale sono rilasciate e dall'eventuale interazione con altre citochine.

Alcune particolari citochine rilasciate a seguito di un insulto immunologico determinano se ci sarà lo sviluppo di una reazione immunologica e di quale tipo (umorale, cellulo-mediata o allergica).

Una grande classe di citochine definita chemochine è responsabile delle cellule coinvolte nell'infiammazione e nel sistema immunitario: sono molecole a basso peso molecolare che determinano il tipo di popolazione leucocitaria che viene richiamata durante un processo infiammatorio (Miller et al., 2013).

| <b>INTERLEUCHINE</b>   | <b>PROPRIETA'</b>   | <b>ATTIVITA'</b>  |
|--|---|---|
| <b>INTERLEUCHINA-1 (IL-1)</b>  | Gruppo di proteine prodotte soprattutto da macrofagi, in misura minore dalle altre cellule presenti nel tessuto linfoide associato alla cute.                   | Inizia la risposta immunitaria e infiammatoria (stimola i linfociti T helper a secernere IL-2); coadiuva nell'attivazione delle cellule B.                      |
| <b>INTERLEUCHINA-2 (IL-2)</b>  | Prodotta dai linfociti T helper attivati.   | Attiva e favorisce la crescita dei macrofagi e dei linfociti T e B attivati, stimolando la sintesi di Ig e la citotossicità dei linfociti B e delle cellule NK. |
| <b>INTERLEUCHINA-3 (IL-3)</b>  | Prodotta dai linfociti T helper attivati.   | Favorisce la proliferazione e la differenziazione di cellule T a partire da cellule staminali totipotenti, di eosinofili, di macrofagi e di basofili.           |
| <b>INTERLEUCHINA-4 (IL-4)</b>  | Prodotta dai linfociti T helper attivati.   | Stimola la crescita e la differenziazione dei linfociti B.  |
| <b>INTERLEUCHINA-5 (IL-5)</b>  | Prodotta dai linfociti T helper attivati.   | Aumenta la proliferazione dei linfociti B attivati e dei diversi isotipi anticorpali.   |
| <b>INTERLEUCHINA-6 (IL-6)</b>  | Prodotta da fibroblasti, cellule endoteliali, cheratinociti, macrofagi e linfociti T helper. Viene secreta a seguito di stimolazione con IL-1 e TNF- $\alpha$ . | Promuove la maturazione dei linfociti B e la sintesi di Ig.   |
| <b>INTERFERONE-<math>\gamma</math> (INF-<math>\gamma</math>)</b>           | Prodotto dai leucociti o dai fibroblasti attivati.  | Amplifica la risposta delle cellule T citotossiche specifiche per l'antigene e delle cellule NK.  |
| <b>TUMOR NECROSIS FACTOR <math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)</b> | È un insieme di citochine prodotto da macrofagi, monociti, linfociti, cellule NK e astrociti.   | È citotossico per le cellule tumorali.  |
| <b>TUMOR NECROSIS FACTOR <math>\beta</math> (TNF-<math>\beta</math>)</b>   | È prodotto dai linfociti T helper e i linfociti T citotossici attivati.   | È citotossico per le cellule tumorali.  |

**Tabella 2.** Principali interleuchine e loro proprietà (Poli et al., 2005).

## 2.4.2 CHERATINOCITI

Oltre alla funzione fondamentale di produzione dello strato corneo, i cheratinociti svolgono un ruolo importantissimo nell'immunità cutanea e lavorano in stretta correlazione con le cellule del Langherans.

I cheratinociti producono numerose citochine, importanti mediatori della risposta immunitaria cutanea, della risposta infiammatoria e dei processi di riparazione tissutale. Tra le altre molecole prodotte, non tutte sono ad attività anti-infiammatoria, alcune possono considerarsi pro-infiammatorie (Tabella 3).

I cheratinociti soprattutto se stimolati dall'INF-  $\gamma$  esprimono molecole del MHC di tipo 2 coinvolte nel processo di presentazione dell'antigene e poi nell'attivazione dei linfociti T.

Nonostante siano cellule capaci di fagocitosi, non svolgono questa funzione di processazione dell'antigene in modo efficiente, tuttavia si è visto essere in grado di favorire ugualmente la proliferazione di cellule T allogeniche CD4<sup>+</sup> (Miller et al., 2013).

### 2.4.3 LINFOCITI

I linfociti vengono distinti in linfociti a piccole, medie e grandi cellule, la cui dimensione nel cane si attesta essere due-tre volte maggiore a quella di un eritrocita ( $\cong 7 \mu\text{m}$ ) (dimensioni nel cane).

I primi sono più piccoli di un neutrofilo e si presentano con un nucleo non perfettamente sferico ma grande, un citoplasma scarsamente basofilo e con pochi organuli visibili. I linfociti con cellule di medie dimensioni sono simili a quelli più piccoli, ma presentano un citoplasma moderatamente abbondante e i nucleoli sono visibili. Infine, i linfociti a grandi cellule (linfoblasti) presentano un abbondante citoplasma e un grande nucleo tipicamente basofilo (Cowell, 2013).

Una volta attivati avviene un notevole aumento di volume tipico di cellule metabolicamente attive.

La loro funzione immunologica si esplica con la capacità di distinguere il “self”, verso il quale sono areattivi, dal “nonself”, cioè tutto quello che è estraneo e potenzialmente pericoloso per l'organismo. Nel momento in cui l'antigene viene riconosciuto come “non self” si instaurano una serie di eventi molecolari atti a distruggerlo e/o a rimuoverlo.

Il linfocita attivato prende il nome di immunoblasto e può svolgere molte funzioni immunologiche ma prima di attivare una risposta immunitaria completa necessita di ulteriori differenziazioni.

A partire da elementi indifferenziati derivanti dal fegato fetale e dal midollo osseo, gli organi linfoidei primari intervengono nella trasformazione in linfociti B e linfociti T. Una volta acquisita la competenza immunologica i linfociti raggiungono i tessuti linfoidei secondari o periferici. Sono ricchi di macrofagi e cellule dendritiche atti alla processazione dell'antigene. Essendo anche sede di linfociti B e T, a seconda della cellula coinvolta, la differenziazione nel momento di incontro con l'antigene varia: i linfociti B diventano grossi linfociti o plasmacellule, mentre i linfociti T diventano linfociti T helper, T citotossici o T suppressor (Poli et al., 2005).

I linfociti B originano nel midollo osseo e maturano o nel midollo o nelle placche di Peyer. La loro funzione consiste nel sintetizzare le immunoglobuline (Ig): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Le immunoglobuline presenti sulla superficie sono specifiche per un determinato antigene.

Secondo lo stadio maturativo del linfocita le immunoglobuline o rimangono nel citoplasma o vengono incorporate ed espresse nella membrana citoplasmatica o, per ultimo, secrete nei liquidi organici (Poli et al., 2005).

Oltre alle immunoglobuline, i linfociti B veicolano anche recettori per la frazione C3 attivata del complemento (C3b), Recettore Fc, il CD79 o complesso del recettore del linfocita B.

Nella cute sono soprattutto le IgG e IgM a garantire una risposta immunitaria aspecifica e antigene indipendente; subentra poi una seconda fase o fase della memoria in cui c'è una stimolazione antigene specifica, anche verso i linfociti T, durante la quale si osserva un aumento di cellule secernenti IgA, IgG o IgE.

Confrontata con l'incidenza rilevata nella cute umana, i linfociti B nel cane hanno un impatto di gran lunga maggiore e l'immunità umorale viene considerata come una prima linea di difesa nei confronti di agenti esterni (Miller et al., 2013).

La plasmacellula è lo stadio finale di maturazione del linfocita B attivato dall'antigene. Si sviluppa in 2-3 giorni dall'attivazione del linfocita, sintetizza e secerne grandi quantità di anticorpi e muore nell'arco di una settimana (Poli et al., 2005).

Sono cellule ovoidali, con nucleo ovoidale ed eccentrico, l'eterocromatina è distribuita in ammassi che aderiscono alla membrana nucleare conferendo al nucleo il tipico aspetto "a ruota di carro". Il citoplasma è basofilo, ricco di ribosomi e di reticolo endoplasmatico rugoso. Accanto al nucleo è evidente un'area più chiara rappresentata dall'apparato del Golgi. Alcuni tipi di plasmacellule (Mott cells) presentano numerosi vacuoli di grandi dimensioni, definiti "Corpi di Russell", rappresentanti le immunoglobuline trattenute dalla cellula (Cowell, 2013).

I linfociti T originano nel midollo osseo e maturano nel timo. I loro vari stadi di sviluppo si differenziano e si identificano grazie a marker che esprimono in superficie (antigeni di superficie). Il più significativo è il T cell receptor o Tcr: questo si aggrega ad altre proteine di superficie come CD3 (presente su tutti i linfociti T) e o alla CD4 (se il linfocita ha funzione di helper) o alla CD8 (se il linfocita ha funzione di citotossico o suppressor) (Poli et al., 2005).

Il CD28 è considerato il maggior co - stimolatore richiesto per la comunicazione con le cellule presentanti l'antigene, con le quali reagisce mediante il recettore B7.

Le diverse sottopopolazioni di linfociti T, helper o citotossici/suppressor, sono diverse sia per markers espressi sia per funzione svolta (Miller et al., 2013).

I linfociti T helper sono un terzo dei linfociti T maturi totali e sono cellule ad attività regolatrice della risposta immunitaria, il cui fenotipo è CD4+ e CD8- .

Svolgono diverse funzioni, di cui sembra siano responsabili diverse sottopopolazioni:

1. Aiutano i linfociti B a produrre anticorpi e a secernearli;
2. inducono i linfociti citotossici a differenziarsi in cellule effettrici;
3. partecipano alle reazioni di ipersensibilità ritardata stimolando macrofagi e altre cellule non specifiche.

A seconda del tipo di citochine che producono, distinguiamo i linfociti T helper 1 e i linfociti T helper 2.

I linfociti T helper 1 stimolano le cellule citotossiche e attivano i macrofagi promuovendo la risposta immunitaria cellula - mediata (Poli et al., 2005).

Questi riconoscono antigeni peptidici legati alle molecole MHC di classe 2 e attivano i macrofagi, svolgendo un ruolo nelle infezioni sostenute da batteri intracellulari.

La lipoproteina batterica si lega poi alla superficie del macrofago inducendo il rilascio di IL-2 e di ossido nitrico al suo interno favorendo l'eliminazione del patogeno stesso. L'IL-2 a sua volta stimola i linfociti T a rilasciare IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  atti a reclutare ulteriori macrofagi (McGavin, 2008).

I linfociti T helper 2 stimolano la proliferazione dei linfociti B e quindi degli anticorpi, promuovendo una risposta immunitaria umorale (Poli et al., 2005).

Riconoscono peptidi legati alle molecole MHC di classe 2 e contribuiscono ad eliminare i patogeni extracellulari (McGavin, 2008).

Le cellule Th1 o Th2 possono migrare preferenzialmente verso i tessuti colpiti, grazie all'espressione di recettori specifici, che assicurano l'attivazione della risposta immunitaria corretta.

Esiste una terza sottopopolazione di cellule T helper che produce citochine rappresentative sia di Th1 sia di Th2, denominata T helper 0 (Th0). Potrebbero rappresentare i precursori dei Th1 o dei Th2 oppure cellule in transizione tra le due sottopopolazioni. Uno studio ha dimostrato che

coltivando queste cellule in presenza di IL-4 le cellule Th0 si trasformano in Th2, mentre se coltivate con IL-12 si trasformano in Th1. Quindi, in corso di infezioni croniche, in vivo, ci sarà una persistenza di queste due sottopopolazioni vincolate da un determinato antigene.

I linfociti T citotossici o suppressor sono caratterizzati da un fenotipo di membrana CD4- e CD8+. Questi hanno due funzioni primarie:

1. Agiscono come cellule effettrici citotossiche;
2. intervengono nella soppressione della risposta immunitaria.

Il funzionamento dei linfociti T citotossici si basa sul fatto che in presenza di un antigene estraneo i piccoli linfociti si trasformano in grandi linfociti ad azione citotossica. Questi distruggono le cellule che veicolano l'antigene che ha stimolato l'attivazione dei linfociti stessi. La loro azione non è solo rivolta verso le cellule con un antigene di istocompatibilità di classe I diverso dal proprio, ma anche verso cellule con il loro stesso antigene di istocompatibilità che possono presentare anche una piccola porzione modificata a causa di una trasformazione neoplastica o a causa di un'infezione virale.

Invece, i linfociti T suppressor hanno il compito di controllare il funzionamento del sistema immunitario in quanto sopprimono l'attività dei linfociti B, di alcuni linfociti T e dei macrofagi. A seconda che siano cellule antigene-specifiche o antigene-non specifiche si parla di linfociti T suppressor diversi (Poli et al., 2005).

#### **2.4.4 CELLULE “KILLER” E “NATURAL KILLER”**

Le cellule killer e natural killer sono cellule che si formano durante la vita embrionale, hanno dimensioni del 50% maggiori dei linfociti, presentano un maggior quantitativo di citoplasma e nucleo reniforme.

Le cellule killer fanno parte di una popolazione eterogenea che include cellule con alcuni marker dei T o dei B, cellule della linea mieloide (neutrofili, eosinofili e monociti) e svolgono un'azione citotossica nei confronti di cellule bersaglio verso cui hanno già agito anticorpi specifici, diretti verso qualche antigene di membrana.

I natural killer esplicano, invece, azione citotossica anche senza che vi sia stato un precedente incontro con l'antigene. La loro attivazione può essere favorita dall'INF- $\gamma$  prodotto dai linfociti T helper (Poli et al., 2005).

#### **2.4.5 MACROFAGI TISSUTALI**

I macrofagi sono cellule che presentano una morfologia estremamente variabile: inizialmente sono paragonabili ai monociti che poi maturando diventano cellule rotondeggianti con un citoplasma abbondante e talvolta vacuolizzato (Cowell, 2013).

I macrofagi del derma sono considerati i precursori delle cellule dendritiche dermiche. Derivano dal midollo osseo e giungono in circolo come monociti generalmente CD14+.

Nei processi infiammatori rivestono il ruolo di cellule processanti e presentanti l'antigene, specialmente nel processo di attivazione delle cellule T.

Possono produrre enzimi, citochine, mediatori dell'infiammazione, fattori rilascianti istamina ed inibitori quando stimolati.

A seconda dei casi possono dare degli stimoli pro infiammatori o ridurre l'infiammazione in modo da prevenire la distruzione tissutale a seguito di insulto (Miller et al., 2013).

#### **2.4.6 MASTOCITI**

I mastociti sono cellule rotondeggianti facilmente identificabili grazie alla presenza di granuli intracitoplasmatici rosso-violacei presenti in quantità variabile (Cowell, 2013).

Derivano dalle cellule staminali ematopoietiche midollari e migrano nel tessuto connettivo o nelle mucose come cellule immature. Una volta arrivate al tessuto designato, proliferano e si differenziano in cellule mature.

I mastociti uniscono caratteristiche tipiche dell'immunità innata con altre dell'acquisita:

1. Legano e fagocitano alcuni tipi di batteri;
2. producono e secernono diversi prodotti biologicamente attivi (Tabella 3);
3. sono cellule presentanti l'antigene e favoriscono l'espansione clonale dei linfociti T helper CD4+;
4. svolgono un ruolo nell'ipersensibilità immediata (Miller et al., 2013).

### **2.4.7 CELLULE DEL LANGHERANS**

Sono cellule che originano dal midollo osseo e appartengono alla famiglia altamente specializzata di cellule presentanti l'antigene chiamate cellule dendritiche. Sono le maggiori cellule presentanti l'antigene a livello cutaneo, sentinelle del sistema immunitario, uniche capaci di attivare i linfociti T naïve.

Nel cane le cellule dendritiche presentanti l'antigene si ritrovano sia a livello dermico che epidermico ed esprimono molecole CD1; in particolare CD1a è considerato il marker per le cellule del Langherans canine.

Per ottenere la stimolazione dei linfociti devono presentare le molecole del MHC di tipo 2 associate all'antigene specifico, ma possiedono anche recettori per la porzione 3b del complemento, Fc-IgG e Fc-IgE.

Solitamente gli antigeni proteici vengono legati a molecole del MHC di tipo 1 espressi da qualsiasi tipo di cellula nucleata e riconosciuti dai linfociti antigene specifici T citotossici CD8+. Mentre gli antigeni esogeni vengono presentati a cellule T helper CD4+ legati alle molecole del MHC di tipo 2 previa processazione da parte di specifiche cellule presentanti l'antigene.

L'attivazione dei linfociti si basa sull'esposizione dell'antigene che viene legato alle molecole del MHC di tipo 2 e veicolato al linfocita e l'espansione clonale linfocitaria si basa su numerose citochine secrete e diverse molecole segnale secondarie, alle quali si aggiunge l'espressione di recettori di superficie della famiglia B7 a seguito di una stimolazione delle cellule di Langherans causata dalla presenza di lipopolisaccaridi, TNF- $\alpha$ , IL-1B e alcuni mediatori lipidici.

Quindi, queste cellule epidermiche a seguito di qualsiasi insulto a carico della cute si attivano e producono fattori pro-infiammatori che a loro volta stimolano lo spostamento delle cellule del Langherans dal comparto cutaneo a quello linfonodale (Miller et al., 2013).

### **2.4.8 CELLULE ENDOTELIALI**

Le cellule dell'endotelio vascolare rivestono un ruolo molto importante nell'infiammazione, nella risposta immunitaria e nella riparazione tissutale attraverso la secrezione di sostanze diverse (Tabella 3).

Sotto stimolazione di citochine, le cellule endoteliali esprimono molecole di adesione: ad esempio la E-selectina e la P-selectina sono espresse sulle cellule endoteliali dopo un certo stimolo infiammatorio.

L'attivazione linfocitaria esita nell'espressione di integrine e nel legame alle molecole di ICAM-1 e VCAM-1 sulle cellule endoteliali. Abbiamo quindi la migrazione delle cellule effettrici nel sito dell'infiammazione (Miller et al., 2013).

## **2.4.9 GRANULOCITI**

I granulociti neutrofilici sono cellule derivanti dal midollo osseo che possono considerarsi parte dell'immunità innata, implicate nell'eliminazione di agenti estranei presenti nell'organismo mediante il meccanismo della fagocitosi (Day, 1999).

Sono cellule caratterizzate da un nucleo formato da segmenti distinti, tanto più numerosi tanto più la cellula invecchia e un citoplasma tipicamente chiaro (Cowell, 2013).

Gli eosinofili sono cellule di dimensioni più grandi rispetto ai neutrofilici, presentano nuclei segmentati e nel citoplasma sono presenti granuli da aranciati a rosa, variabili in numero e dimensioni (Cowell, 2013).

Sono reclutati in modo selettivo in base al tipo di processo immunologico in atto e sono presenti in circolo in misura minore rispetto ai neutrofilici. La loro capacità di fagocitosi è limitata rispetto a quella dei neutrofilici, tant'è che la loro azione si basa sulla degranolazione extracellulare (Day, 1999).

Partecipano alle reazioni di ipersensibilità, nella regolazione dell'infiammazione e nella difesa dell'ospite contro parassiti extracellulari. Sono strettamente correlati e comunicanti con cellule circostanti attraverso l'espressione di recettori di superficie e secrezione di citochine.

Infine, i basofili giocano un ruolo importante nelle reazioni di ipersensibilità, in particolare nella diminuzione di quelle di tipo ritardato. Hanno un'elevata affinità per le IgE e contengono granuli di istamina, alla pari dei mastociti (Miller et al., 2013).

| <b>TIPOLOGIA CELLULARE</b>  | <b>PRODOTTI CELLULARI</b>  |
|-----------------------------|--|
| <b>CHERATINOCITI</b>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>CITOCHINE:</b> IL-1, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12, IL-15, IL-16, IL-18 e TNF-<math>\alpha</math>;</li> <li>▪ <b>FATTORI DI CRESCITA;</b></li> <li>▪ <b>EICOSANOIDI;</b></li> <li>▪ <b>PROSTAGLANDINE (PGE2);</b></li> <li>▪ <b>NEUROPEPTIDI;</b></li> <li>▪ <b>MOLECOLE DI ADESIONE (ICAM-1).</b></li> </ul> |
| <b>LINFOCITI B</b>          | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>IMMUNOGLOBULINE (Ig):</b> IgA, IgD, IgE, IgG e IgM.</li> </ul>   |
| <b>LINFOCITI T HELPER 1</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>CITOCHINE:</b> IL-2, TNF-<math>\alpha</math> e INF-<math>\gamma</math>.</li> </ul>   |
| <b>LINFOCITI T HELPER 2</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>CITOCHINE:</b> IL-4, IL-5 e IL-10.</li> </ul>  |
| <b>LINFOCITI T HELPER 0</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>CITOCHINE:</b> IL-2, IL-4, IL-5 e INF- <math>\gamma</math>.</li> </ul>   |
| <b>MASTOCITI</b>            | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>CITOCHINE:</b> IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, TNF-<math>\alpha</math> e INF-<math>\gamma</math>;</li> <li>▪ <b>ISTAMINA;</b></li> <li>▪ <b>LEUCOTRIENI;</b></li> <li>▪ <b>FATTORI EOSINOFILICI CHEMOTATTICI;</b></li> <li>▪ <b>ENZIMI PROTEOLITICI.</b></li> </ul>                    |
| <b>CELLULE ENDOTELIALI</b>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <b>CITOCHINE:</b> IL-1, IL-6 e IL-8;</li> <li>▪ <b>FIBRONECTINA;</b></li> <li>▪ <b>COLLAGENE DI TIPO IV;</b></li> <li>▪ <b>PROTEOLICANI;</b></li> <li>▪ <b>FATTORI DELLA COAGULAZIONE;</b></li> <li>▪ <b>FATTORI STIMOLANTI MACROFAGI E GRANULOCITI.</b></li> </ul>   |

**Tabella 3.** Tipologie cellulari associate alle diverse molecole prodotte (Miller et al., 2013).

## **3 DERMATITE ATOPICA CANINA**

### **3.1 INTRODUZIONE**

La dermatite atopica è una patologia cutanea allergica, pruriginosa ed infiammatoria a predisposizione genetica con caratteristiche cliniche peculiari associate ad IgE frequentemente dirette contro allergeni ambientali (Halliwell, 2006).

Nell'uomo, così come nel cane, la dermatite atopica è una patologia in crescente sviluppo, che ha subito un incremento notevolissimo negli ultimi trent'anni (Kang et al., 2014), ed ha un'incidenza sempre maggiore, soprattutto nei paesi più industrializzati, dove si attesta una prevalenza attorno al 10% (Hillier et Griffin, 2001(a)) mentre colpisce circa il 10-15% della popolazione canina (Hillier et Griffin, 2001(a); Nodtvedt et al., 2006; Meury et al., 2011; Saridomichelakis et Olivry, 2015).

In medicina umana, si è provato a spiegare questo incremento della dermatite atopica con la “teoria dell'igiene”, formulata alla fine degli anni '80, in accordo con la quale un'esposizione insufficiente a microrganismi ambientali può essere una delle cause favorevoli all'insorgere di allergie.

Per favorire lo sviluppo del sistema immunitario e renderlo competente nei confronti dei vari antigeni con cui l'organismo può entrare a contatto sarebbe necessario che sin da subito un individuo fosse esposto ad agenti infettivi, virali e/o batterici: ad oggi la sempre maggior accortezza nei confronti di ogni aspetto igienico-sanitario ha portato anche a delle modifiche a livello di sistema immunitario innato, adattatosi ad un ambiente “sterile”.

Lo sviluppo di una risposta immunitaria mediata dai linfociti Th1 rispetto ad una mediata dai linfociti Th2 diminuirebbe la suscettibilità alle malattie allergiche e autoimmuni, tra cui la dermatite atopica: è per questo che la mancanza di un'adeguata esposizione ad agenti microbici nel periodo dell'infanzia porterebbe ad una maggiore suscettibilità allo sviluppo di allergie, dal momento che non c'è stata un'immunizzazione adeguata e lo sviluppo di un'idonea tolleranza immunitaria.

Oggi, nelle società occidentali il contatto con diversi allergeni è pressoché costante e continuo, tuttavia una realtà in cui si fa un uso sempre più smodato di antibiotici, antiparassitari, sostanze disinfettanti e bagni molto frequenti favorisce una riduzione del contatto con microrganismi e questo ci spiega come questa patologia abbia avuto un'evoluzione molto rapida ed incisiva negli ultimi decenni (Flohr C. et al., 2005; Meury et al., 2011; Pelucchi et al., 2013; Kramer et al., 2013; Vitaliti et al., 2014).

Lo sviluppo della risposta immunitaria nei confronti di esotossine è dose dipendente: se la dose è bassa si sviluppa una risposta infiammatoria mediata da linfociti Th2, mentre se la dose è alta c'è una risposta prevalentemente mediata dai linfociti Th1 (Bizikova et al., 2015(a)).

Nel cane il progressivo aumento della dermatite atopica porta a considerare sempre di più l'ipotesi che i fattori ambientali, che molto spesso sono gli stessi che condivide con l'uomo, giochino un ruolo importante nel favorire l'insorgenza della patologia:

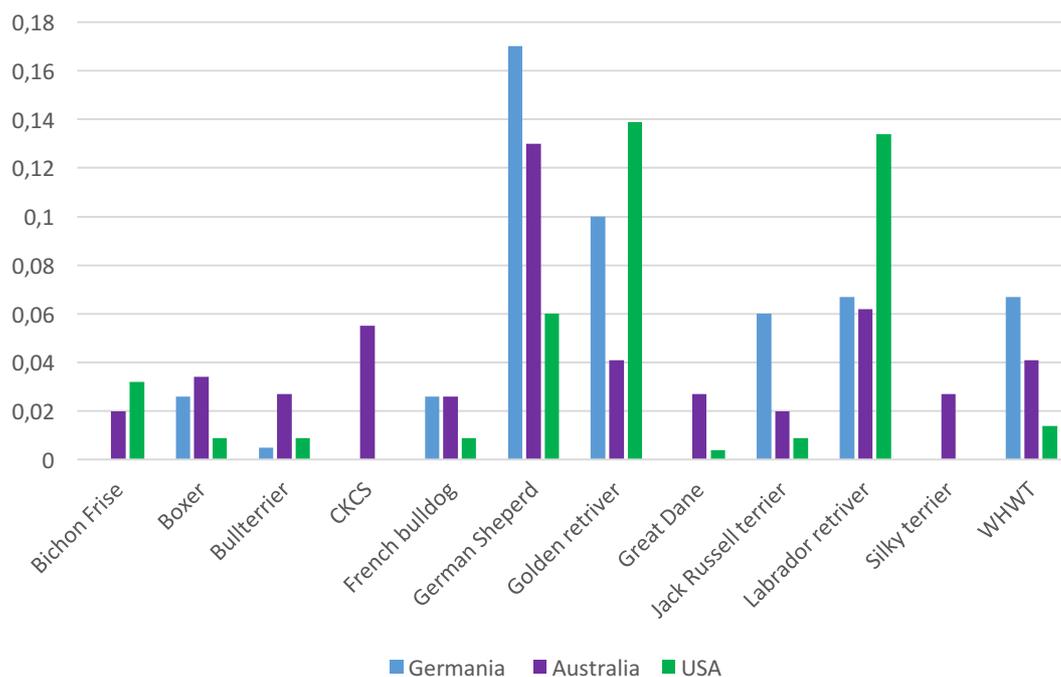
- l'esposizione ad allergeni quali pollini e muffe (Bizikova et al., 2015(a));
- la vita indoor dove sono più facilmente a contatto con gli acari della polvere (Meury et al., 2011) o con il fumo di sigaretta (Bizikova et al., 2015(a));
- la vita urbana dove il livello di inquinanti ambientali, come lo smog prodotto dalle auto, è sempre più alto;
- una limitata convivenza con altri cani o gatti;
- bagni troppo frequenti che alterano la barriera cutanea;
- regolari trattamenti antiparassitari e/o vaccinazioni (Meury et al., 2011).

Accanto alla componente ambientale, la predisposizione di razza, la familiarità e l'aspetto genetico della malattia sono ormai considerati come fattori predisponenti (Marsella, 2004(a)).

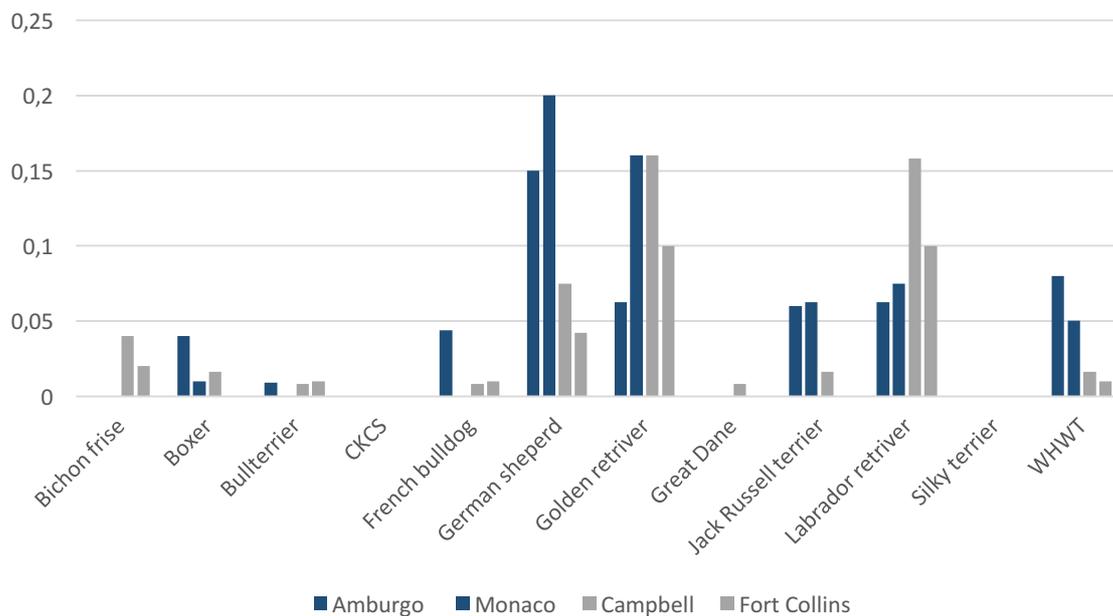
Sono ancora troppo pochi gli studi nei quali si è cercato di stabilire una correlazione precisa tra l'insorgenza della dermatite atopica ed una razza canina, tuttavia è un'evidenza il fatto che in alcune razze compaia più frequentemente rispetto ad altre (Sousa et Marsella, 2001).

Tra le razze maggiormente a rischio si evidenziano Boxer, Bullterrier, Cairn terrier, Chow Chow, Fox terrier, Cocker Spaniel, French bulldog, German Sheperd, Golden retriever, Labrador retriever, Irish setter, Poodle, Rhodesian ridgeback, Shar Pei, Viszla e West Highland White terrier (Figura 4) (Wilhem et al., 2011; Nuttall, 2013).

Tuttavia per quanto riguarda l'incidenza riferita ad ogni razza ci possono essere delle variazioni sulla base della localizzazione geografica e anche all'interno dello stesso continente da regione a regione (Figura 5) (Jaeger et al., 2010).



**Figura 4. Incidenza di dermatite atopica canina in diverse razze.** Confronto dell'incidenza di dermatite atopica in numerose razze studiate in Germania (Amburgo e Monaco), Australia (Melbourne) e USA (Campbell (CA) e Fort Collins (CO)). Nello studio sono stati inclusi 552 pazienti (Jaeger et al., 2010).

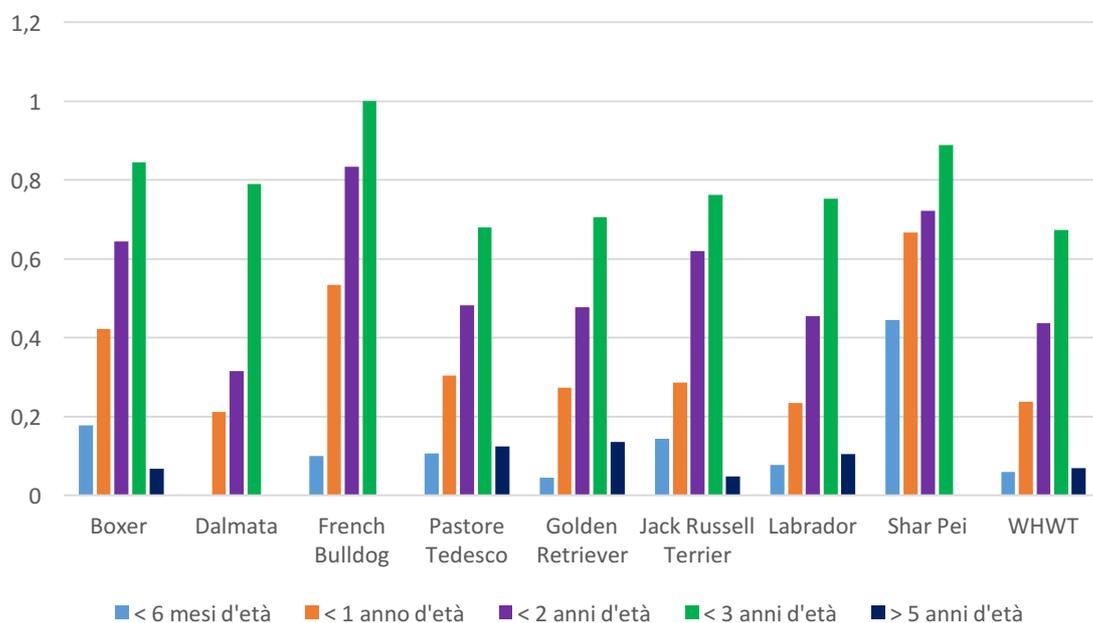


**Figura 5. Variazioni dell'incidenza di dermatite atopica in numerose razze studiate in regioni diverse all'interno dello stesso continente** (Jaeger et al., 2010).

Per quanto riguarda il genere non sembra esserci una predisposizione allo sviluppo della dermatite atopica (Griffin et DeBoer, 2001; Zur et al., 2001), eccezion fatta per le razze Boxer e Golden Retriever; nel primo caso sembra esserci una prevalenza superiore nella popolazione femminile, nel secondo, nella popolazione maschile (Wilhem et al., 2011).

È stata invece definita una fascia di età, dai 6 mesi ai 3 anni, all'interno della quale più di frequente i segni clinici insorgono nel paziente, in accordo con la situazione che si rileva anche nell'uomo, dove l'età di insorgenza tipica della patologia è sotto i due anni, quindi in età infantile (Griffin et DeBoer, 2001). Uno studio eseguito sullo sviluppo di dermatite atopica correlata a razze specifiche ha evidenziato come l'insorgenza nei Bulldog francesi e negli Shar Pei avvenga più precocemente rispetto alle altre razze (sotto i due mesi d'età) (Figura 6) (Wilhem et al., 2011).

Infine è stata rilevata un'ulteriore differenza nell'età di insorgenza di dermatite atopica indotta da allergeni ambientali piuttosto che nella condizione di atopia indotta da cause alimentari la cui manifestazione clinica è comunque equiparabile alla dermatite atopica: nel secondo caso i soggetti o sono molto giovani (< 1 anno di età) o già adulti (> 6 anni d'età), criterio che può essere utile nell'indirizzare verso una diagnosi (Picco et al., 2008; Favrot et al., 2010).



**Figura 6. Età di insorgenza della dermatite atopica in 9 razze canine.** Per alcune tra le razze canine principali (ascissa) si indica la probabilità che i soggetti sviluppino atopia (ordinata) nelle diverse fasce d'età, da sotto i 6 mesi a sopra i 5 anni (Wilhem et al., 2011).

Un altro fattore che può giustificare l'incremento di casi di dermatite atopica canina è l'aumento del livello di attenzione dei proprietari, che li spinge a portare il cane maggiormente dal veterinario; controlli routinari facilitano la diagnosi della patologia, aumentando il numero di casi rilevati annualmente rispetto al passato (Meury et al., 2011; Miller et al., 2013).

### **3.2 SINTOMI**

Il sintomo principale della dermatite atopica canina è il prurito, spesso presente in aree corporee anche prive di lesioni (“*prurito sine materia*”) (Plant et al., 2012) o leggermente eritematose (Miller et al., 2013).

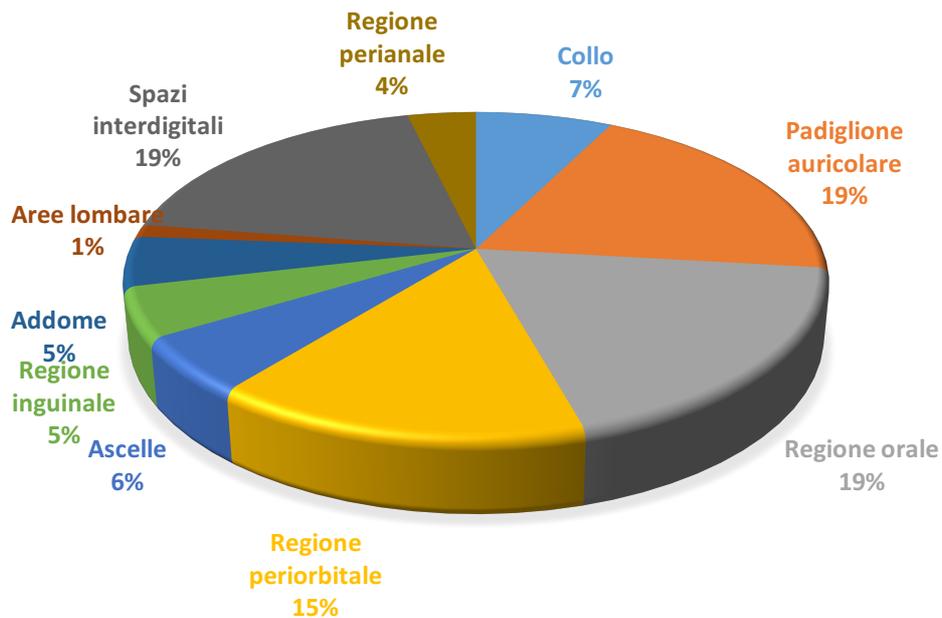
Il prurito viene percepito nel paziente come alterazioni comportamentali, quali grattamento, morsicamento, masticamento, grooming eccessivo o leccamento o scuotimento della testa (Hensel et al., 2015).

Accanto al prurito, si possono sviluppare una serie di lesioni cutanee secondarie tra cui:

- lesioni che rispondono rapidamente alla terapia, come l'eritema;
- lesioni che evolvono più lentamente come l'iperpigmentazione e la lichenificazione, segni di una patologia che sta cronicizzando;
- lesioni come escoriazioni o alopecia, conseguenti ad auto-traumatismi (leccamento o grattamento) indotti dal prurito e finalizzati ad alleviarne la sensazione sgradevole.

Le regioni anatomiche che più di frequente vengono interessate da queste manifestazioni cliniche sono la testa, i padiglioni auricolari, le estremità distali sia degli arti anteriori che posteriori, l'addome, la regione inguinale e le ascelle (Figura 7) (Griffin et DeBoer, 2001).

Una spiegazione che potrebbe giustificare questa distribuzione corporea riguarda la via di esposizione agli allergeni scatenanti la patologia: sicuramente il contatto tramite la via epicutanea è quello che incide maggiormente, seguito in seconda istanza dalla via inalatoria, infine da quella orale (Marsella et al., 2006).



**Figura 7. Principali lesioni della CAD.** Distribuzione delle lesioni nella dermatite atopica canina (Terada Y. et al., 2011).

Prima di giungere all'attuale definizione di dermatite atopica, una delle prime denominazioni date ad un quadro clinico equiparabile alla patologia come oggi è conosciuta era "dermatite allergica da inalanti" (Wittich, 1941).

Non è molto comune in medicina veterinaria, nemmeno nei casi di dermatite atopica più grave, tuttavia oltre alle lesioni cutanee, in un paziente atopico, possono svilupparsi altre manifestazioni cliniche, come congiuntiviti, evidenziabili nel 21-30% dei pazienti, o riniti, la cui incidenza è molto bassa,  $\approx 6\%$  (Bizikova et al., 2015(b)).

In medicina umana questo tipo di sintomatologia è invece più frequente, tanto che viene denominata "*atopic march*", dove accanto alla sintomatologia dermatologica si manifestano fenomeni di riniti e asma stagionali molto marcati (Tabella 4) (Marsella et Girolomoni, 2009).

| UOMO  | CANE  |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Prurito;</li> <li>➤ secchezza della cute ed eritema;</li> <li>➤ escoriazioni auto-indotte e lichenificazione;</li> <li>➤ infezioni secondarie (<i>Staphilococcus aureus</i>);</li> <li>➤ asma;</li> <li>➤ riniti e congiuntiviti.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Prurito;</li> <li>➤ eritema;</li> <li>➤ infezioni secondarie quali otiti esterne o piodermiti;</li> <li>➤ colorazione rossastra del pelo, escoriazioni, alopecia auto-indotta, pelo opaco, iperpigmentazione, desquamazione e lichenificazione;</li> <li>➤ congiuntivite.</li> </ul> |

**Tabella 4.** Manifestazioni cliniche di dermatite atopica umana e canina (Tratto e modificato da Griffin et DeBoer, 2001).

Infine, non è infrequente riscontrare in pazienti atopici infezioni secondarie sostenute principalmente da batteri (*Staphilococcus spp.*) o lieviti (*Malassezia spp.*).

In 2/3 dei pazienti si manifestano piodermiti batteriche secondarie, come foruncolosi o follicoliti, dermatiti piotraumatiche o dermatiti acrali da leccamento. Non sono rare otiti esterne ricorrenti, più o meno pruriginose (Miller et al., 2013).

Le lesioni cutanee, eventualmente associate a problemi alle alte vie respiratorie, possono essere stagionali se associate ad allergeni quali pollini che si manifestano più di frequente in primavera/estate, con manifestazioni cliniche inizialmente limitate che però con il progredire della patologia tendono a divenire annuali (Griffin et DeBoer, 2001). Oppure possiamo parlare di sintomi non stagionali qualora gli allergeni implicati siano ad esempio gli acari della polvere o il cibo (Hensel et al., 2015).

Interessante il fatto che non si siano notate differenti manifestazioni cliniche, soprattutto nei casi di sintomatologia non stagionale, tra pazienti dove l'atopia è causata da allergeni alimentari rispetto a quelli in cui è causata da allergeni ambientali (Bizikova et al., 2015(b)).

In medicina veterinaria, la reazione avversa al cibo non è mai stata considerata una reazione mediata da IgE specifiche né predisponente lo sviluppo di dermatite atopica in tutti i soggetti in cui veniva diagnosticata.

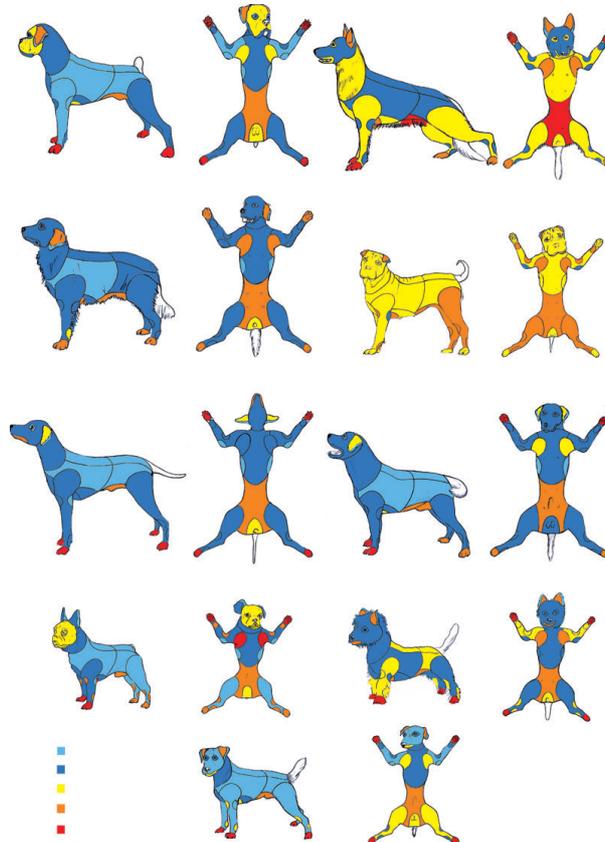
Questo dato è in contrasto con la letteratura presente in medicina umana, dove invece, nel caso in cui si riscontrasse un'allergia alimentare in un neonato o in bambino, questa era predittiva di una possibile insorgenza postuma di dermatite atopica (Hillier et Griffin, 2001(b)).

Tuttavia alcuni componenti presenti nel cibo possono indurre nel soggetto manifestazioni cliniche simili a quelle tipiche della dermatite atopica (Picco et al., 2008).

Questo è un aspetto ancora controverso, dal momento che alcuni autori ritengono questa distinzione puramente teorica e che detengono la convinzione che la dermatite atopica possa essere scatenata da allergeni alimentari quanto ambientali (Hillier et Griffin, 2001(b)).

Al contrario, si è rilevata una correlazione tra la distribuzione e la tipologia delle lesioni che si sviluppano più di frequente in alcune razze, probabilmente imputabile alla componente genetica e familiare della malattia oppure a condizioni ambientali a cui i cuccioli vengono esposti sin dalla nascita.

Ad esempio, i Golden retriever ed i Labrador retriever presentano un pattern di distribuzione delle lesioni simile, mentre razze come il Pastore Tedesco o lo Shar pei sono marcatamente diversi (Figura 8) (Wilhem et al., 2011).



**Figura 8.** Distribuzione delle lesioni associate a razze specifiche (Wilhem et al., 2011).



**Figura 9. Pododermatite ed eritema interdigitale.**



**Fig. 10. Aree di alopecia multifocale.**



**Figura 11. Collaretti epidermici.**



**Figura 12. Lichenificazione dell'addome.**

### **3.3 METODI DI VALUTAZIONE DELLA GRAVITA' DELLE LESIONI E DELL'INTENSITA' DEL PRURITO**

Non esistono sistemi di misura oggettivi per determinare la gravità delle lesioni della dermatite atopica nelle diverse specie (Germain et al., 2005) e per questo motivo, nel corso degli anni, sono state studiate e validate alcune scale per poter monitorare l'andamento clinico dei pazienti sia in ambito clinico sia in ambito di ricerca (Olivry et al., 2014).

Nell'uomo si sono provati ad utilizzare marker biochimici ed ematologici come le proteine cationiche eosinofile senza risultati soddisfacenti (Amon et al., 2000) oppure si è valutata la permeabilità della barriera cutanea tramite l'indicazione dello stato di idratazione (Wolkerstorfer et al., 1999).

Si sono poi stilate una serie di scale di valutazione della gravità delle lesioni e ad oggi solo una è considerata di validità clinica, ossia la SCORAD (Scoring Atopic Dermatitis) (Kunz et al., 1997).

Mentre nel cane la mancanza di sistemi standardizzati o validati ha reso difficile creare dei metodi di valutazione oggettivi.

Ad oggi le scale più utilizzate per la valutazione della gravità delle lesioni nel cane sono:

1. la (CADESI)-4 (Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index);
2. la CADLI (Canine Atopic Dermatitis Lesion Index);

Esistono poi delle scale per la valutazione della gravità del prurito:

1. PVAS (Pruritus Visual Analog Scale);
2. PICAD (Pruritus Index for Canine Atopic Dermatitis).

#### **3.3.1 METODI DI VALUTAZIONE DELLA GRAVITA' DELLE LESIONI**

##### **3.3.1.1 CADESI (Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index)**

In medicina umana la scala di valutazione ad oggi considerata più attendibile è la SCORAD (Human Scoring Atopic Dermatitis) mirata a valutare sei aspetti clinici diversi (eritema, lichenificazione, escoriazione, secchezza cutanea, papule ed edema, presenza di croste), l'estensione globale delle lesioni, l'intensità del prurito e la conseguente influenza che può avere sulla qualità di vita del paziente (Germain et al., 2005).

In medicina veterinaria, nel corso degli anni, la CADESI è stata continuamente rivisitata con il fine di ottenere un modello quanto più valido, preciso, affidabile e facilmente fruibile dal proprietario (Olivry et al., 2014).

La prima versione era stata proposta nel 1997 dove si valutavano 3 lesioni (eritema, escoriazione e lichenificazione) in 23 aree corporee dando un punteggio in una scala da 1 a 4: 0 corrispondeva ad assente, 1 lieve, 2 moderato e 3 grave (Olivry et al., 1997(a)). Questa scala non è mai stata validata, ma considerata la base per la costruzione di altri indici di valutazione (Germain et al., 2005).

Nel 2002 viene proposta una seconda versione nella quale il numero di regioni anatomiche da considerare passava da 23 a 40, mantenendo però gli altri criteri invariati (Olivry et al., 2002).

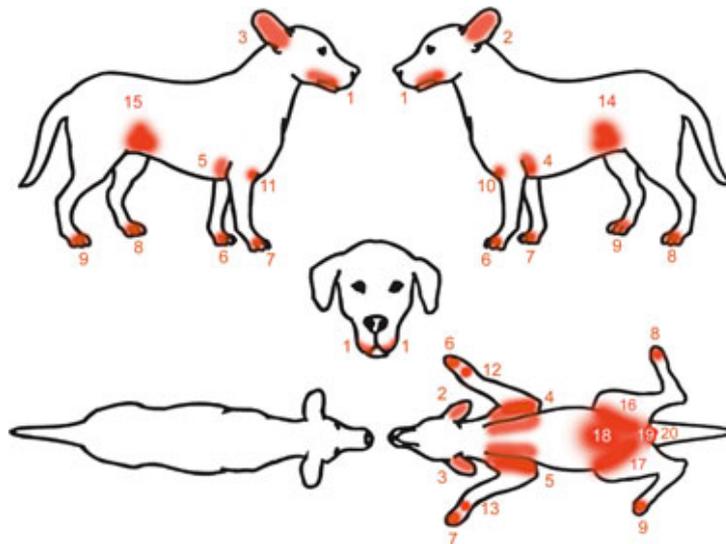
La terza modifica (CADESI-03) proposta nel 2007 aumentava a 62 le regioni corporee da visitare, aggiungendo inoltre, tra le lesioni, l'alopecia auto – indotta e modificando i gradi di gravità da 4 a 6.

Il problema di questo tipo di valutazione stava nella poca praticità e nei tempi richiesti affinché il veterinario riuscisse a compilarla; ciò ha portato alla formulazione della “modified CADESI-03” in cui venivano rivisti alcuni dei parametri da valutare eliminandoli o sommandoli tra loro, rendendo però così non standardizzabili i risultati ottenuti (Olivry et al., 2007).

L'ultima versione–CADESI-04 (Figura 13)- viene proposta nel 2014 con il fine di creare un metodo di valutazione più veloce, valido ed affidabile, che permettesse di delineare dei cut off tra pazienti con gradi diversi di gravità della patologia.

Prevede la valutazione di 20 aree corporee, quelle dove più di frequente si evidenziano le lesioni, quindi più sensibili e specifiche, tre tipi di lesioni da valutare (eritema, lichenificazione ed una commistione tra l'alopecia e l'escoriazione dovute al prurito) e una scala di valutazione da 0 a 4, ossia da nullo a grave.

Il veterinario dovrebbe riuscire a compilarla in 4 minuti, un tempo che è pari ad un terzo di quello necessario per la CADESI-03 ed ha una buona affidabilità intra ed inter operatore (Olivry et al., 2014).



**Figura 13. CADESI-04.** Aree corporee valutate con la scala CADESI-04 (Olivry et al., 2014).

### 3.3.1.2 CADLI (Canine Atopic Dermatitis Lesion Index)

La CADLI (Figura 14) è un sistema di valutazione della gravità delle lesioni in un paziente atopico validato per evitare che venissero apportate delle modifiche alla scala CADESI-03 che rendevano poi difficile avere un metro di giudizio attendibile ed estendibile a tutti i pazienti (Olivry et al., 2014).

La stesura di questo sistema di valutazione mira a limitare le aree corporee da analizzare e a sfruttare la capacità di un osservatore esperto di unire in un'unica valutazione il giudizio relativo alla gravità e all'estensione di una lesione (Plant et al., 2012).

È ampiamente praticabile, valida, affidabile, sensibile al cambiamento e conveniente dal punto di vista del tempo richiesto per compilarla (1.9 minuti). Si è dimostrato un alto grado di correlazione con la CADESI-03 e sono paragonabili in termini di affidabilità intra ed inter personale.

La CADLI non dovrebbe venir influenzata dalla presenza/assenza di infezioni cutanee, tuttavia terapie antimicrobiche potrebbero modificare la valutazione, migliorandola. Per questo motivo, idealmente, andrebbe sempre usata in concomitanza con altre scale, come ad esempio la PVAS (Plant et al., 2012).

### Canine Atopic Dermatitis Lesion Index (CADLI)

Score each of the indicated body regions, integrating the severity and extent of the lesion(s) in the area.  
(0 = none; 1 = mild; 2, 3 = moderate; 4, 5 = severe and extensive lesions)  
Consult the CADLI Guide for examples of lesion scoring.

| Body region                | Erythema<br>excoriation<br>erosion<br>0-5 | Alopecia<br>lichenification<br>hyperpigmentation<br>0-5 |
|----------------------------|---|---|
| Head & Pinnae              |   |   |
| Forefeet                   |   |   |
| Hind feet                  |   |   |
| Ventral thorax & Axillae   |   |   |
| Ventral abdomen & Inguinal |   |   |
| Sub-totals<br>0-25         |   |   |
| Total<br>0-50              |   |   |

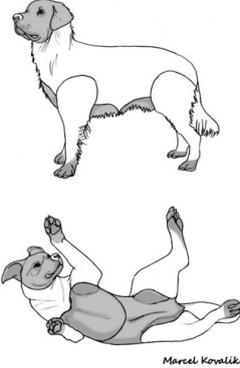


Figura 14. CADLI-Canine Atopic Dermatitis Lesion Index (Plant et al., 2012).

Esistono infine dei metodi di valutazione finalizzati ad analizzare il grado di prurito provato dal paziente, sintomo di per sé alquanto soggettivo, nel modo più oggettivo possibile.

Valutarne la presenza e l'intensità è di fondamentale importanza non solo da un punto di vista diagnostico ma anche di controllo dell'efficacia della terapia mirata a risolverlo.

Non è sempre così semplice stabilirne il grado di gravità, valutazione che richiede anche il parere del proprietario.

Si è cercato di validare un metodo di indagine unico nel corso degli anni, tuttavia non si è ancora trovato quale sia il più attendibile, né in medicina umana né in medicina veterinaria (Hill et al., 2007).

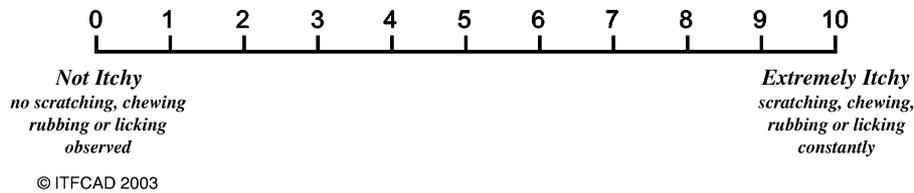
## 3.3.2 METODI DI VALUTAZIONE DELL'INTENSITA' DEL PRURITO

### 3.3.2.1 PVAS (Pruritus Visual Analog Scale)

È un metodo di valutazione visiva con il quale quantificare il grado di prurito del paziente tramite l'attribuzione di un punteggio da 0 a 10, dove 0 indica l'assenza di manifestazioni pruriginose mentre 10 è il grado massimo (Figura 15) (Olivry et al., 2007).

## Pruritus Visual Analog Scale (PVAS)

*During the last 24 hours, my dog was:*



**Figura 15. Scala analogica visuale (Olivry et al., 2007).**

In medicina umana, l'osservazione delle conseguenze indotte dal prurito è una valutazione con forti limiti; si sono quindi validati dei questionari mirati a rilevare alcuni degli aspetti del prurito più eclatanti ed influenti nella vita di tutti i giorni, senza tuttavia arrivare ad un metodo di valutazione attendibile e completo; più ampiamente utilizzate sono le scale numeriche o visive. Alcuni punti di questi questionari (frequenza, intensità e influenza sul sonno) potrebbero essere utili anche come punto di riferimento in medicina veterinaria.

Nel corso degli anni, si è cercato di validare metodi diversi che andavano dalle valutazioni numeriche (Figura 16), alle valutazioni descrittive della gravità del prurito (Figura 17) e dei sintomi comportamentali che da questo derivavano (Figura 18) ed infine alla scala analogica visuale (Figura 19).

Ognuno di questi sistemi presentava dei limiti, dove il più significativo stava nell'impossibilità di delineare delle categorie di gravità per ogni paziente (Hill et al., 2007).

### The numerical scale

If 0 is not itching more than a normal dog, and 5 is the worst itching that you can imagine, how would you score your dog?

Itching includes scratching, biting, licking, chewing, rubbing

**Figura 16. Scala di valutazione numerica del prurito (Hill et al., 2007).**

### The basic severity scale

Which of the following best describes your dog's level of itching?  
Itching includes scratching, biting, licking, chewing, rubbing

- Not itching more than a normal dog
- Very mild itching
- Mild itching
- Moderate itching
- Severe itching
- Extremely severe itching

**Figura 17. Scala di valutazione descrittiva della gravità del prurito (Hill et al., 2007).**

The behaviour-based scale

Which of the following best describes your dog's level of itching?  
Itching includes scratching, biting, licking, chewing, rubbing

- Normal dog  
Not itching more than before the disease began
- Occasional episodes of itching  
Marginal increase in itching compared with before the disease began
- More frequent episodes of itching when the dog is awake  
No itching when sleeping, eating, playing, exercising or otherwise distracted
- Regular episodes of itching occur when the dog is awake  
Itching may occur at night or wake the dog up  
No itching when eating, playing, exercising or otherwise distracted
- Prolonged episodes of itching occur when the dog is awake  
Itching may occur at night or wake the dog up  
Itching may also occur when the dog is eating, playing, exercising or being distracted
- Almost continuous itching  
Itching does not stop when the animal is distracted, even in the consulting room (the dog needs to be physically restrained from itching)

**Figura 18. Scala di valutazione del prurito su base comportamentale** (Hill et al., 2007).

The visual analogue scale

On the following line, draw a mark at the point you think your dog's level of itching lies  
Itching includes scratching, biting, licking, chewing, rubbing

— Extremely itchy – scratching, chewing, licking or rubbing constantly

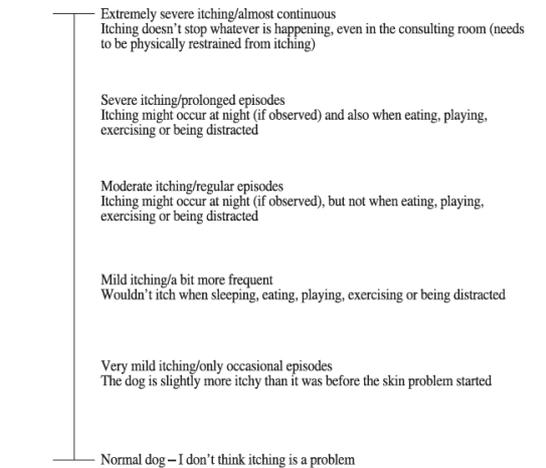
— Not itchy – not scratching, chewing, licking or rubbing more than a normal dog

**Figura 19. Scala analogica visuale** (Hill et al., 2007).

Data la dispersività di quattro sistemi di valutazione a sé stanti e difficilmente integrabili l'un con l'altro, lo studio condotto da Hill e colleghi nel 2007 ha evidenziato, sulla base delle opinioni formulate dai proprietari dei pazienti, che il sistema più performante era quello in cui vi fosse l'applicazione di un sistema di giudizio che prevedeva una commistione delle scale relative alla gravità delle lesioni, delle alterazioni comportamentali indotte dal prurito e infine della scala analogica visuale (Figura 20) (Hill et al., 2007).

**How itchy is your dog?**

This scale is designed to measure the severity of itching in dogs. Itching can include scratching, biting, licking, chewing, nibbling or rubbing. Read all the descriptions below **starting from the bottom**. Then use a marker pen to place a mark anywhere on the vertical line that runs down the left hand side to indicate the point at which you think your dog's level of itchiness lies.



**Figura 20. Scala di valutazione del prurito derivante dall'unione di tre sistemi di indagine diversi (Hill et al., 2007).**

### 3.3.2.2 PICAD (Pruritus Index for Canine Atopic Dermatitis)

Questa scala è la più recente validata per la valutazione delle manifestazioni pruriginose. Permette di dare una valutazione numerica che arriva ad un massimo di 64 punti, assegnando un punteggio variabile, per intensità e frequenza, alle diverse manifestazioni comportamentali (grattamento, leccamento, mordicchiamento) indotte dal prurito nelle aree corporee interessate (Tabella 5) (Carlotti et al., 2009).

| Anatomic area        | Manifestation              | Frequency* |   |   |   |   | Intensity* |   |   |   |     |
|----------------------|----------------------------|------------|---|---|---|---|------------|---|---|---|-----|
| Ears                 | Scratching/shaking         | 0          | 1 | 2 | 3 | 4 | 0          | 1 | 2 | 3 | 4   |
| Head                 | Scratching/rubbing         | 0          | 1 | 2 | 3 | 4 | 0          | 1 | 2 | 3 | 4   |
| Trunk, axillae       | Scratching/rubbing/licking | 0          | 1 | 2 | 3 | 4 | 0          | 1 | 2 | 3 | 4   |
| Ventral abdomen      | Scratching/rubbing/licking | 0          | 1 | 2 | 3 | 4 | 0          | 1 | 2 | 3 | 4   |
| Front feet           | Licking/chewing            | 0          | 1 | 2 | 3 | 4 | 0          | 1 | 2 | 3 | 4   |
| Hind feet            | Licking/chewing            | 0          | 1 | 2 | 3 | 4 | 0          | 1 | 2 | 3 | 4   |
| Limbs and front legs | Licking/chewing            | 0          | 1 | 2 | 3 | 4 | 0          | 1 | 2 | 3 | 4   |
| Ano-genital area     | Rubbing/licking/chewing    | 0          | 1 | 2 | 3 | 4 | 0          | 1 | 2 | 3 | 4   |
| Subtotals            |                            |            |   |   |   |   |            |   |   |   | □32 |
| Total PICAD score    |                            |            |   |   |   |   |            |   |   |   | □64 |

**Tabella 5. PICAD. Scala per la valutazione delle manifestazioni pruriginose (Carlotti et al., 2009).**

### **3.4 EZIOPATOGENESI: CENNI GENERALI**

Ad oggi è ben nota la natura multifattoriale della dermatite atopica canina, tuttavia non si è ancora arrivati ad un quadro generale di conoscenza precisa di tutti i fattori che ne causano l'instaurarsi.

Come già descritto in precedenza, esistono dei fattori predisponenti: la componente genetica, con la predisposizione di alcuni tipi di razze canine e la componente familiare.

Accanto a questi aspetti vanno sempre considerate le malattie parassitarie o virali, l'aspetto alimentare e il continuo incremento di tutti gli allergeni ambientali sia esterni (smog, inquinanti, pollini) che interni alle abitazioni (acari della polvere, fumo di sigaretta), che possono contribuire alla sensibilizzazione del soggetto.

Questa complessa interazione tra fattori genetici e fattori ambientali va ad innescare dei meccanismi di alterazione dell'integrità della barriera cutanea e delle risposte immunologiche anormali in un soggetto predisposto a sviluppare la patologia (Miller et al., 2013).

Nell'ambito della dermatite atopica canina negli ultimi 80 anni si sono compiuti numerosi progressi per quanto riguarda le conoscenze che si sono acquisite in merito alla comprensione della sua complessa eziopatogenesi.

Negli anni 30' era stata descritta per la prima volta e denominata come eczema da Schnelle (Schnelle, 1933). Successivamente, una decina d'anni più tardi, venne rinominata come dermatite allergica da inalanti: era stato pubblicato in merito il caso clinico di un cane la cui anamnesi riportava come sintomi stagionali, protratti per 6 anni, episodi di congiuntiviti, riniti, orticaria del muso e prurito. Il problema regrediva nel momento in cui il paziente veniva condotto in ambienti diversi rispetto a quello dove normalmente risiedeva e dove insorgevano i sintomi, grazie al mancato contatto (per via inalatoria o percutanea) con gli allergeni responsabili.

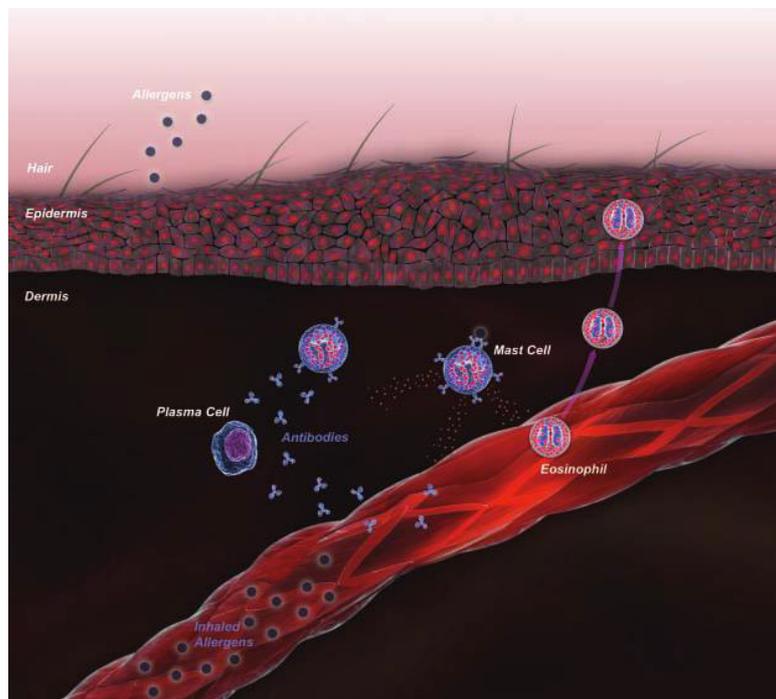
Evidentemente questo soggetto produceva anticorpi allergene-specifici a seguito dell'esposizione ad agenti allergizzanti, che inducevano una sintomatologia clinica a seguito di una loro riesposizione (Wittich, 1941).

È chiaro come la descrizione di quadri clinici simili fosse coerente con reazioni di ipersensibilità di tipo 1, dove la sintomatologia prevalente consiste in: asma, congiuntivite, orticaria, prurito, reazioni anafilattiche e possibile angioedema. Questo tipo di reazione prevede il rilascio di istamina da parte di mastociti e basofili. L'istamina è un mediatore che ha sempre avuto un ruolo controverso nell'eziopatogenesi della dermatite atopica canina, dal momento che i suoi livelli non presentavano

differenze statisticamente significative nei soggetti sani rispetto ai soggetti atopici (Brazis et al., 1998).

Solo a metà degli anni '60 Schwartzman raggruppò questi soggetti, affetti da sintomi alle basse vie respiratorie e prurito, sotto la categoria di pazienti atopici, per i quali il meccanismo eziopatogenetico alla base dell'insorgenza della patologia era quindi il seguente: il contatto (inalatorio o percutaneo) con un agente allergizzante ambientale stimolava la produzione di anticorpi IgE allergene-specifici, i quali andavano a legarsi con mastociti e basofili nel derma.

Una successiva riesposizione all'agente allergizzante determinava la degranulazione di queste cellule con successivo rilascio dei mediatori infiammatori e citochine responsabili dell'eritema e del prurito (Figura 21) (Swartzman, 1965).



**Figura 21. Meccanismo fisiopatologico storicamente accettato della dermatite atopica canina** (Marsella et al., 2012).

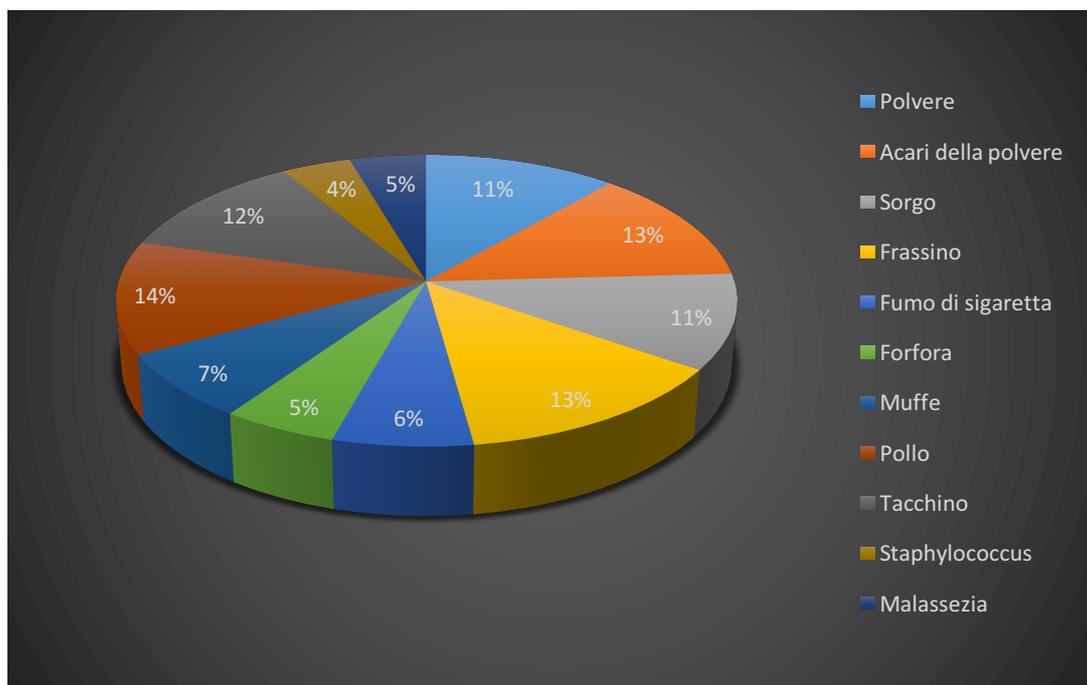
Se nel 2001 la dermatite atopica canina era definita “*predisposizione genetica a sviluppare fenomeni allergici IgE –mediati nei confronti di allergeni ambientali*” (Olivry et al., 2001), nel 2006 si arriva alla definizione ancora tutt’oggi utilizzata, ossia “*patologia cutanea allergica, pruriginosa ed infiammatoria a predisposizione genetica con caratteristiche cliniche peculiari associate ad IgE frequentemente dirette contro allergeni ambientali*” (Halliwell, 2006).

Grazie ai test laboratoristici, di intradermoreazione e sierologici, si era arrivati a stabilire quali allergeni fossero quelli verso i quali più di frequente i pazienti risultavano sensibili; spesso, gli allergeni variano a seconda della regione geografica, del clima, delle condizioni ambientali, igieniche e di inquinamento esterne oltre che dell'ambiente casalingo in cui il soggetto vive (Figura 22).

Tra gli allergeni ambientali il tasso di sensibilizzazione risulta più elevato verso la polvere e le glicoproteine degli acari della polvere del genere *Dermatofagoides spp.* con, rispettivamente, il 55.2% e il 61.4% dei pazienti risultati sensibili. Tra gli aeroallergeni ambientali esterni risultano più impattanti i pollini (Hill et Deboer, 2001; Kang et al., 2014).

La possibilità che vi sia un'ipersensibilità anche nei confronti di allergeni alimentari ha portato all'evidenza che tra gli alimenti più a rischio vi siano il pollo, il tacchino, il riso, la soia e il lievito di birra (Kang et al., 2014).

Infine, a causa delle frequenti infezioni secondarie che possono insorgere in un soggetto atopico è utile considerare anche la possibilità di una sensibilizzazione nei confronti degli antigeni di patogeni quali *Staphylococci* e *Malassezia* (Deboer et Marsella, 2001; Kang et al., 2014).



**Figura 22. Tassi di sensibilizzazione nei confronti di diverse famiglie di allergeni (Kang et al., 2014).**

Tuttavia, ci sono pazienti (sia in medicina umana che in medicina veterinaria) che manifestano la sintomatologia tipica della dermatite atopica, ma effettuando sugli stessi i test di laboratorio non vengono rilevate IgE allergene-specifiche; questi sono i cosiddetti pazienti "atopic-like" (Halliwell, 2006).

Questi pazienti in medicina umana sono circa il 10% e la forma di dermatite atopica che ne descrive la condizione clinica prende il nome di intrinseca o non allergica (Tabella 6) (Tokura Y., 2010).

Le spiegazioni che si sono date a questo fenomeno sono varie:

1. È possibile che questi soggetti siano sensibili verso forme di allergeni minori e verso i quali non si siano condotte le specifiche ricerche sierologiche;
2. potrebbero essere pazienti in uno stadio ancora iniziale della patologia, dove le IgE allergene-specifiche non sono identificabili perché la sensibilizzazione non è ancora avvenuta;
3. il meccanismo eziopatogenetico di base potrebbe essere indipendente dalla cascata IgE-dipendente.

Questo, assieme alla considerazione che anche in soggetti clinicamente normali possono essere rilevate IgE-allergene specifiche sottolinea come la valutazione della quantità di questi anticorpi non sia discriminante nel diagnosticare la malattia e che, nonostante sia probabile che le IgE rivestano un ruolo di fondamentale importanza nella patogenesi della dermatite atopica, tuttavia non siano gli unici fattori che ne sono responsabili (Hill et al., 1995; DeBoer et Hill, 1999; Marsella et al., 2012).

Di recente, fondamentale si è rivelato il ruolo riconosciuto alle alterazioni della barriera cutanea nell'eziopatogenesi della dermatite atopica.

A differenza della medicina veterinaria dove gli studi sono ancora all'inizio, l'importanza di questo aspetto era già stata identificata in medicina umana: in passato difetti primari della barriera cutanea erano stati documentati, avvalorati poi dalla più recente identificazione di mutazioni a carico del gene della filaggrina (*FLG*). La sua diminuita espressione è considerata oggi il più importante fattore di rischio per l'insorgenza della dermatite atopica umana.

Questa mutazione associata a degli eventi ambientali stressanti porta ad una maggior facilità di penetrazione degli allergeni attraverso la cute; questo stimola una risposta mediata dai linfociti T helper 2, che a sua volta aggrava la condizione di una barriera cutanea già alterata (Cork et al., 2009; Elias et al., 2009).

Inoltre, sempre in medicina umana, sono stati identificati cambiamenti ultrastrutturali e funzionali della cute, indagati poi anche in medicina veterinaria portando alla luce risultati interessanti: queste

anomalie porterebbero alla perdita dell'integrità della struttura cutanea e ad un aumento della sua permeabilità, favorendo un ingresso facilitato a tutte quelle sostanze potenzialmente dannose.

In un soggetto sano, le ceramidi, molecole lipidiche dello strato corneo, sono quelle presenti normalmente in concentrazioni maggiori rispetto al colesterolo e agli acidi grassi.

Nei pazienti umani affetti da dermatite atopica sia nelle zone in cui la cute è danneggiata sia dove non lo è, si è rilevata:

- una carenza di attività degli enzimi che ne sono deputati alla biosintesi come la sfingomielinasi;
- una carenza della sostanza glicosilceramide necessaria alle sintesi delle ceramidi stesse;
- un'aumentata attività del complesso enzimatico sfingomielina glicosilceramide deacilasi che riduce la quantità di ceramidi presenti.

Sono invece ancora troppo esigui gli studi condotti in medicina veterinaria per quantificare con sicurezza la reale carenza di ceramidi nella cute di un soggetto atopico, tuttavia gli studi preliminari effettuati hanno confermato questa ipotesi rinvenendo un quantitativo di ceramidi, sia libere sia legate alla componente proteica, ridotto ed associato tuttavia ad un aumento della percentuale di colesterolo.

Si è poi posta l'attenzione sulla componente proteica, promuovendo degli studi genetici che hanno messo in luce una diminuita espressione del gene della proteina filaggrina, fondamentale per mantenere l'umidità della cute e la cui assenza ne determina una maggiore secchezza e permeabilità.

Tuttavia è di notevole importanza il fatto che l'espressione del gene può essere diminuita anche dalla presenza di citochine mediate da una risposta immunitaria Th2: non è quindi determinante solo la componente epigenetica ma può esserlo anche il fenomeno infiammatorio.

È oramai consolidato nell'uomo che la carenza di questa proteina predisponga ad una sensibilizzazione precoce e allo sviluppo di una dermatite atopica nella forma estrinseca che persiste anche in età adulta.

Nel cane questa evidenza non è stata rinvenuta in modo così consistente: sono stati condotti solamente alcuni studi a riguardo, nei quali comunque l'influenza della proteina nell'insorgenza della patologia non può essere esclusa.

Infine tra le modificazioni ultrastrutturali evidenziate in pazienti umani affetti da dermatite atopica vi è l'incapacità di estrusione dei corpi lamellari dai corneociti, i quali inoltre appaiono anche essere presenti in numero più esiguo e disposti in modo irregolare rispetto a quanto si rileva in un soggetto sano. Questo è un dato confermato anche in medicina veterinaria, dove inoltre si è anche documentata la produzione di abbondante materiale lipidico amorfo riversato negli spazi intercellulari nella parte più profonda dello strato corneo, che causa la separazione dei corneociti (Tabella 6) (Marsella et al., 2011; Santoro et al., 2015).

In generale, tra i quesiti ancora irrisolti ci si domanda se le disfunzioni primarie a carico della barriera cutanea siano la causa scatenante la malattia o siano l'effetto che l'infiammazione ha sulla cute, che va ad esacerbare una condizione già preesistente (Marsella et al., 2011).

Fino a non molto tempo fa si pensava che alla base della dermatite atopica vi fosse un'alterazione genetica del sistema immunitario che portava a risposte immunologiche alterate (*"outside – inside" theory*), integrata poi con l'ipotesi secondo cui anche la barriera cutanea giocasse un ruolo importante nel determinare lo scatenare della patologia (*"inside – outside" theory*): quest'ultima teoria supportava la tesi secondo cui una cute alterata favorisse l'ingresso di allergeni attraverso l'epidermide, i quali andavano a legarsi alle cellule immunitarie epidermiche, promuovendo una risposta mediata dai Th2 che peggiora le condizioni della barriera cutanea.

In questo senso nessuna delle due ipotesi esclude l'altra, motivo per cui si è elaborata una terza teoria omnicomprensiva: *"outside – inside – outside" theory*.

Si tratta di un circolo vizioso, in cui ad una prima alterazione della cute a cui segue l'ingresso di patogeni stimolanti l'immunità locale, consegue poi il rilascio di mediatori infiammatori che esacerbano ulteriormente le disfunzioni della barriera cutanea, minandone l'integrità (Santoro et al., 2015).

|   | <u>DERMATITE ATOPICA CANINA</u>  | <u>DERMATITE ATOPICA UMANA</u>  |
|---|--|---|
| <u>DEFINIZIONE</u>                                  | <i>“Patologia cutanea allergica, pruriginosa ed infiammatoria a predisposizione genetica con caratteristiche cliniche peculiari associate ad IgE frequentemente dirette contro allergeni ambientali”</i>   | <i>“Infiammazione immuno–mediata della cute causata dall’interazione tra fattori genetici e ambientali”</i>   |
| <u>TIPI DI ATOPIA</u>                               | -  | - <u>ESTRINSECA</u> (70-80%): manifesta alti livelli di IgE totali sieriche e la presenza di IgE specifiche contro allergeni ambientali e alimentari.<br><br>- <u>INTRINSECA</u> (10-20%): presenta valori normali di IgE totali e assenza di IgE specifiche.   |
| <u>SINTOMATOLOGIA</u>                               | Prurito, sintomatologia cutanea, raramente rinite allergica stagionale o asma.   | “Triade clinica”: rinite allergica, asma e sintomatologia cutanea (eritema e prurito).  |
| <u>ALTERAZIONI DELLA BARRIERA CUTANEA</u>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alterazioni dello strato corneo: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Produzione di materiale amorfo lipidico;</li> <li>2. Ritenzione dei corpi lamellari nei corneociti;</li> <li>3. irregolarità e frammentazione delle lamelle lipidiche.</li> </ol> </li> <li>- Aumento della perdita d’acqua transepidermica.</li> <li>- ↓ delle ceramidi epidermiche e ↑ del colesterolo.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Alterazioni dello strato corneo: <ol style="list-style-type: none"> <li>1. ritenzione dei corpi lamellari dei corneociti;</li> <li>2. Alterazione delle dimensioni delle lamelle lipidiche;</li> <li>3. Disposizione anomala delle lamelle lipidiche.</li> </ol> </li> <li>- Aumento della perdita d’acqua transepidermica.</li> <li>- ↓ biosintesi delle glicosilceramidi e ↓ attività delle sfingomielinasi.</li> <li>- ↑ attività enzimatica della sfingomielina glicosilceramide deacilasi.</li> <li>- Ridotta espressione del gene della filaggrina.</li> </ul> |
| <u>METODI DI VALUTAZIONE DELLA BARRIERA CUTANEA</u> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pareri controversi sull’efficacia della TEWL.</li> <li>- Capacitanza cutanea.</li> </ul>  | <ul style="list-style-type: none"> <li>- TEWL: Transepidermal water loss; tanto più grave è l’AD tanto maggiore è il valore di TEWL.</li> <li>- Capacitanza cutanea.</li> </ul>   |

**Tabella 6.** Confronto delle anomalie della barriera cutanea nel cane e nell'uomo (Halliwell, 2006; Tokura Y., 2010; Marsella et al., 2011; Santoro et al., 2015).

Potrebbe essere interessante valutare se il danno a carico della barriera cutanea sia primario o secondario anche da un altro punto di vista: nel primo caso nemmeno a seguito di trattamento si otterrebbe un miglioramento della patologia dato che la causa primaria non è risolvibile a monte, mentre nel secondo caso ci si potrebbe aspettare un miglioramento dovuto alla risoluzione di un'inflammazione che aggrava un quadro preesistente (Marsella et al., 2011).

Se venisse provata l'importanza di questo aspetto patogenetico nel cane come già è stato dimostrato nell'uomo, diverso sarebbe anche l'approccio terapeutico, orientato cioè verso il ripristino della cute con dei trattamenti preventivi l'insorgenza della patologia.

Ad esempio, nell'uomo il miglioramento ultrastrutturale derivante da una terapia topica con ceramidi è già stato dimostrato essere correlato ad un miglioramento clinico (Elias, 2008(a); Elias 2008(b); Chamlin et al., 2001).

Oltre alle anomalie di struttura e di funzione della barriera cutanea, al centro della dermatite atopica canina risultano esserci tutte le alterazioni rilevate a carico del sistema immunitario e dei suoi componenti (cellule dendritiche cutanee, linfociti T, citochine, mediatori dell'inflammazione). Questo aspetto verrà trattato nel dettaglio nel capitolo 4.

### **3.5 DIAGNOSI**

La diagnosi di dermatite atopica è clinica, sebbene non esistano segni patognomonic della malattia. Ciò è dovuto alle diverse sfumature con cui la patologia può manifestarsi che possono dipendere da cause genetiche associate ad una razza in particolare, all'estensione e allo stadio delle lesioni, all'eventuale presenza di infezioni microbiche secondarie o ad altri fattori perpetuanti.

L'ottenere una diagnosi passa attraverso vari step dove è necessario vengano approfonditi gli aspetti relativi all'anamnesi del paziente, è fondamentale venga condotto un accurato esame clinico con associati test diagnostici (i.e. citologia) e valutare la risposta ad eventuali trattamenti (Hensel et al., 2015).

Ottenuta una diagnosi clinica, attraverso i metodi e l'iter che vedremo nel proseguo di questo capitolo, si possono eseguire test diagnostici, i test allergologici, volti non tanto a fare diagnosi quanto a confermare un sospetto preesistente ed eventualmente utili nell'impostare un piano terapeutico mirato tramite l'immunoterapia (DeBoer et Hillier, 2001(a); Favrot et al., 2010; Miller et al., 2013).

A sostegno della diagnosi possono poi essere eseguite delle biopsie cutanee mirate a confermare il quadro clinico infiammatorio di dermatite atopica attraverso esami istopatologici (Olivry et Hill., 2001).

### 3.5.1 DIAGNOSI CLINICA

Nel corso degli anni sono stati elaborati alcuni criteri grazie ai quali proporre una diagnosi clinica di dermatite atopica.

Nel 1986 vengono proposti i criteri di Willemse che fungono da substrato sul quale nel 1998 vengono pubblicati poi i criteri di Prélaid (Tabella 7).

I criteri di Prélaid mostrano una specificità e una sensibilità di circa l'80% tuttavia nessuno dei due sistemi risulta adeguato per impostare una diagnosi (DeBoer et Hillier, 2001(a)).

| Canine AD   |  |
|---|--|
| Willemse (1986, 1988)   | Prélaid et al. (1998)  |
| <i>Major features</i>   | <i>Major criteria</i>  |
| Patient must have at least three of the following features:   | Patient must have at least three out of the following five features: |
| Pruritus  | Corticosteroid-sensitive pruritus                                    |
| Typical morphology and distribution:  | Erythema of pinnae   |
| Facial and/or digital involvement or  | Bilateral cranial erythematous pododermatitis                        |
| Lichenification of the flexor surface of the tarsal joint and/or the extensor surface of the carpal joint | Cheilitis  |
| Chronic or chronic-relapsing dermatitis   | Appearance of first signs between the ages of 6 months and 3 years   |
| Individual or family history of atopy, and/or breed predisposition  |  |
| <i>Minor features</i>   |  |
| At least three of the following features also should be present:  |  |
| Onset of symptoms before 3 years  |  |
| Facial erythema and cheilitis   |  |
| Bacterial conjunctivitis  |  |
| Superficial staphylococcal pyoderma   |  |
| Hyperhidrosis   |  |
| Immediate positive intradermal test to inhalants  |  |
| Elevated serum allergen-specific IgE  |  |
| Elevated serum allergen-specific IgGd   |  |

**Tabella 7. Criteri di Willemse e di Prélaid.** (Willemse, 1986; Prélaid et al., 1998).

A questi poi segue la pubblicazione dei criteri di Favrot (2010) selezionati e validati su un ampio numero di campioni (Favrot et al., 2010).

I parametri che si vanno a considerare sono i seguenti:

1. Et  di insorgenza della patologia < 3 anni;
2. vita per lo pi  indoor;
3. prurito responsivo agli steroidi;
4. all'inizio il prurito   sine materia (prurito in assenza di lesioni);
5. coinvolgimento della regione dorsale delle estremit  degli arti;
6. coinvolgimento dei padiglioni auricolari;
7. margini dei padiglioni auricolari non coinvolti;
8. area dorso – lombare non coinvolta.

Se di questi 8 criteri 5 risultano positivi, la sensibilit  si avvicina all'85% e la specificit  al 79% nel fare diagnosi di dermatite atopica (Tabella 8) (Favrot et al., 2010).

| CAD dogs   |       |            |       |
|------------|-------|------------|-------|
| 5 criteria |       | 6 criteria |       |
| sens.      | spec. | sens.      | spec. |
| 0.854      | 0.791 | 0.582      | 0.885 |

**Tabella 8. Sensibilit  e specificit  dei criteri di Favrot nella diagnosi di dermatite atopica canina** (Favrot et al., 2010).

Idealmente questi criteri, anche se soddisfatti dal paziente, non dovrebbero mai essere utilizzati come unico strumento diagnostico ma affiancati ad un buon esame clinico e proposti dopo aver escluso le altre possibili diagnosi differenziali: non   infrequente che alcuni sintomi, come ad esempio il prurito, siano tipici anche di altre patologie allergiche, come le allergie alimentari (DeBoer et Hillier, 2001(a)). Di conseguenza,   opportuno escludere tutte quelle patologie nelle quali i segni clinici siano simili, se non addirittura sovrapponibili, a quelli della dermatite atopica.

In primis si esclude la presenza di ectoparassiti (*Demodex spp.*, *Sarcoptes spp.*, *Cheyletiella spp.*) e la dermatite allergica al morso di pulce, tramite trattamenti antiparassitari mirati. Quest'ultima presenta tendenzialmente una localizzazione delle lesioni lombosacrale, tuttavia, nel caso in cui vi fosse un'ipersensibilit  al morso della pulce bisogna sempre fare attenzione che potrebbe essere un fenomeno concomitante alla dermatite atopica stessa (Hensel et al., 2015).

Si prosegue quindi escludendo la presenza di eventuali infezioni batteriche o sovraccrescita di lieviti che macroscopicamente appaiono solitamente come eruzioni papulo-pustolari o collaretti epidermici che tuttavia vanno poi confermati tramite tecniche di citologia su scotch o per impronta, raschiati cutanei o colture per i dermatofiti.

La difficoltà di riuscire ad ottenere una distinzione clinica in soggetti affetti da dermatite atopica indotta da allergeni ambientali piuttosto che da allergeni alimentari, soprattutto qualora presentino una sintomatologia annuale, richiede che per escludere che l'allergene scatenante la patologia sia di origine alimentare venga consigliata al proprietario una dieta ad eliminazione, contenente ingredienti ai quali il cane non è mai stato presumibilmente esposto, della durata di 8-10 settimane, alla fine delle quali proporre un test di provocazione con la vecchia dieta e valutare se era la causa responsabile del sintomo prurito (Miller et al., 2013).

La diagnosi di questa patologia dovrebbe essere esclusivamente clinica, perché la diagnosi laboratoristica, con il test di intradermoreazione o i test sierologici, non si è dimostrata affidabile nel rilevare allergeni di origine alimentare (Mueller et al., 1998; DeBoer et Hillier, 2001(a)).

Bisogna comunque sempre ricordare l'aspetto multifattoriale della dermatite atopica: molto spesso si tende ad associare una patologia con una razza specifica. Evidentemente, alcuni parametri (età di insorgenza, sesso e localizzazione delle lesioni) possono correlarsi per frequenza ad alcune razze (Boxer, Golder Retriever, Sharpei, ...), tuttavia non può considerarsi come aspetto unico ed inequivocabile per fare una diagnosi attendibile, a causa di tutti gli altri fattori concomitanti che possono scatenare la malattia (Wilhem et al., 2011).

### **3.5.2 DIAGNOSI LABORATORISTICA**

In medicina veterinaria i test diagnostici più utilizzati sono l'intradermoreazione e i test sierologici. Entrambi sono dei test non completamente sensibili e specifici, tant'è che animali privi di sintomatologia clinica potrebbero presentare alti livelli di IgE, viceversa animali con manifestazioni cliniche evidenti non dimostrarli, i cosiddetti "atopic like".

Andrebbero quindi proposti solo in presenza di un forte sospetto clinico di allergia quando i segni clinici sono particolarmente gravi ed hanno una durata superiore ai tre mesi all'anno oppure non vi è una sufficiente ed accettabile gestione del paziente attraverso una terapia sintomatica.

Sicuramente possono essere utili per impostare un'immunoterapia specifica verso gli allergeni scatenanti la patologia ed eventualmente proporre al proprietario dei sistemi per evitare che il proprio animale domestico ne entri a contatto diretto (Deboer et Hillier, 2001(b)).

### 3.5.2.1 INTRADERMOREAZIONE (IDT o INTRADERMOREACTION)

Questo test è mirato a dimostrare la presenza di un'ipersensibilità mediata da IgE allergene-specifiche. Si basa sulla capacità di degranolazione dei mastociti cutanei, a cui l'IgE è legata, dopo esposizione all'allergene (Codner and Griffin, 1999).

Presenta una sensibilità molto bassa (10-33%) ed una specificità variabile (50-95%). Può essere considerato utile se eseguito con dei set di allergeni specifici e standardizzati.

Era fra i test più usati in medicina veterinaria, al contrario della medicina umana per i costi maggiori, il maggior discomfort e l'aumentato rischio di reazioni sistemiche, tuttavia è stato progressivamente abbandonato (Hillier et DeBoer, 2001).

Questo test prevede l'inoculazione di allergeni diluiti a livello sottocutaneo, previa tricotomia, in regioni corporee variabili da paziente a paziente; il sito d'elezione sarebbe la regione laterale del torace.

Le positività si evidenziano con la comparsa di pomfi di 15-20 mm di diametro dopo un tempo variabile tra i 15 e i 30 minuti (Miller et al., 2013).

L'interpretazione dei risultati si basa sull'assegnazione di un punteggio da 0 a 4, dove 0 equivale alla reazione osservata nel controllo negativo (sol. salina), mentre 4 nel controllo positivo (istamina): qualsiasi punteggio superiore o uguale a 2 è considerato come una positività (Hillier et DeBoer, 2001).

In medicina umana uno dei test cutanei più usati è il prick test, semplice, rapido, di facile interpretazione, specifico e con un rischio ridotto di reazioni avverse. Non viene utilizzato in medicina veterinaria per mancanza di studi che ne attestino l'utilità e la praticità; inoltre ci sarebbe bisogno di dosi elevatissime di allergene per ottenere dei risultati equiparabili ai test di intradermoreazione.

Il patch test in medicina umana si è visto dare delle reazioni allergiche che sono equiparabili alle manifestazioni cliniche di dermatite atopica, tramite l'applicazione epicutanea di aeroallergeni. Non ci sono ancora abbastanza studi a riguardo per la medicina veterinaria, tuttavia uno studio condotto nel 1988 ha portato all'evidenza che il contatto epicutaneo di allergeni poteva portare a dei fenomeni infiammatori cutanei microscopici, rendendo il test un'ulteriore possibilità diagnostica (Hillier et DeBoer, 2001). Diverso è per la diagnosi di reazione avversa al cibo: è stato visto che se, tramite questo test, un allergene non scatena una reazione sul paziente potrebbe essere una buona scelta includerlo nella dieta ad eliminazione (Bethlehem et al., 2012)

L'esecuzione e l'interpretazione dei risultati ottenuti dall'intradermoreazione richiedono un certo grado di esperienza e di prestare attenzione a diversi aspetti per rendere la prova quanto più affidabile possibile:

1. Il numero e la quantità di allergeni ottimali per eseguire il test vanno valutati da paziente a paziente, considerando le condizioni ambientali e climatiche dell'ambiente in cui vive. Bisogna inoltre prestare attenzione alla preparazione, alla conservazione e all'utilizzo degli allergeni per evitare che perdano di efficacia;
2. il test andrebbe effettuato con cadenza annuale scegliendo una batteria di allergeni che più di frequente possono essere responsabili di allergia (Hillier et DeBoer, 2001). Tra gli allergeni più comuni nel cane si annoverano la polvere, gli acari della polvere, piume, muffe e graminacee (Miller et al., 2013);
3. per avere dei risultati standardizzati bisognerebbe chiedere alle compagnie, dalle quali si acquistano i kit, i vari allergeni presenti con le relative concentrazioni e la quantificazione dell'attività allergenica totale. Questo in medicina umana è già stato ottenuto, mentre non ci sono ancora estratti standardizzati per la medicina veterinaria;
4. non è consigliato somministrare dei mix di allergeni, perché i vari elementi potrebbero essere troppo diluiti per indurre la reazione allergica o perché il paziente potrebbe essere allergico ad uno soltanto dei costituenti ma potrebbero essere indotte anche delle nuove allergie.  
Gli studi eseguiti non sono concordi totalmente nel dimostrare una correlazione negativa o positiva tra le reazioni positive del paziente ad allergeni individuali piuttosto che misti. Come principio generale bisognerebbe evitare di creare dei mix tra allergeni che non presentano un'alta cross-reattività, perché gli uni potrebbero interferire sull'attività biologica degli altri, diminuendola, quindi rendendo inefficace il test;
5. Il paziente non dovrebbe assumere antistaminici da almeno 10 giorni prima dell'esecuzione del test e corticosteroidi orali da almeno 3 settimane e 8 settimane per quelli iniettabili; al momento dell'esecuzione del test il paziente non dovrebbe essere stressato per evitare

l'aumento del cortisolo né sedato; tuttavia, nel caso in cui ve ne fosse la necessità, vanno evitati gli oppioidi, le benzodiazepine, il propofol e l'acepromazina;

6. se il paziente presenta una patologia stagionale, ideale sarebbe eseguire il test alla fine o entro due mesi dal picco stagionale;
7. nel caso in cui il paziente fosse affetto da infezioni cutanee la prova va condotta a debita distanza dall'area interessata per evitare di falsare i risultati (Hillier et Deboer, 2001).

| <b>FALSI POSITIVI</b>   | <b>FALSI NEGATIVI</b>   |
|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Errori nella preparazione degli estratti allergenici (concentrazioni troppo alte o contaminazioni);</li> <li>➤ tecnica errata di esecuzione;</li> <li>➤ cute irritabile;</li> <li>➤ ipersensibilità subclinica.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Tecnica errata di esecuzione;</li> <li>➤ bassa concentrazione e/o impropria selezione degli allergeni principali;</li> <li>➤ interferenza con dei farmaci assunti dal paziente;</li> <li>➤ fattori legati al paziente;</li> <li>➤ test eseguito troppo tardi rispetto al picco stagionale;</li> <li>➤ soggetti "atopic like".</li> </ul> |

**Tabella 9.** Falsi positivi o negativi al test di intradermoreazione (Hillier et Deboer, 2001; Hensel et al., 2015).

### 3.5.2.2 TEST SIEROLOGICI

I test sierologici vengono usati per determinare le IgE allergene-specifiche ma la loro presenza, in qualsiasi quantità, non è comunque sinonimo di allergia.

Non sono test completamente sensibili né specifici e presentano una correlazione solo parziale con i test di intradermoreazione; in uno studio condotto su 84 soggetti (Mueller et al., 1999) si è attestata una sensibilità pari al 90% e una specificità pari al 92%.

Esistono due tipi di test sierologici: quelli che quantificano le IgE totali e quelli che misurano le IgE allergene-specifiche, quest'ultimo unico momentaneamente disponibile per la medicina veterinaria.

Quantificare le IgE sembra non essere di aiuto nella diagnosi di dermatite atopica perché non permette di rilevare delle concentrazioni di IgE con differenze sostanziali tra i pazienti adulti sani e atopici.

Anche nei cuccioli, sebbene presentino livelli marcatamente diversi tra individui atopici e non, non risulta essere di aiuto nel predire l'insorgenza della dermatite atopica in età più avanzata (DeBoer et Hillier, 2001(b)).

La determinazione di IgE specifiche viene eseguita mediante l'uso di pannelli di allergeni che più comunemente sono i responsabili di allergia: pollini, muffe, polvere e allergeni epidermici.

Esistono metodi diversi per eseguire il test (prova di radioallergoadsorbimento, test ELISA o test immunoenzimatico) tuttavia il principio alla base è lo stesso: in una prima fase il siero del paziente è fatto reagire con un estratto allergenico individuale, quindi fissato su un substrato in fase solida o liquida. Gli anticorpi rimasti liberi vengono quindi eliminati e quelli legati vengono rilevati con dei reagenti specifici, precedentemente associati ad enzimi o a radioisotopi. Infine, attraverso il metodo colorimetrico, fluorimetrico o radiometrico si procede con la quantificazione delle IgE legate all'agente specifico (DeBoer et Hillier, 2001(b)).

Rispetto all'intradermoreazione, i test sierologici presentano dei vantaggi: la possibilità di eseguirli a livello ambulatoriale, data l'esistenza di kit commerciali disponibili, richiedono il prelievo di un unico campione di sangue per l'analisi del siero, il cane può essere testato anche con una condizione di dermatite generalizzata e presenta minori problemi relativamente ai tempi di sospensione di eventuali terapie cui il paziente è sottoposto (Tabella 10) (Olivry et Saridomichelakis, 2013).

È una valutazione quantitativa che quindi non richiede un'interpretazione soggettiva dei risultati ottenuti (Codner et Griffin, 1999).

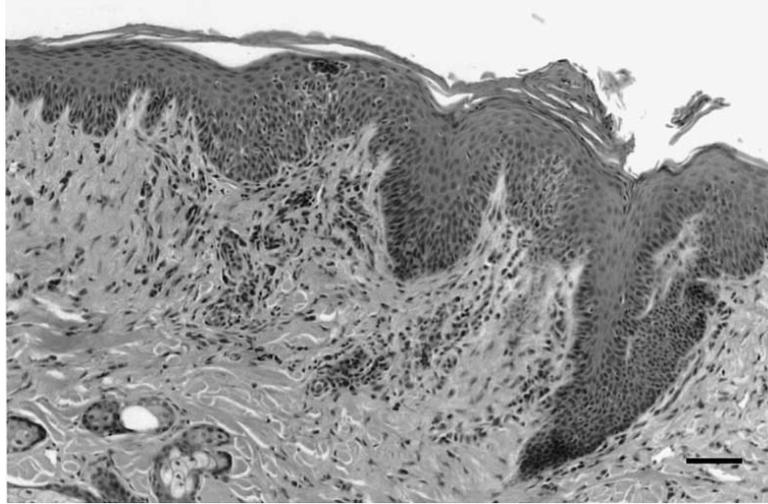
|                                       | <b>IDT</b>       | <b>ASIS</b>    |
|---------------------------------------|------------------|----------------|
| <b>Antiistaminici</b>                 | 7 giorni         | Non necessario |
| <b>Corticosteroidi a breve azione</b> | 14 giorni        | Non necessario |
| <b>Corticosteroidi a lunga azione</b> | Almeno 28 giorni | < 28 giorni    |
| <b>Corticosteroidi topici</b>         | 14 giorni        | Non necessario |
| <b>Ciclosporina</b>                   | Non necessario   | Non necessario |
| <b>Pentossifillina</b>                | Non necessario   | -              |

**Tabella 10. Tempi di sospensione di farmaci antiinfiammatori prima di eseguire i test laboratoristici (Olivry et Saridomichelakis, 2013).**

### **3.5.3 DIAGNOSI ISTOPATOLOGICA**

L'esame istopatologico dovrebbe venir eseguito prelevando biopsie da aree cutanee eritematose, dove gli autotraumatismi sono minimi. Non andrebbero considerare invece aree di lichenificazione e iperpigmentazione cronica, complicate da piodermiti secondarie (Gross et al., 2005)

Il quadro clinico infiammatorio tipico della dermatite atopica canina viene confermato dal pattern istologico di dermatite cronica perivascolare mista iperplastica e spongiotica (Olivry et al., 1997(b)). Da un punto di vista istopatologico si evidenziano acantosi da lieve a grave, un'iperplasia dell'epidermide, ipercheratosi ortocheratotica e paracheratotica, ipergranulosi, spongiosi, melanosi ed esocitosi leucocitica. I vasi sanguigni dermici sono spesso dilatati e possono apparire congesti. Le ghiandole sebacee e sudoripare appaiono ingrossate e il loro epitelio è iperplastico (Gross et al., 2005).



**Figura 23. Reperto istopatologico di dermatite superficiale perivascolare iperplastica e spongiotica (Olivry et al., 1997(b)).**

Le cellule caratterizzanti l'infiltrato perivascolare sono linfociti T, cellule dendritiche, eosinofili e mastociti iperplastici mentre quelle presenti nell'infiltrato dell'epidermide sono cellule T, cellule del Langherans e alcuni eosinofili. Neutrofili e plasma cellule si evidenziano in misura minore, soprattutto evidenti nel caso di infezioni secondarie (Figura 23) (Olivry et Hill, 2001(a)).

Come nelle lesioni caratterizzate in medicina umana, anche in medicina veterinaria si sono evidenziate cellule dendritiche IgE<sup>+</sup> a conferma del loro ruolo nella cattura dell'antigene.

Tra le lesioni più caratterizzanti le papule evidenziato un accumulo di linfociti (deputati alla cattura locale dell'antigene) (Marsella et al., 2006).

### **3.6 CENNI DI TERAPIA GENERALE**

A causa della natura multifattoriale della dermatite atopica canina, della risposta soggettiva dei pazienti ai trattamenti e delle lacune ancora presenti nella comprensione della sua eziopatogenesi, ad oggi, risulta complicato formulare un unico protocollo terapeutico applicabile a qualsiasi paziente affetto da questo patologia.

Non esiste un singolo iter terapeutico da seguire, mirato a risolvere totalmente e permanentemente il problema. Sono state stilate piuttosto delle linee guida che prevedono una gestione razionale a lungo termine di quelle che sono le diverse manifestazioni della patologia, sulla base delle esigenze del paziente.

Ogni aspetto della terapia è mirato a correggere e/o ad eliminare la causa scatenante la manifestazione clinica e controllare i fattori di riacutizzazione, quali infezioni secondarie sostenute da batteri o da sovraccrescimento di lieviti e le ectoparassitosi: di conseguenza, può essere

necessario lavorare solo sulla prevenzione, proporre un'unica terapia sintomatica, che quasi mai è la via più sicura ed efficace dal punto di vista dei risultati, oppure lavorare combinando più protocolli terapeutici, rendendo quindi possibile ridurre al minimo l'impiego di farmaci che potrebbero scatenare successivi effetti collaterali dannosi per il paziente.

L'obiettivo finale deve essere quello di ridare all'animale una qualità di vita accettabile, alleviando il più possibile il grado di discomfort che può derivare dalla malattia e dalle sue molteplici manifestazioni.

### ➤ **Identificazione e controllo dei fattori scatenanti**

Tra i principali fattori di rischio riconosciuti come possibile causa di dermatite atopica canina si annoverano gli allergeni ambientali (soprattutto le glicoproteine degli acari della polvere e i pollini), allergeni alimentari e gli antigeni contenuti nella saliva della pulce (Hill et DeBoer, 2001).

Dopo che si sono identificati l'allergene o gli allergeni direttamente responsabili, come spiegato nel paragrafo dedicato alla diagnosi, bisognerebbe eliminare quegli elementi che presumibilmente scatenano la malattia o evitare che l'animale ne entri a contatto. In alcuni casi, come per quei soggetti che presentano ipersensibilità multiple, è un'operazione estremamente complessa, se non addirittura impossibile (Miller et al., 2013).

Non è facile gestire questo aspetto soprattutto per quanto riguarda gli aeroallergeni: il proprietario dovrebbe cercare di tenere il cane in casa nei periodi in cui i pollini sono maggiormente presenti; se invece si ipotizzassero come fattori di rischio i pollini presenti sull'erba bisognerebbe impedire al cane di restarci a contatto per periodi di tempo eccessivamente lunghi o eventualmente lavarlo ogni qualvolta lo si fa uscire, per eliminare gran parte degli allergeni e dei microbi adesi alla cute del paziente (Olivry et al., 2010).

Le glicoproteine degli acari della polvere del genere *Dermatophagoides spp.* sono tra gli allergeni più comuni verso i quali i cani con dermatite atopica sviluppano ipersensibilità (Tabella 11) (Hill et DeBoer, 2001): si concentrano in tappeti, cuscini, cucce presenti all'interno delle abitazioni.

Si dovrebbe cercare di contenerne la carica allergenica con pulizie frequenti o con prodotti commerciali volti ad eliminarne la presenza.

Questo è molto semplice in teoria ma di difficile attuazione pratica: non esistono ancora studi di parere unanime sull'efficacia di questi prodotti.

Sicuramente è consigliato pulire accuratamente, all'occorrenza eliminare, gli ambienti come i tappeti, i materassi e le cucce dove il cane passa la maggior parte del tempo e dove gli acari

possono concentrarsi, promuovere l'utilizzo di materiali impermeabili e utilizzare prodotti acaricidi come il benzoato di benzile, dimostratosi efficace in uno studio di Swinnen et Vroom condotto nel 2004.

C'è tuttavia da sottolineare che, anche se tutte le norme igienico-sanitarie vengono rispettate, non c'è l'assoluta certezza che vi sia un concomitante miglioramento delle manifestazioni cliniche del paziente sensibile verso questa classe di allergeni (Olivry et al., 2010).

| Allergen                              | Study <sup>d</sup> |    |    |                    |    |    |                  |    |    |     |     |    |                 |                 |    |
|---------------------------------------|--------------------|----|----|--------------------|----|----|------------------|----|----|-----|-----|----|-----------------|-----------------|----|
|                                       | a                  | b  | c  | d                  | e  | f  | g                | h  | i  | j   | k   | l  | m               | n               | o  |
| House dust                            | 71                 | 35 | 39 | 84/39 <sup>a</sup> | 55 | 63 |                  | 46 | 59 | ≈12 | 29  | 65 |                 |                 | 19 |
| <i>Dermatophagoides farinae</i>       |                    |    |    |                    | 38 |    | 100 <sup>b</sup> | 55 | 19 | 50  | 42  | 46 | 44 <sup>b</sup> | 76 <sup>b</sup> | 70 |
| <i>Dermatophagoides pteromyssinus</i> |                    |    | 3  |                    | 2  |    | 100 <sup>b</sup> | 21 | 14 | 9   | 19  |    | 44 <sup>b</sup> | 76 <sup>b</sup> | 54 |
| <i>Acarus siro</i>                    |                    |    |    |                    |    |    |                  |    | 19 | 18  | 26  |    | 47 <sup>c</sup> | 52 <sup>c</sup> | 48 |
| <i>T. putrescentiae</i>               |                    |    |    |                    |    |    |                  |    |    | 36  | 36  |    | 47 <sup>a</sup> | 52 <sup>a</sup> |    |
| Mixed epidermals                      |                    | 30 |    | 76                 |    |    |                  |    |    |     |     |    |                 |                 |    |
| Human dander                          | 17                 | 50 | 40 |                    | 42 |    | 60               | 36 | 66 | 68  | 55  |    |                 |                 | 36 |
| Horse epithelium                      | 75                 |    | 13 | 65                 |    |    |                  |    |    | 26  | 39  |    |                 |                 |    |
| Cat epithelium                        | 67                 | 30 | 30 | 71                 | 3  |    | 20               | 8  | 45 | ≈3  | ≈10 |    | 26              | 19              | 2  |
| Dog epithelium                        | 56                 |    | 25 | 74                 | 1  |    |                  | 15 | 36 |     |     |    |                 |                 | 1  |
| Sheep epithelium/wool                 | 63                 | 35 |    | 59                 | 1  |    |                  | 3  | 4  | ≈5  | ≈3  |    |                 |                 | 6  |
| Mixed feathers                        | 51                 | 35 |    | 76                 |    |    | 0                | 4  |    | <5  | <5  |    |                 |                 | 0  |
| Mouse epithelium                      |                    |    |    |                    |    |    |                  |    |    | ≈2  | ≈13 |    |                 |                 |    |
| Rabbit epithelium                     | 68                 |    | 18 |                    |    |    |                  |    |    |     |     |    |                 |                 |    |
| Guinea pig                            |                    |    | 15 |                    |    |    |                  |    |    |     |     |    |                 |                 |    |
| Poultry                               |                    |    | 13 |                    |    |    |                  |    |    |     |     |    |                 |                 |    |
| Canary                                |                    |    | 3  |                    |    |    |                  |    |    |     |     |    |                 |                 | 2  |
| Parakeet                              |                    |    |    |                    |    |    |                  |    | 7  |     |     |    |                 |                 | 0  |

**Tabella 11. Allergeni verso i quali i soggetti atopici sviluppano più di frequente reazioni di ipersensibilità (Hill et DeBoer, 2001).**

Se la manifestazione clinica è esacerbata da allergeni alimentari il soggetto presenta segni clinici ricorrenti nel corso dell'anno. Per questi pazienti va sempre considerata una dieta ad eliminazione dalle 6 alle 10 settimane ed una successiva dieta di provocazione, per valutare se realmente il problema è di tipo alimentare.

Anche se in precedenza erano già state condotte delle prove alimentari sul paziente senza ottenere risultati positivi, bisogna ricordare che un soggetto atopico può facilmente acquisire nuove ipersensibilità nel corso del tempo.

Di conseguenza, se si evidenziano delle riacutizzazioni della malattia è consigliato riconsiderare nuovamente l'eventuale ipersensibilità alimentare, soprattutto prima di implementare la dose di corticosteroidi che in questo caso non risulteranno essere efficaci come terapia sintomatica (Olivry et al., 2010).

Infine, un'eventuale ipersensibilità sviluppata da un soggetto atopico agli allergeni della saliva della pulce a causa di una mancata profilassi antiparassitaria annuale, può essere risolta mediante l'applicazione di prodotti antiparassitari appositi adulticidi e larvicidi associata a misure ambientali adeguate (Olivry et Sousa, 2001).

## ➤ **Trattamento di infezioni cutanee e auricolari**

La correzione di infezioni cutanee o auricolari aiuta a diminuire il prurito e a non implementare la gravità delle lesioni in un soggetto affetto da dermatite atopica.

La diagnosi clinica associata ad un esame citologico e/o colturale indirizza verso un'infezione batterica o fungina contro la quale si può procedere con una terapia antimicrobica.

Per le infezioni cutanee risulta efficace l'utilizzo di shampoo disinfettanti antibatterici come la clorexidina, l'etil lattato o il triclosan e/o antifungini come il miconazolo o il ketoconazolo.

Questi danno un effetto di secchezza della cute e possono essere irritanti se utilizzati troppo di frequente a meno che non si associ un successivo uso di un emolliente cutaneo (Olivry et al., 2010).

Se la lesione cutanea è localizzata si possono utilizzare pomate, creme, gel o salviettine contenenti disinfettanti (clorexidina), antibiotici (mupirocina, acido fusidico, clindamicina) o antifungini (miconazolo, clotrimazolo, ketoconazolo, terbinafina).

A seguito del trattamento, la lesione cutanea potrebbe ampliarsi e peggiorare, quindi bisognerà considerare l'ipotesi di sostituire la terapia antibiotica o antifungina topica con una terapia sistemica.

È molto comune che le infezioni cutanee recidivino e cronicizzino, richiedendo una terapia antimicrobica continua nel tempo che tuttavia non è consigliato prescrivere a causa dei problemi di antibiotico-resistenza che ne potrebbero derivare.

Se il problema continua a persistere è necessario effettuare un test colturale ed un antibiogramma, soprattutto se i trattamenti antibiotici precedenti erano stati numerosi o se c'è il dubbio che non fossero pienamente efficaci (Olivry et al., 2015).

A scopo preventivo, sono risultati efficaci i trattamenti antisettici topici, in quanto il loro utilizzo a lungo termine ha visto risultati nel prevenire recidive senza necessariamente dover ricorrere alle preparazioni antibiotiche (Saridomichelakis et Olivry, 2015).

Un'unica eccezione alla prescrizione e all'esecuzione di una terapia intermittente antibiotica e/o antifungina, sistemica o topica, è raccomandata con alcune infezioni particolarmente gravi che non si riescono a risolvere in altro modo. Si parla di "terapia pulsata", che tuttavia non va considerata come approccio di routine (Olivry et al., 2010).

## ➤ **Riduzione del prurito e delle lesioni cutanee**

La sensazione di prurito percepita da un paziente con malattie dermatologiche può avere diverse manifestazioni cliniche rese evidenti da atteggiamenti di mordicchiamento, leccamento e strofinamento sulle superfici.

Generalmente il prurito percepito può avere intensità diverse a seconda del soggetto e della sua patologia.

Ci sono diverse strategie mirate a ridurre e/o a risolvere questo sintomo, dalla shampoo-terapia all'utilizzo di corticosteroidi, agli antistaminici e ai farmaci immunomodulatori.

La gestione del prurito tramite l'utilizzo di shampoo in soggetti atopici si è rivelata efficace soprattutto nei pazienti con un grado lieve di dermatite atopica e il miglioramento sembra essere correlato all'intensità e alla frequenza dei bagni che vengono somministrati al cane (Olivry et al., 2010).

Uno studio condotto nel 2007 dimostra che nel 25% dei cani con atopia si può ottenere una riduzione del 50% del prurito entro le 24 ore successive l'utilizzo di shampoo non irritanti, prodotti contenenti polisaccaridi, ceramidi ed acidi grassi essenziali, applicati settimanalmente per 10 minuti.

Va comunque sottolineato che non è da considerarsi un'opzione terapeutica risolutiva: si può affermare che dia un sollievo, seppur temporaneo e a breve termine, al paziente.

Sicuramente, rispetto alla terapia sintomatica, è adatta ad una gestione a lungo termine in quanto non scatena effetti collaterali gravi che ne giustifichino la sospensione o il suo utilizzo ad intervalli (Loflath et al., 2007).

I corticosteroidi esercitano una forte azione immunosoppressiva e anti-infiammatoria, aumentando la trascrizione di geni deputati alla sintesi di proteine anti-infiammatorie e inibendo l'espressione di molte citochine e chemochine che amplificano l'infiammazione (Saevik et al., 2004).

Tuttavia, tempi eccessivi di utilizzo possono portare all'insorgenza di effetti collaterali come poliuria, polidipsia, polifagia, obesità, atrofia muscolare, cambiamenti comportamentali, iperadrenocorticismo iatrogeno e alterazioni cutanee quali assottigliamento della cute, comedoni, cisti follicolari superficiali e infezioni fungine e batteriche; in quest'ultimo caso il loro utilizzo è sconsigliato.

Alle volte l'utilizzo di questi farmaci può comportare l'insorgenza di *calcinosis cutis* o anche predisporre allo sviluppo della demodicosi, condizioni che portano a stati infiammatori che spingono il proprietario a pensare alla necessità di un incremento sia della dose che della frequenza di somministrazione della terapia, abusando quindi del farmaco (Olivry et al., 2010).

Nella gestione a breve termine di lesioni cutanee localizzate e del prurito si sono visti essere idonei prodotti topici a base di corticosteroidi come la soluzione di triamcinolone 0,015% oppure il cortisone aceponato allo 0,0584% (Olivry et al., 2010).

Più recente, l'acquisizione secondo la quale l'applicazione una o due volte al giorno, di idrocortisone aceponato spray migliora significativamente le lesioni e il prurito nei soggetti atopici (Nam et al., 2012).

Se la lesione è estesa ed è di difficile controllo con le formulazioni topiche oppure se il paziente presenta una forma di dermatite atopica non localizzata è necessario utilizzare corticosteroidi orali, dopo che i fattori di rischio sono stati ridotti o eliminati.

Vengono solitamente utilizzati il prednisone, il prednisolone o il metilprednisolone somministrati alla dose di 0.5 mg/kg da una a due volte al giorno fino a remissione clinica.

Se i segni clinici non migliorano bisogna considerare la possibilità di mantenere la terapia più a lungo alla dose e alla frequenza minore che permetta un controllo della sintomatologia (Olivry et al., 2010).

Per cercare di diminuire i dosaggi e la frequenza di somministrazione di questi farmaci bisognerebbe mirare ad ottenere il cosiddetto "*steroid sparing effect*", con somministrazioni contemporanee di altri farmaci come anti istaminici o supplementi nutrizionali come gli acidi grassi essenziali o gli estratti di alcune piante (Olivry et al., 2010).

Ad esempio si può mirare a ridurre gradualmente la concentrazione dei corticosteroidi alla dose minima che permette di controllare le manifestazioni cliniche, riducendola poi ulteriormente del 50% e aggiungendo un antistaminico, come l'idroxizina (2 mg/kg due volte al giorno) somministrabile per via orale. L'unico effetto collaterale in relazione agli anti istaminici risulta essere l'eccessiva sonnolenza e sedazione che inducono (DeBoer et Griffin, 2001; Saridomichelakis et Olivry, 2015).

Allo stesso modo, uno studio del 2004 ha evidenziato come acidi grassi essenziali specifici aggiunti alla dieta abbiano permesso di ridurre la dose di prednisolone da utilizzare nel controllo del prurito in un periodo di tempo di due mesi (Saevik et al., 2004).

Infine, uno studio condotto in Cina ha dimostrato come la Phytopyca, un estratto ottenuto da tre piante, abbia permesso di ridurre il dosaggio del metilprednisolone utilizzato nel trattamento di soggetti con un'atopia da moderata a grave (Schmidt et al., 2010).

In medicina umana, il controllo del prurito viene effettuato mediante l'utilizzo di farmaci antistaminici, essendo l'istamina coinvolta nell'insorgenza del sintomo (De Benedetto et al., 2015). Nell'eziopatogenesi della dermatite atopica canina, invece, l'istamina non sembra avere un ruolo essenziale come causa determinante l'infiammazione cutanea e il prurito (Brazis et al., 1998), per cui farmaci antistaminici, antagonisti dei recettori H1, hanno un'efficacia limitata (15-30% dei soggetti trattati) nella gestione della fase acuta della patologia (Olivry et al., 2015). Inoltre, una volta che l'istamina è legata ai suoi recettori, questi farmaci non riescono ad esercitare la loro azione (Saridomichelakis et Olivry, 2015).

La loro efficacia può manifestarsi se utilizzati in combinazione con altri anti istaminici o altri farmaci ("steroid sparing effect") ma esercitano la loro massima azione quando vengono prescritti a scopo preventivo con somministrazioni giornaliere (Olivry et al., 2010).

Il miglioramento delle lesioni cutanee e la riduzione del prurito può essere ottenuto anche mediante l'utilizzo di farmaci immunomodulatori la cui azione terapeutica è orientata verso citochine, chemochine e derivati dell'acido arachidonico prodotti da cellule del Langherans, cheratinociti, linfociti T e tutte le altre cellule che partecipano allo sviluppo della reazione infiammatoria nella dermatite atopica. Tra questi farmaci particolarmente utilizzati sono gli inibitori della calcineurina, quali il tacrolimus allo 0,1% e la ciclosporina, l'occlacitinib e l'interferone gamma ricombinante canino, di cui si parlerà in modo dettagliato nel capitolo 6.

### ➤ **Prevenzione e trattamento di alterazioni della barriera cutanea**

L'alterazione della barriera cutanea può essere considerata come una delle cause deputate all'insorgenza della dermatite atopica canina.

Tra le opzioni terapeutiche che si possono considerare si annovera l'utilizzo di diete arricchite con acidi grassi essenziali, soprattutto  $\omega$ -6 (i supplementi orali sembrano essere meno efficaci (Roudebush et al., 1997)) utili per rafforzare ed integrare la componente lipidica delle membrane cellulari dell'epidermide ed aumentare la brillantezza e la qualità del mantello: lo scopo è ridurre la penetrazione di allergeni e ridurre la perdita transcutanea d'acqua.

Oltre a ripristinare la componente lipidica della barriera cutanea, stimolano la produzione di prostaglandine e leucotrieni anti infiammatori (Saevik et al., 2004).

Tuttavia, sono delle proposte terapeutiche che richiedono delle tempistiche eccessivamente lunghe non compatibili con una gestione acuta ed immediata della patologia (Olivry et al., 2010).

Gli effetti benefici possono rendersi evidenti dopo alcuni mesi (Olivry et al., 2001) ed è comunque necessario sottolineare come questo approccio terapeutico non potrebbe essere l'unico prescritto dal veterinario nella gestione del paziente atopico.

Nonostante non siano ancora molti gli studi a supporto, si può considerare di ricorrere anche all'utilizzo di altri supplementi dietetici come il pantotenato, la colina, la nicotinamide, l'istidina e l'inositolo i quali hanno dimostrato favorire l'aumento della produzione di ceramidi cutanee in vitro e di ridurre la perdita d'acqua transepidermica in vivo in soggetti sani (Watson et al., 2006).

In alternativa alla terapia orale può essere utilizzata anche la terapia topica, con prodotti quali creme, unguenti e oli contenenti molecole lipidiche, mirati a normalizzare la componente lipidica dello strato corneo cutaneo (Olivry et al., 2015).

In commercio esistono diversi prodotti dermatologici ad applicazione cutanea e tra questi, ad esempio, si è formulato un prodotto spot-on composto da ceramidi, acidi grassi e colesterolo, simili a quelli che si ritrovano nella cute sana del cane.

In uno studio condotto nel 2008 (Piekutowska et al., 2008) questa formulazione è stata applicata su soggetti atopici ogni tre giorni per sei volte. Il risultato è stato incoraggiante: nei pazienti si è ottenuta una normalizzazione delle lamelle lipidiche intercellulari dello strato corneo aumentando anche così la resistenza della barriera cutanea.

Tuttavia, il beneficio che si può osservare dall'applicazione di queste formulazioni non è così evidente nel caso in cui al paziente si somministri contemporaneamente una dieta arricchita con acidi grassi essenziali (Olivry et al., 2015).

### ➤ **Prevenire la recidiva della patologia**

Partendo dal presupposto che la dermatite atopica è una patologia non risolvibile in modo definitivo, è comunque possibile attraverso una gestione multimodale arrivare ad una condizione che consenta al paziente di condurre una vita priva di discomfort derivanti dalle manifestazioni cliniche della malattia.

Raggiunto un equilibrio, questo può essere mantenuto: in questa fase risulta fondamentale anche istruire correttamente il proprietario in modo che riesca, tramite una gestione a lungo termine, ad evitare le recidive.

Ci sono alcuni aspetti fondamentali che devono essere considerati:

- Evitare i fattori di rischio:
  - I. Somministrare una dieta non contenente allergeni verso cui il soggetto può essere sensibile;
  - II. eseguire un controllo e una profilassi periodica delle pulci;
  - III. ridurre il contatto con allergeni ambientali o microbici (Olivry et al., 2010).
  
- In medicina umana si è osservata l'efficacia di un'applicazione intermittente di corticosteroidi topici e tacrolimus nelle aree cutanee maggiormente colpite dalle lesioni al fine di ritardare o prevenirne l'insorgenza; questo aspetto manca ancora di studi in medicina veterinaria ma come effetto è presumibilmente equiparabile (Olivry et al., 2010).
  
- L'ultima opzione terapeutica da considerare è l'immunoterapia allergene specifica. È una strategia che può essere considerata in supporto a tutti gli aspetti visti in precedenza, al fine di provare a garantire un miglioramento a lungo termine di un'alterazione della risposta immunitaria del paziente. Anche di questo aspetto si parlerà nel dettaglio nel capitolo 6.



## 4 EZIOPATOGENESI: RUOLO DELL'IMMUNITA' CELLULO – MEDIATA

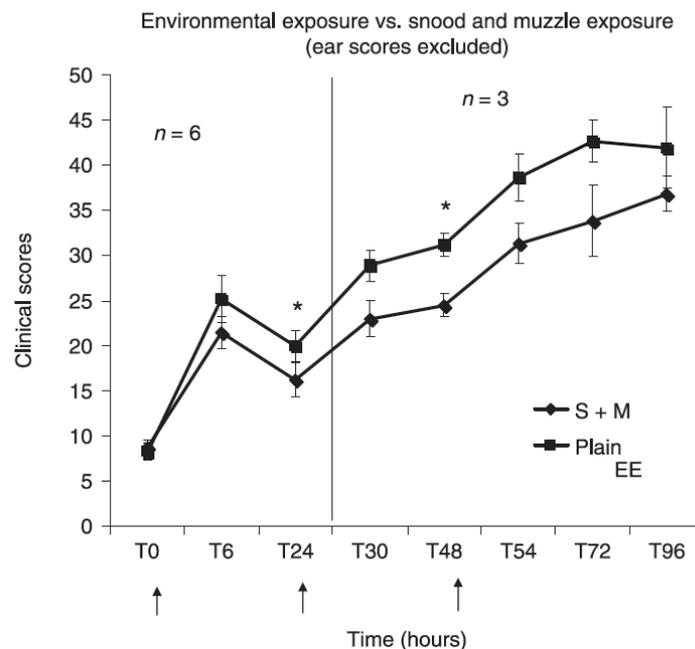
### 4.1 VIE DI ESPOSIZIONE E DI PROCESSAZIONE DELL'ANTIGENE

Qualsiasi via attraverso la quale un soggetto è esposto ad un agente allergizzante può essere determinante nel promuovere il processo di sensibilizzazione.

Tuttavia è evidente come alcune vie siano più performanti di altre dal punto di vista delle conseguenze esercitate poi nel soggetto.

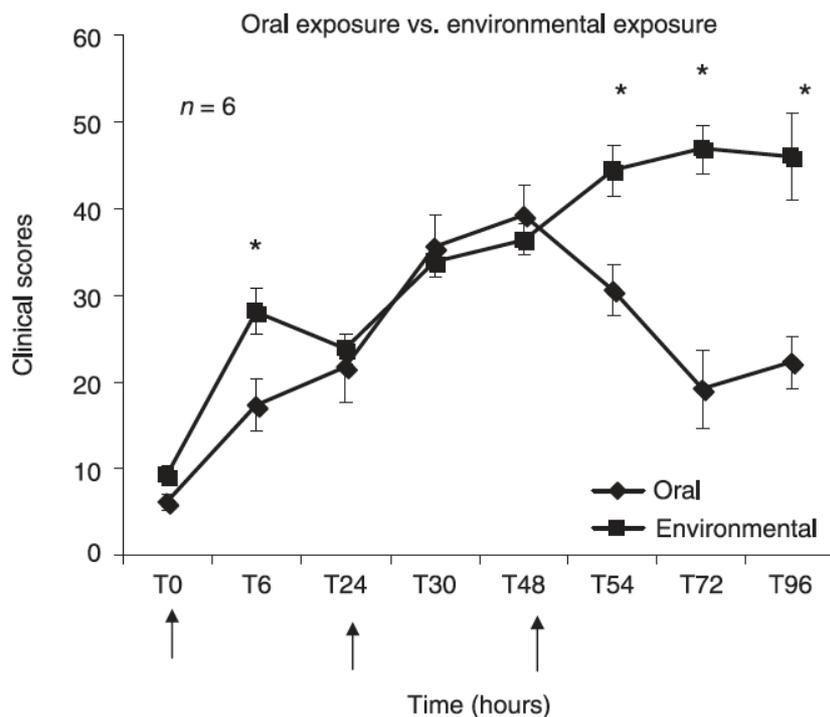
Sebbene tra le prime denominazioni della patologia vi fosse quella di dermatite allergica da inalanti, la via inalatoria non è la preferenziale via di esposizione agli antigeni: un soggetto atopico sperimentalmente indotto con inalazione di allergeni può sviluppare una sintomatologia respiratoria, ma non per questo viene indotto un peggioramento delle lesioni cliniche cutanee.

Sicuramente più rilevante è la via di esposizione percutanea tramite la quale si evidenzia un continuo aumento delle lesioni cliniche indotte nel soggetto (Figura 24) (Olivry et Hill, 2001 (b); Marsella et al., 2006(a); Marsella et al., 2006(b)).



**Figura 24. Esposizione ambientale versus esposizione ambientale.** Confronto degli indici delle lesioni tra soggetti esposti agli allergeni tramite la via inalatoria e soggetti esposti tramite la via percutanea (Marsella et al., 2006).

Questo effetto si evidenzia in misura ancora maggiore se posta a confronto con la via di esposizione orale: in quest'ultima il picco delle manifestazioni cliniche si raggiunge attorno alle 48 h per poi diminuire lentamente; se viene invece favorita l'esposizione ambientale per via percutanea il peggioramento delle lesioni e l'infiammazione vengono ad assumere un trend in continua crescita, finchè l'allergene permane nella cute (Figura 25).



**Figura 25.** Confronto tra la via di esposizione orale e quella percutanea ad allergeni rispetto alle conseguenze cliniche sul paziente (Marsella et al., 2006(a)).

Riassumendo, quindi, alla base della dermatite atopica canina vi è una reazione di ipersensibilità indotta dalla presentazione al sistema immunitario di un allergene o più verso il quale il soggetto è sensibile, attraverso una via di esposizione che può essere inalatoria, percutanea o alle volte orale (Marsella et al., 2006(a); Marsella et al., 2006(b)).

## 4.2 CASCATA INFIAMMATORIA E ANOMALIE DELLA RISPOSTA IMMUNITARIA

L'eziopatogenesi della dermatite atopica canina è costituita da un intrecciarsi di fattori ed elementi che portano all'instaurarsi di un circolo vizioso alla base del carattere progressivo della patologia.

Alterazioni delle caratteristiche della barriera cutanea, nella fase acuta della patologia, portano alla perdita dell'integrità necessaria per l'impedimento dell'ingresso di allergeni da cui poi può instaurarsi la reazione infiammatoria.

L'infiammazione a sua volta è caratterizzata dalla presenza di cellule e molecole, di cui si parlerà successivamente nel corso del capitolo, atte ad accentuare la condizione patologica e ad alterare l'equilibrio immunologico che invece si riscontrerebbe in un soggetto sano.

Alla base di tutte le teorie proposte, inerenti ad un'alterazione della risposta immunitaria del soggetto, si è sempre data grande rilevanza all'aspetto relativo all'ipersensibilizzazione rispetto ad un allergene.

L'organismo ha un primo contatto con l'agente allergizzante mediato dalle cellule epidermiche e dermiche del Langherans, appartenenti alla famiglia di cellule presentanti l'antigene, le quali poi si occuperanno di elaborare e presentare questa molecola ai linfociti T helper.

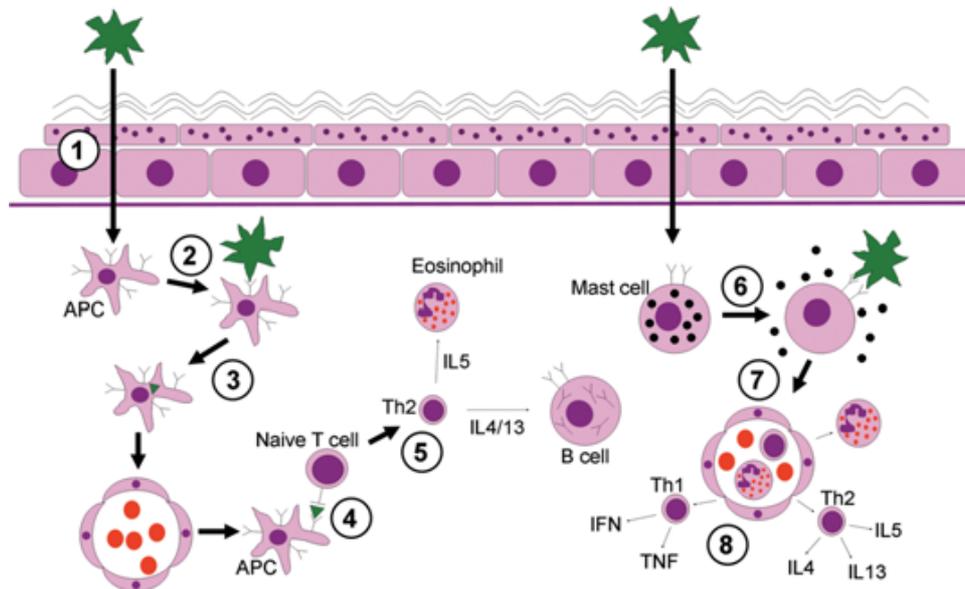
Da qui si scatena una risposta definita come Th2, caratterizzata cioè da una proliferazione di linfociti T helper di tipo 2, che si dimostrano predominanti nella fase acuta delle lesioni: nei processi di infiammazione allergica l'iniziale differenziazione di cellule Th2 è favorita dal recettore CCR4, espresso selettivamente sui linfociti Th2 e dalla citochina TARC, prodotta selettivamente dai cheratinociti in un soggetto atopico.

I linfociti T helper di tipo 2 secernono una serie di interleuchine, tra cui l'IL-4, che stimola a sua volta i linfociti B a produrre IgE.

Sarà poi l'IgE-allergene specifica, una volta entrata nuovamente a contatto con l'allergene implicato, a legarsi ai mastociti dermici i quali vanno incontro a degranulazione e successivo rilascio di mediatori pro-infiammatori alla successiva esposizione all'allergene (Loewenstein et Mueller, 2009).

I mediatori infiammatori implicati possono essere preformati come l'istamina, la triptasi, la chimasi e l'eparina e questi sono responsabili dei segni precoci di infiammazione, ossia eritema e prurito. Mentre quelli di nuova sintesi sono le prostaglandine, i leucotrieni, le citochine e le chemochine. Viene definita come la fase tardiva dell'infiammazione, che si scatena dalle 4 alle 6 ore dopo

l'esposizione all'allergene e questi mediatori sono responsabili della chemiotassi di cellule infiammatorie (Marsella et Olivry, 2001).



**Figura 26. Meccanismo alla base dell'eziopatogenesi della dermatite atopica.** Dall'alterazione delle caratteristiche della barriera cutanea alle anomalie della risposta immunologica (Loewenstein et Mueller, 2009).

Una volta che la fase acuta della patologia è stata superata, c'è uno spostamento del sistema immunitario a favore dei linfociti T helper 1 che rivestono un ruolo importante nella fase cronica ed effetttrice della malattia allergica.

Di recente acquisizione, il considerare come parte integrante dell'eziopatogenesi della dermatite atopica un'ulteriore sottocategoria di linfociti T, ossia i linfociti T regolatori (T reg) la cui funzione è prevalentemente immunosoppressiva (Loewenstein et Mueller, 2009).

Da ciò si può dedurre come la dermatite atopica canina non sia caratterizzata da una polarizzazione verso un'unica risposta immunitaria, bensì sia il risultato di risposte diverse mediate dai linfociti T (T helper 1, T helper 2 e T helper 17), linfociti regolatori e dai mediatori infiammatori, quali citochine prodotte dai Th1, Th2 e molecole proteiche non appartenenti al gruppo delle citochine.

In medicina umana invece è più marcata ed evidente la risposta bifasica, ossia una netta prevalenza dei linfociti Th2 nelle lesioni acute, contro una risposta Th1 nella fase cronica della patologia.

## 4.3 ESPRESSIONE QUALI-QUANTITATIVA DEI PRINCIPALI ELEMENTI CELLULARI E MOLECOLARI IMPLICATI

### 4.3.1 LINFOCITI

I linfociti normalmente presenti nella cute canina di un soggetto sano, appartengono sia alla sottopopolazione CD4<sup>+</sup> (con prevalenza nel derma) sia a quella CD8<sup>+</sup> (con prevalenza nell'epidermide).

Tuttavia, tali cellule sono implicate nei processi infiammatori ed allergici, nei quali il loro numero tende ad aumentare a seguito dell'esposizione ad un agente allergizzante, evidenziando quindi il loro ruolo centrale nelle reazioni di ipersensibilità e nelle malattie allergiche.

Nella cute canina uno dei motivi grazie ai quali i linfociti vengono reclutati è la presenza del recettore delle chemochine CCR4 il quale si lega al TARC, regolato nella sua espressione e sintesi dai cheratinociti. Le cellule T CCR4<sup>+</sup> sono presenti in grande quantità in soggetti allergici e sensibilizzati sperimentalmente.

Nella cute di un soggetto atopico l'espressione del CCR4 è stata dimostrata probabilmente associata al fenomeno di *homing* delle cellule T.

La maggior fonte di TARC sono i cheratinociti dell'epidermide e la sua espressione viene regolata da citochine infiammatorie come l'IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e il TNF- $\alpha$  che peggiorano un quadro di infiammazione cronica già pre-esistente.

L'importanza di questa molecola sta nel fatto che potrebbe considerarsi un ottimo marker per la valutazione della gravità della dermatite atopica oltre che una nuova citochina target per impostare terapie mediche ed immunoterapia (Maeda et al., 2002; Maeda et al., 2005).

Nei cani con dermatite atopica si evidenzia anche un cambiamento nella quantità di linfociti T circolanti: confrontato con un soggetto sano nel quale il rapporto CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> è di 1.7:1, in un soggetto atopico il rapporto diventa 2.1: 1.

In soggetti sensibilizzati sperimentalmente si è anche osservato un numero aumentato di CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>: questo dato risulta di difficile interpretazione dal momento che il CD25 viene espresso sia sui linfociti T effettori che sui linfociti regolatori, i cosiddetti T reg (Pucheu-Haston et al., 2015).

I linfociti vengono classificati sulla base della loro differenziazione in T helper di tipo 1 e 2; questa suddivisione si basa sul tipo di citochine che questi producono: in particolare, i linfociti T helper di

tipo 1 favoriscono la sintesi di IL-12 ed IFN- $\gamma$ ; mentre i T helper di tipo 2 di IL-4; IL-5; IL-6; IL-9; IL-10 e IL-13 e sono tipiche della fase acuta.

La polarizzazione verso un tipo di risposta piuttosto che un'altra determina delle reazioni e delle manifestazioni diverse.

La prevalenza dei T helper di tipo 1 stimola:

1. Reazioni di ipersensibilità ritardata;
2. l'attivazione di macrofagi;
3. la produzione di anticorpi come IgG ed IgM;
4. una citotossicità cellulo-mediata.

D'altro canto una prevalenza di linfociti T helper 2 induce:

1. Lo sviluppo di mastociti ed eosinofili;
2. una diminuzione della produzione di IgG1;
3. un aumento di IgE ed IgA (Hill et Olivry, 2001).

I linfociti T regolatori (T reg) sono circa il 10% dei linfociti CD4<sup>+</sup> e vengono divisi in due sottogruppi: quelli che si sviluppano nel timo e quelli a sviluppo periferico; si distinguono fenotipicamente con i marker di superficie che li indentificano (CD25 o CD4) così come dal fattore di trascrizione intranucleare FoxP3.

Le loro proprietà immuno-regolatorie consentono di inibire una risposta immunitaria esagerata e nel cane è stato dimostrato come i T reg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3 siano in grado di inibire la proliferazione dei linfociti T effettori, a differenza dei CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> che non hanno dimostrato avere proprietà regolatrici (Pinheiro et al., 2010).

Ancora poco si sa sul ruolo rivestito dai T reg, data anche la difficoltà nell'identificare inequivocabilmente queste cellule: uno dei loro marker è il CD25, espresso tuttavia anche nei linfociti T effettori; la loro presenza viene correlata più facilmente alla presenza del fattore di trascrizione intranucleare FoxP3 oppure dalla presenza di citochine quali IL-10 o TGF- $\beta$ .

Quindi, le cellule che presumibilmente vengono considerate linfociti T ad attività regolatrice sono quelle CD25<sup>high</sup> che contengono una quantità relativamente alta di FoxP3 (Jassies-van der Lee et al., 2014).

Infine sempre più interesse è rivolto verso i linfociti T helper di tipo 17 che sembrano svolgere un ruolo di immunità protettiva contro patogeni extra cellulari ma si sono anche visti favorire la secrezione di fattori pro-infiammatori (Pucheu–Haston et al., 2015).

In medicina umana, una lesione eczematosa presenta uno sviluppo bifasico: la fase iniziale è caratterizzata da una polarizzazione della risposta Th2 che produce una maggior quantità di citochine quali IL-4, IL-5, IL-13 ed eosinofili. I genotipi che si associano a questi fenotipi sono i geni di STAT-6, GATA-3, SOCS-3; Subentra poi una fase dove riscontriamo un tipo di risposta mediata dai linfociti Th1 e macrofagi, solitamente dopo 24-48 ore, nella quale le citochine prevalenti sono IFN- $\gamma$  e l'IL-12, associate a geni di STAT-4, SOCS-5 e T-bet.

La proteina associata al gene SOCS-5 si lega all'IL-4 inibendo l'espressione di STAT-6: questo comporta una diminuita produzione di IFN- $\gamma$ , IL-12 e TNF- $\alpha$ , sopprimendo la risposta Th1, ed inoltre agisce in sinergia con il gene GATA-3 finalizzato anch'esso ad esacerbare una risposta Th2. L'espressione di SOCS3 è correlata alla gravità dell'atopia e generalmente inibisce l'IL-12.

Tra le sottopopolazioni di linfociti, i linfociti T regolatori (T reg) si pensa abbiano importanti attività immuno modulatorie ed immuno soppressivi della risposta Th1 e Th2 ed anti-infiammatorie, producendo citochine quali IL-10 e TGF- $\beta$ .

Nel cane non esiste un modello per le lesioni eczematose delineato da una fase acuta e da una fase cronica: non si riesce a campionare quasi mai una lesione in fase acuta tale da permettere di studiare nel dettaglio il meccanismo che vi è alla base, invece meglio conosciuto è ciò che avviene nel caso di lesioni croniche.

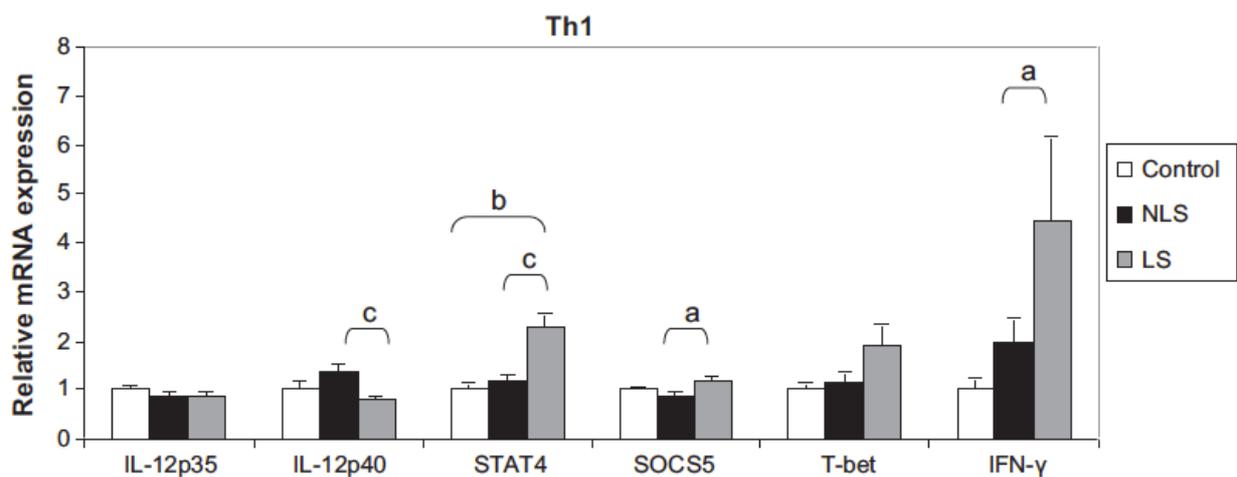
La valutazione quantitativa del tipo di risposta immunitaria locale confrontata tra aree cutanee lesionate e non viene condotta attraverso l'uso di una real-time PCR e i risultati ottenuti sono stati i seguenti in uno studio condotto da Schlotter e colleghi nel 2011:

- una maggior espressione del gene STAT4 e SOCS5 con una conseguente maggior espressione di IFN- $\gamma$ , associato ad un tipo di risposta mediata dai linfociti Th1;
- quantità significativamente inferiori di IL-12, a differenza di quello che ci si aspettava e dagli studi condotti in medicina umana. La spiegazione potrebbe risiedere nel fatto che questa molecola fosse già stata espressa precedentemente al campionamento della lesione oppure sia stata inibita da altre citochine;

- in contrasto con gli studi precedenti si sono rilevati elevati livelli di IL-10 e, come in medicina umana, di IL-13;
- il gene SOCS3 altamente espresso;
- nessuna differenza sostanziale si è rilevata tra i livelli di TGF- $\beta$  e FoxP3 (Figura 27).

Questi risultati permettono di chiarire come nelle lesioni croniche di un cane affetto da dermatite atopica canina non vi sia un unico tipo di risposta mediata dai linfociti Th1, ma che vi sia una commistione anche con la risposta Th2; è anche chiara l'importanza acquisita dai linfociti T reg nel determinare l'andamento della patologia, richiedendo quindi ulteriori approfondimenti a riguardo (Schlotter et al., 2011).

Da qui l'impossibilità di creare un quadro bifasico come invece è stato proposto in medicina umana (Marsella, 2004(b)), poiché sia la risposta Th1 e Th2 si sono viste essere coinvolte in misura diversa, e non esclusiva, a seconda dello stadio della lesione: uno studio del 1999 condotto da Olivry e colleghi ha evidenziato come solo nel 25% dei soggetti atopici vi fosse un chiaro profilo con spostamento della risposta verso Th2, mentre solo in un 25% di soggetti sani si è dimostrato un profilo nettamente a favore di Th1 (Olivry et al., 1999).



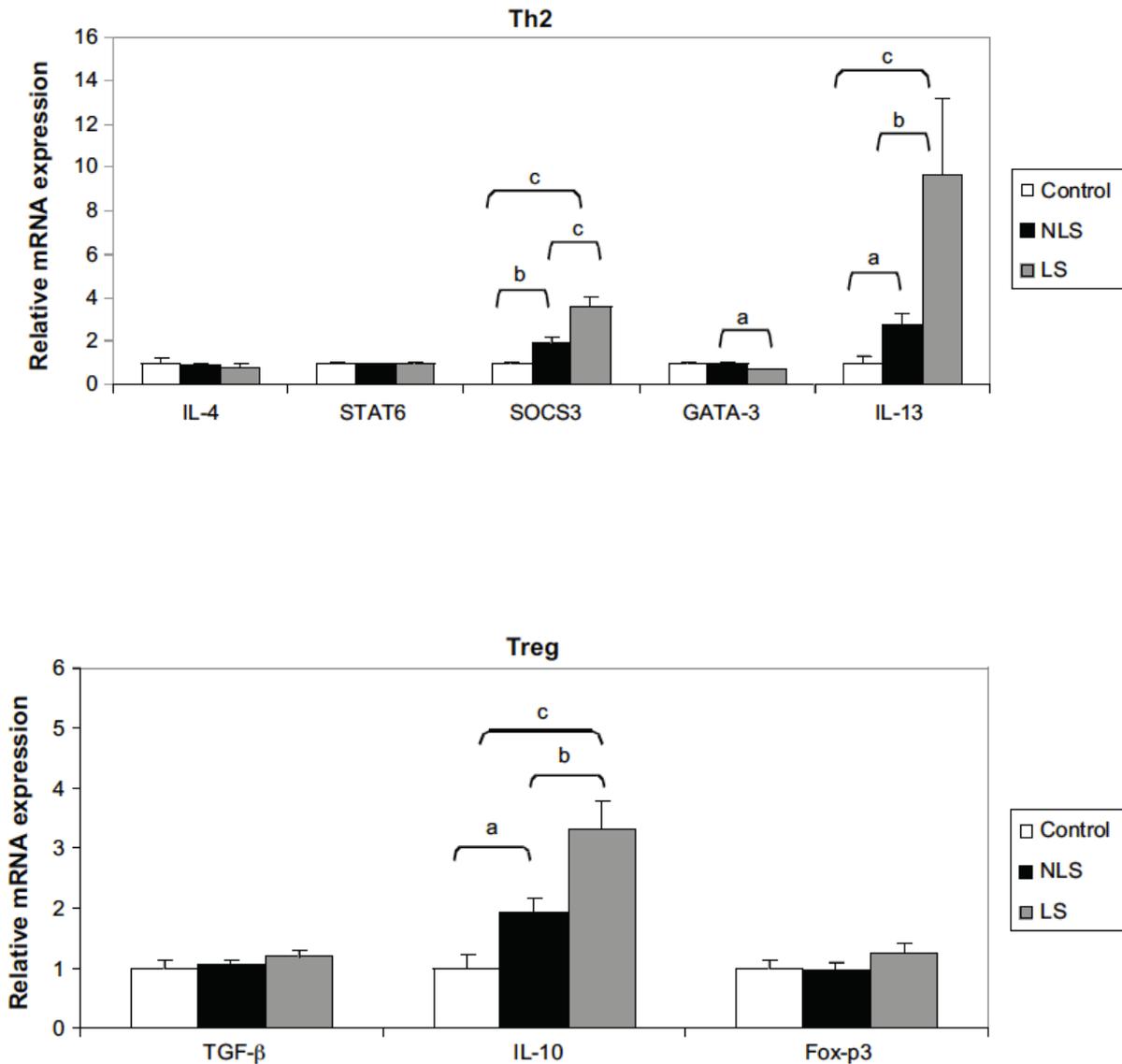


Figura 27. Espressione relativa ai livelli di mRNA di citochine e fattori di trascrizione relative alle risposte Th1, Th2 e T reg (Schlotter et al., 2011).

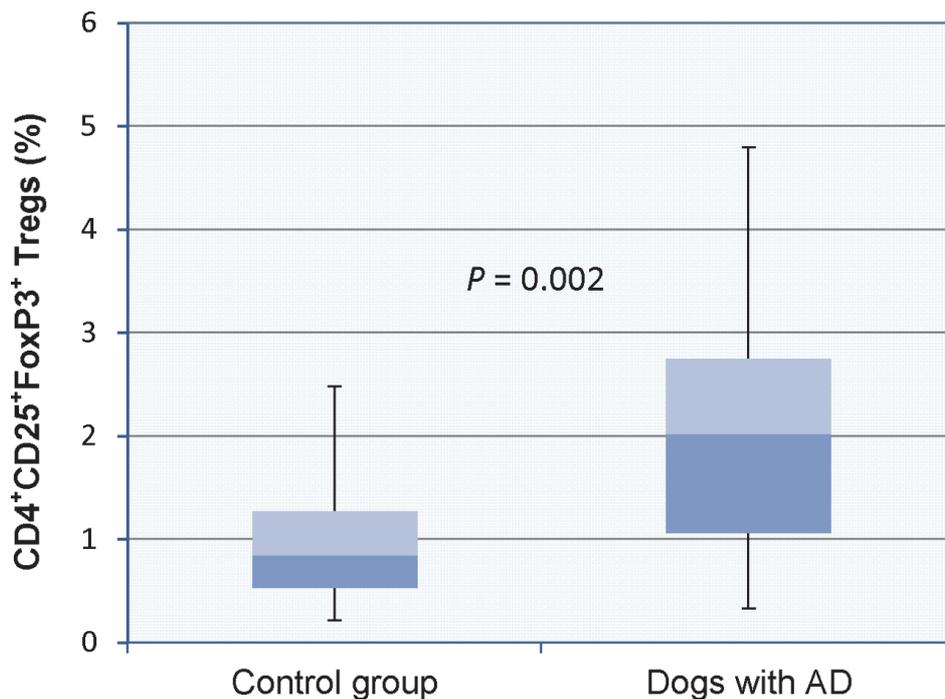
Nell'uomo come in altre specie la presenza dei T reg si è rivelata maggioritaria negli individui affetti da dermatite atopica, mentre nel cane sono ancora carenti gli studi a riguardo.

Gli unici tre studi eseguiti in medicina veterinaria hanno evidenziato come in un soggetto atopico rispetto ad un soggetto sano non vi siano differenze significative nella quantità di linfociti T regolatori, tuttavia la quantità di queste cellule aumenta, in un soggetto affetto da patologia, durante l'immuno terapia allergene-specifica (Simpson et al., 2009; Keppel et al., 2008; Jassies-van der Lee et al., 2014).

Al contrario di quanto evidenziato dagli studi precedenti, dallo studio condotto da Hauck e colleghi nel 2016 è emerso che la quantità di linfociti T reg circolanti in soggetti atopici è notevolmente

superiore rispetto a quella di un soggetto sano (Figura 28), dato che trova riscontro anche nella letteratura umana (Gàspàr et al., 2015).

La valutazione quantitativa dei linfociti T reg circolanti nel sangue periferico di soggetti affetti da dermatite atopica ha sempre dato delle difficoltà derivanti dal non definire dei parametri standard di valutazione: ad oggi, i linfociti T reg sono quei linfociti che esprimono i marker CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> e FoxP3 (Hauck et al., 2016).



**Figura 28. Confronto tra la percentuale di linfociti T reg in soggetti atopici e soggetti sani** (Hauck et al., 2016).

È ancora difficile dare una spiegazione del perché ad oggi non vi siano concordanze tra i diversi studi, tuttavia va sicuramente considerato il fattore relativo al metodo di indagine diagnostica per individuare il pool cellulare; inoltre non sono mai stati eseguiti in medicina veterinaria studi relativi ad eventuali influenze indotte da età, stadio della patologia, stato del sistema immunitario e influenze derivanti da altre terapie in corso: tutte queste variabili potrebbero essere causa di alterazioni o discrepanze dei risultati, che in futuro andranno sicuramente considerate.

#### **4.3.2 CITOCHINE E CHEMOCHINE**

Nonostante ad oggi la dermatite atopica canina non possa essere considerata unicamente e strettamente legata ad una risposta immunitaria con prevalenza dei linfociti Th2, sicuramente le citochine derivate da questo tipo di linfociti sono coinvolte nello sviluppo e nel mantenimento della patologia, per lo meno durante le fasi iniziali acute.

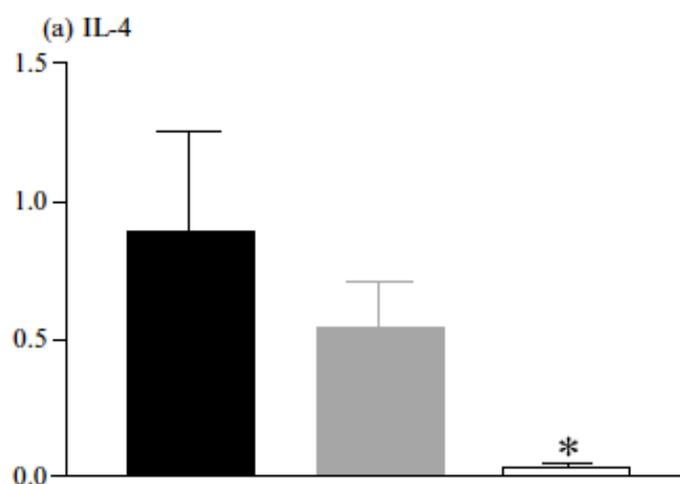
L'interleuchina-4 (IL-4) è la principale interleuchina prodotta dai linfociti T helper 2, oltre che da alcuni mastociti e alle volte da basofili; la sua sintesi non avviene prima delle 6-48 ore a seguito di iniezioni intradermiche anti-IgE in soggetti sani (Pucheu-Haston et al., 2006).

La presenza dell'IL-4 è correlata all'IL-13 ed hanno attività biologiche simili nel favorire l'inizio dell'infiammazione. Entrambe richiedono una stimolazione allergenica molto alta per favorirne la produzione.

L'interleuchina-13 (IL-13) stimola la produzione di IgE aumentando l'infiammazione cutanea; nell'uomo si è vista anche essere responsabile dell'alterazione delle caratteristiche strutturali della cute diminuendo l'espressione del gene della filaggrina, evidenza che non si è riscontrata in medicina veterinaria (Maeda et al., 2007).

Per quanto riguarda l'IL-4 non sono molti gli studi concordi nell'asserire se sia effettivamente presente a livelli superiori nei pazienti atopici piuttosto che nei soggetti sani. Nel 2002, Nuttall e colleghi per la prima volta dimostrano come questa interleuchina fosse di rilevanza fondamentale nell'eziopatogenesi della dermatite atopica canina.

In un soggetto atopico si è rivelata presente ad alti livelli sia nella cute lesionata che non, evidenziando una concordanza con quanto riscontrato in medicina umana (Figura 29) (Nuttall et al., 2002).



**Figura 29. Trascrizione del gene relativo all'IL-4.** È evidente come nella cute lesionata di soggetti atopici, cute non lesionata di soggetti atopici e soggetti sani (Nuttall et al., 2002).

La limfopoietina stromale timica (TSLP) è prodotta dai cheratinociti e stimola la produzione e la proliferazione di cellule dendritiche e mastociti (Asahina et al., 2016). Di recente, in medicina umana si è visto come la TSLP agisca in sinergia con l'IL-4 stimolando i linfociti CD4<sup>+</sup> effettori, determinando una risposta immunitaria a favore dei linfociti Th2 (Tatsuno et al., 2016).

L'interleuchina-31 (IL-31) è una citochina che di recente si è scoperto essere direttamente implicata nella patogenesi del prurito.

Nell'uomo viene prodotta prevalentemente da linfociti cutanei positivi all'antigene (CLA<sup>+</sup>). La stimolazione di cellule T con acari e enterotossine B stafilococciche ne induce la produzione.

Il suo meccanismo d'azione si basa sull'attivazione dei segnali mediati dalle Janus chinasi e dal pathway della MAPK.

I suoi recettori si trovano in una grande varietà di cellule tra cui cheratinociti, macrofagi ed eosinofili; in misura minore si è anche rilevata in neuroni nocicettivi a livello di sistema nervoso periferico sia nel topo che nell'uomo (Zhang et al., 2008).

Recenti sono gli studi condotti per comprendere il ruolo dell'IL-31 nell'eziopatogenesi della dermatite atopica canina e mirano a confrontare se nel cane questa citochina abbia lo stesso effetto pruriginoso riscontrato nell'uomo e nel topo.

Uno studio del 2013 condotto da Gonzales e colleghi ha valutato l'espressione della molecola in soggetti affetti da dermatite atopica. Eccetto un singolo soggetto, tutti gli altri, a cui la molecola è stata somministrata, hanno manifestato leccamento, masticamento, scuotimento e strofinamento.

L'IL-31 è stata rilevata nel 57% dei soggetti atopici, ma non in quelli con altre patologie dermatologiche. Di questo 57% tuttavia, il 43% non evidenziava dei livelli sierici rilevabili della molecola. L'ipotesi plausibile potrebbe essere che l'azione dell'IL-31 sia locale, di conseguenza non rilevabile a livello sistemico, oppure che non rientri tra le cause scatenanti la patologia per questi soggetti, sempre partendo dal presupposto che la dermatite atopica è una patologia multifattoriale derivante dall'interazione di più concause.

Non sono ancora stati condotti studi più approfonditi per correlare il livello di interleuchina-31 con altri parametri, mentre in umana quello che si è rilevato è che sia nei bambini che negli adulti il suo livello è correlato alla gravità della patologia.

Allo stesso modo gruppi di ricerca i cui intenti erano quelli di rilevare proteine correlate all'IL-31 hanno fallito (Mizuno et al., 2009), ma il fatto che in medicina umana da biopsie cutanee prese da pazienti affetti da dermatite atopica ne abbiamo confermato la presenza elevata in infiltrati infiammatori (Nobbe et al., 2012) è un buon motivo per approfondire gli studi, dal momento che per

i risultati ad ora ottenuti è una molecola sicuramente coinvolta nell'eziopatogenesi della dermatite atopica canina.

Le citochine associate ad una risposta dei linfociti Th1 di solito inducono risposte cellulo-mediate, in parte antagonizzando la risposta Th2. La risposta mediata dai linfociti Th1 è tipica della fase cronica dell'infiammazione.

L'  $\text{INF-}\gamma$  è considerata la citochina principale della risposta mediata dei linfociti Th1, al pari dell'IL-4 per la risposta mediata dai linfociti Th2. Non è una citochina coinvolta nelle fasi immediate della risposta cutanea, tant'è che le iniezioni intradermiche di anti-IgE non ne inducono la trascrizione.

Stimola l'espressione dei Fas sui cheratinociti, rendendoli più suscettibili all'apoptosi.

Si rileva nelle biopsie cutanee di soggetti con dermatite atopica spontanea, più di frequente quando le lesioni sono croniche e lichenificate. I suoi livelli appaiono più alti nella cute lesionata dei soggetti atopici, rispetto alla cute non lesionata o se paragonati ai soggetti sani (Figura 27) (Nuttall et al., 2002; Schlotter et al., 2011).

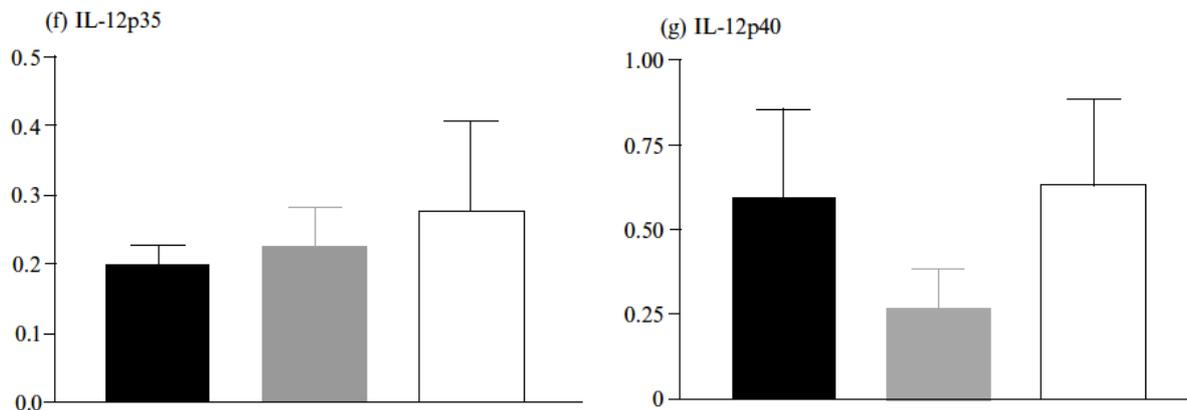
Quando un soggetto viene sottoposto ad immuno-terapia, i livelli di  $\text{INF-}\gamma$  tendono ad aumentare, suggerendo una risposta mediata dai linfociti Th1 (Mueller et al., 2005).

L' interleuchina-12 è un fattore critico nella differenziazione in una risposta mediata dai linfociti Th1 , nella produzione di  $\text{INF-}\gamma$  e nell'espressione di antigeni linfocitari cutanei.

Questa interleuchina è costituita da due subunità, la p35 e la p40. Quest'ultima viene considerata un ottimo indicatore di una risposta Th1-mediata.

La subunità p40 è anche condivisa da un altro tipo di interleuchina, l'IL-23, che invece prende parte alla risposta Th17 associata all'immunità mucosale e può essere coinvolta nei processi autoimmuni (Pucheu-Haston et al., 2015).

Nessuna delle due subunità dell'interleuchina-12 è espressa in modo diverso nella cute di soggetti atopici (Schlotter et al., 2011) , mentre in un altro studio si è evidenziato come la subunità p40 fosse maggiormente espressa nella cute lesionata di pazienti affetti da atopia (Figura 30) (Nuttall et al., 2002).

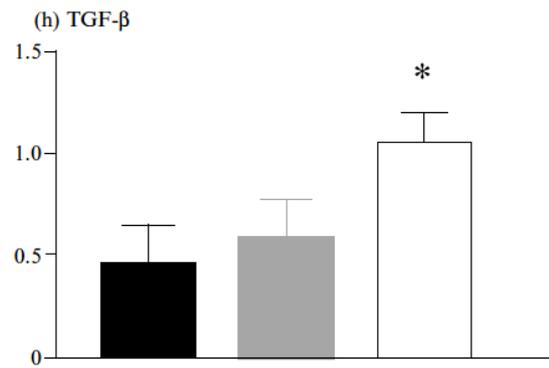


**Figura 30.** Livelli di espressione delle due subunità dell'IL-12, p35 e p40 nella cute di soggetti con cute lesionata e no, rispetto ai soggetti di controllo (Nuttall et al., 2002).

Importante è anche la valutazione dei fattori regolatori che oltre ad essere immuno-soppressivi possono essere pro-infiammatori. È difficile capire il ruolo di queste molecole dal momento che in alcune circostanze la loro attività regolatrice può essere inibita dalla presenza di altre citochine, come da alti livelli di IL-6: non è sempre chiaro quindi se partecipino alla diminuzione dell'inflammation piuttosto che ad un suo incremento (Pucheu-Haston et al., 2015).

Il fattore di crescita trasformante  $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$  o TGF- $\beta$ ) è una molecola prodotta da linfociti T e dai cheratinociti, la cui funzione sembra essere quella di indurre una tolleranza periferica e mucosale; il fatto che in un soggetto atopico la sua espressione sia molto bassa spiega il perché a seguito di esposizioni ad agenti allergizzanti vi sia una reazione di ipersensibilità, evidenziata sia nel cane sia nell'uomo.

I suoi livelli si sono rilevati nettamente inferiori in un soggetto atopico rispetto ad un soggetto sano (Figura 31) e si è evidenziata una sua diminuita espressione a seguito di esposizione ad allergeni ambientali (Nuttall et al., 2002; Maeda et al., 2007).



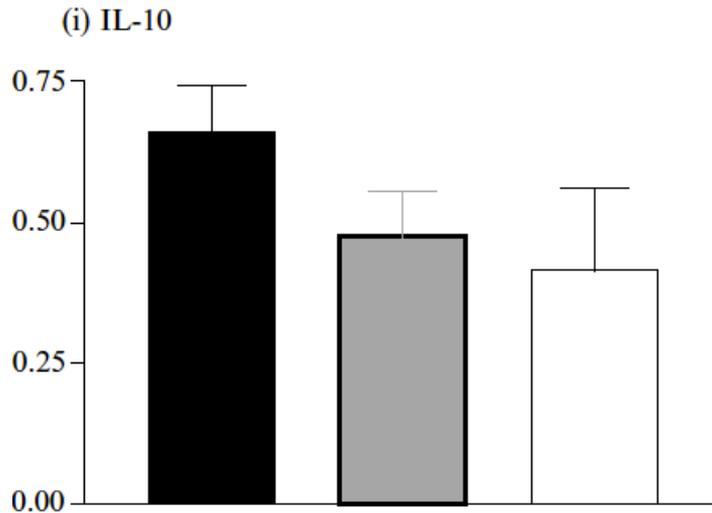
**Figura 31.** Livelli di espressione del TGF-  $\beta$  in soggetti affetti da dermatite atopica rispetto a soggetti sani (Nuttall et al., 2002).

L' interleuchina-10 è un'altra citochina coinvolta nei meccanismi di tolleranza immunitaria. Viene prodotta da cellule presentanti l'antigene (cellule B, monociti e macrofagi): la sua funzione sembra quella di regolare la sintesi degli anticorpi IgG4 e IgE antigene-specifici, aumentando i primi e diminuendo i secondi, oltre che controllare lo sviluppo periferico di T reg.

Viene espressa a livelli elevati nella cute lesionata di soggetti atopici (Figura 27;Figura 32) (Nuttall et al., 2002; Schlotter et al., 2011); nei topi viene espressa normalmente nella cute sana, ma solo nelle reazioni di fase tardiva in un modello di dermatite atopica, fenomeno che potrebbe spiegare la mancata risoluzione della reazione allergica-infiammatoria (Nuttall et al., 2002).

Al contrario, non sembra vi sia una differenza rilevante dal punto di vista dell'espressione nei linfociti periferici di soggetti atopici piuttosto che di soggetti sani (Hayashiya et al., 2002).

La spiegazione di questi risultati contrastanti può essere spiegata partendo dal presupposto che questa molecola abbia una doppia valenza: può mediare la risposta Th2 o regolare una risposta immunitaria alterata (Pucheu-Haston et al., 2015).



**Figura 32. Livelli di espressione dell'IL-10 in soggetti atopici confrontati con soggetti sani** (Nuttall et al., 2002).

L'ultima risposta immunitaria che sembra essere coinvolta nell'eziopatogenesi della dermatite atopica riguarda uno spostamento verso i T helper di tipo 17: questa sembra svolgere un ruolo di immunità protettiva contro patogeni extra cellulari ma può indurre anche infiammazione.

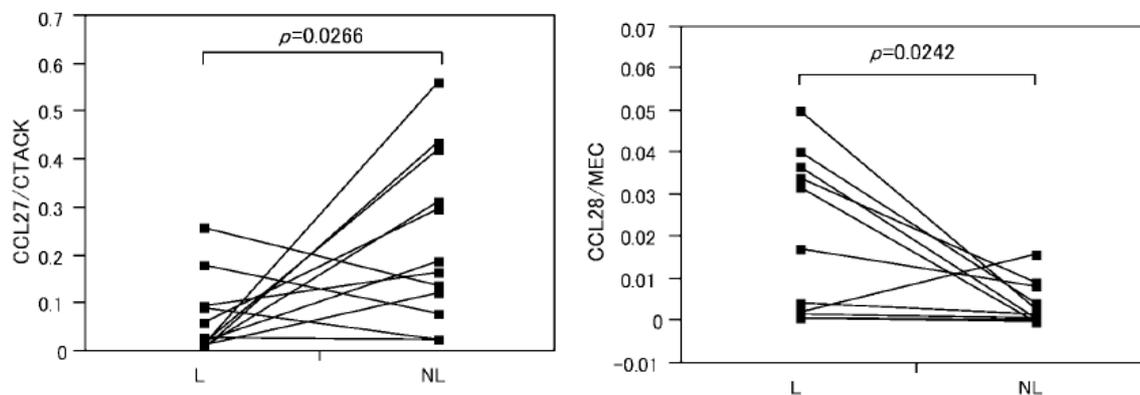
L'interleuchina-17 (IL-17) stimola la produzione di fattori antimicrobici incrementando le difese dell'ospite, inoltre produce citochine pro-infiammatorie stimolando il reclutamento di neutrofili e macrofagi nel sito d'infezione.

Nel caso di lesioni croniche presenti nella cute di soggetti atopici l'espressione dell'IL-17 appare relativamente bassa rispetto all'IL-22, dato in accordo con quanto riscontrato in medicina umana.

Il fattore di crescita dei granulociti e dei macrofagi (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor o GM-CSF) viene prodotto da una grande varietà di cellule tra cui i linfociti T, le cellule B, i fibroblasti, i linfociti natural killer, monociti, macrofagi e cellule epiteliali. Le sue proprietà pro-infiammatorie nelle patologie auto immuni e infiammatorie lo rendono vincolato alla risposta Th17. È stato studiato nei topi e nell'uomo, ancora lacunose sono le conoscenze nel cane. La sua attività sembra quella di inibire l'IL-12 implicata in una stimolazione di una risposta spostata verso i linfociti Th2 (Asahina et al., 2016).

Infine, anche il ruolo delle citochine chemotattiche è da considerarsi rilevante nella dermatite atopica canina: la chemochina CCL27 prodotta nella cute infiammata favorisce il fenomeno di homing delle cellule T, di conseguenza i suoi livelli nella cute lesionata di un soggetto atopico appaiono inferiori rispetto a quelli presenti nella cute non lesionata; la situazione è invece opposta

per quanto riguarda la chemochina CCL28, chemotattica per linfociti ed eosinofili (Figura 33) (Maeda et al., 2008).



**Figura 33.** Confronto tra i livelli di espressione delle chemochine CCL27 e CCL28 (Maeda et al., 2008).

### 4.3.3 MOLECOLE PROTEICHE

Tra le molecole proteiche implicate nell'eziopatogenesi della dermatite atopica canina si annovera la proteina legante il calcio S100A8: è una proteina pro-infiammatoria che induce la chemiotassi dei neutrofili, la cui sintesi è indotta dal TNF- $\alpha$ . Il gene S100 è fondamentale per una corretta differenziazione dei cheratinociti e quindi per evitare che si sviluppino delle alterazioni delle caratteristiche della barriera cutanea.

La proteina S100A8 può anche considerarsi implicata nello sviluppo di una risposta immunitaria mediata dai linfociti Th2 nelle fasi acute dell'infiammazione, mentre dai linfociti Th1 nel caso di infiammazioni croniche (Wood et al., 2009).

Per quanto riguarda l'espressione di altre proteine vanno menzionati tre inibitori delle proteinasi: SERPINB4 (inibitore della serin proteasi), TIMP1 (metallo-proteinasi) e SPINK5 (inibitore della serin proteasi). Possono essere espressi anche in altre condizioni patologiche, come nel caso della SERPINB4 nelle forme tumorali, tuttavia i TIMPs degradando la matrice extracellulare possono indurre condizioni fibrotiche nel caso di lesioni croniche e la SPINK5 è coinvolta nella morfogenesi del pelo e della cute, in particolare favorisce il fenomeno di proteolisi durante la formazione dell'epidermide e la differenziazione dei cheratinociti. Essendo anche espressa nel timo, si pensa possa causare un'alterata maturazione dei linfociti T e favorire uno spostamento verso i linfociti Th2 (Wood et al., 2009; Pucheu-Haston et al., 2015).

Questa proteina è presente in misura maggiore in soggetti atopici rispetto a soggetti sani e mutazioni a carico del gene di questa proteina, implicata nella morfogenesi della cute e del pelo, nell'uomo è correlata alla sindrome di Netherton, caratterizzata da ittiosi e dermatite atopica mentre nel cane una sua alterata espressione causa anomalie a carico della barriera cutanea.

Infine, in medicina umana, l'INPPL1, proteina coinvolta nei meccanismi di trasporto del calcio e di attivazione del sistema immunitario, si è vista alterare le reazioni mediate da IgE allergene-specifiche in caso di alterazioni della sua espressione: nel cane i suoi livelli si sono visti aumentati sia nella cute lesionata che non di soggetti atopici (Wood et al., 2009).

#### **4.4 CORRELAZIONE TRA UNA RISPOSTA IMMUNITARIA ALTERATA E LA GRAVITA' DELLA PATOLOGIA**

Come già espresso nei paragrafi precedenti, c'è la possibilità che tramite la via percutanea di esposizione all'agente allergizzante si scateni una reazione sistemica nel paziente, sebbene non sia ancora noto se l'allergene venga trasportato nel sito interessato dall'infiammazione o vi sia un sistema di *homing* da parte di cellule T della memoria selettive. Questo fa dedurre la poca importanza relativa alle vie di esposizione nel determinare il tipo di lesioni e la loro distribuzione (Marsella et al., 2006).

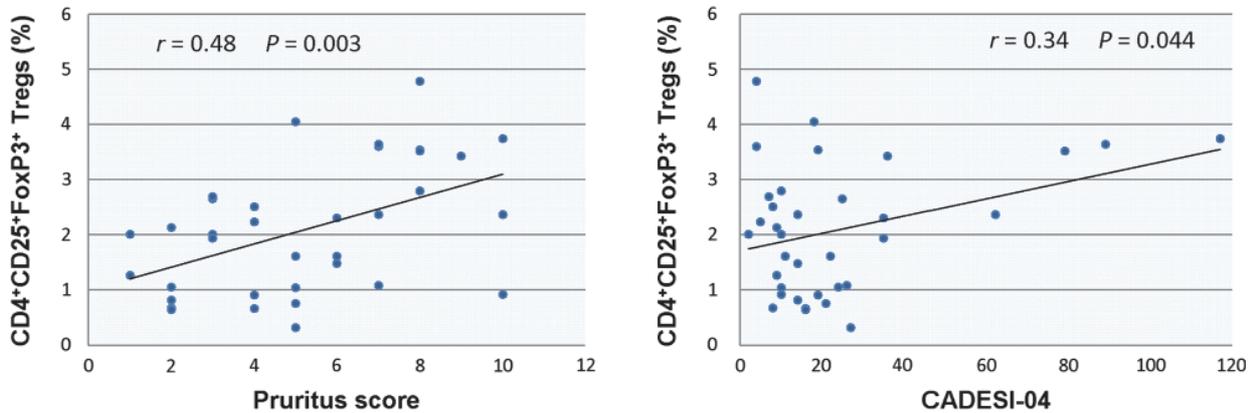
È evidente invece come il pattern di citochine che possono ritenersi responsabili della manifestazione clinica e delle lesioni individuate in un paziente atopico può essere molto variabile e dinamico: questo dipende dalla fase in cui si trova la lesione, acuta piuttosto che cronica (Maeda et al., 2002).

Non sono numerosi gli studi che hanno valutato la correlazione tra la gravità della dermatite atopica rispetto alla quantità delle linee cellulari circolanti che partecipano all'insorgere o al controllo della patologia. Per quanto riguarda le citochine e le molecole proteiche, non si è ancora raggiunta la piena e totale comprensione dei fenomeni clinici associati, tuttavia per alcune di esse la correlazione con il sintomo o la gravità della patologia è già stata evidenziata.

Tra le molecole di cui è nota la conseguenza clinica che scatenano vanno considerate la citochina TARC, l'IL-31 e la proteina S100A8 e per quanto riguarda le linee cellulari vanno considerati i linfociti T reg.

L'aumento dei T reg ematici è correlato in modo moderato ma statisticamente significativo con la CADESI-04 e con la VAS (Figura 34), suggerendo una correlazione con la gravità della patologia (Hauck et al., 2016), evidenza che anche in medicina umana è stata dimostrata (Gàspar et al., 2015).

Uno studio condotto in medicina umana aveva avanzato l'ipotesi che, una volta che la lesione fosse migliorata, le cellule T reg migrassero verso un'altra regione danneggiata dall'infiammazione (Ito et al., 2009).



**Figura 34.** Correlazione tra la percentuale dei T reg di soggetti atopici e la gravità della patologia (Hauck et al., 2016).

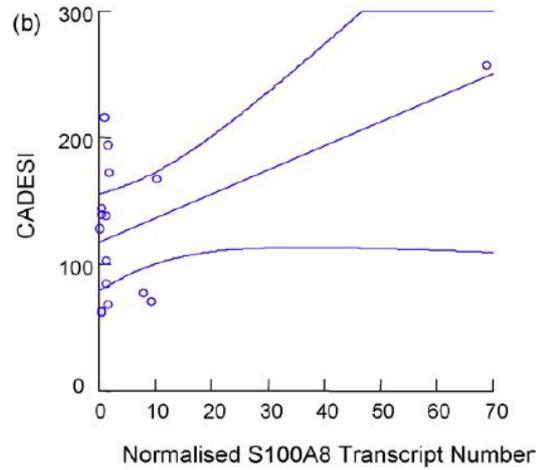
L'aumento dei T reg ematici correlato alla gravità della patologia può spiegarsi considerando un fenomeno che si è visto esserci nell'uomo ma non è ancora stato studiato in medicina veterinaria: potrebbero essere dei T reg periferici formati dall'attivazione di cellule CD4<sup>+</sup> a seguito di una stimolazione allergica incessante come processo di risposta ed adattamento del sistema immunitario, oppure potrebbero anche essere cellule T ad attività non regolatrice, concetto che spiegherebbe anche la persistenza della patologia allergica nei soggetti studiati (Hauck et al., 2016).

La produzione della citochina TARC, implicata nel reclutamento dei linfociti Th2, si è vista essere correlata con lo sviluppo di acantosi: nell'uomo questa molecola è prodotta principalmente dai cheratinociti. L'aumentata attività di queste cellule, impegnate nella sintesi della molecola, potrebbe essere anche nel cane la spiegazione dell'ipercheratosi che sovente si manifesta in forme croniche di dermatite atopica (Maeda et al., 2002).

Una delle citochine che si è rivelata maggiormente espressa in un soggetto atopico è l'IL-31: la sua sovra espressione determina delle conseguenze cliniche, rilevate per la prima volta nei topi, come un'aumentata infiltrazione cellulare nella cute, prurito intenso, alopecia e lesioni cutanee. Viene rilevata in più del 50% del siero di soggetti atopici ma non affetti da altre patologie dermatologiche (Gonzales et al., 2013). Anche in medicina umana si è evidenziato che l'IL-31 è presente a livelli maggiori nel siero dei bambini affetti da dermatite atopica estrinseca e ciò è correlato ad un

aumento degli indici della SCORAD, alla mancanza di sonno nei pazienti affetti e ad alcune delle citochine della risposta mediata dai linfociti Th2, quali l'IL-4 e l'IL-13 (Raap et al., 2012).

Infine, per quanto riguarda le proteine, un aumento del S100A8 è stato visto essere correlato con la CADESI-03 (Figura 35) (Wood et al., 2009).



**Figura 35.** Correlazione tra l'espressione della proteina S100A8 e la scala di valutazione della gravità delle lesioni CADESI-03 (Wood et al., 2009).

## **5 APPROCCIO TERAPEUTICO IMMUNO – MODULATORE**

La terapia della dermatite atopica canina deve essere attuata attraverso un approccio multimodale, orientato a ridare al paziente un miglior grado di comfort attraverso la diminuzione o la scomparsa del prurito e delle manifestazioni secondarie della patologia.

Di recente grande attenzione si è focalizzata su tutte le terapie volte a fornire l'integrità della cute e a favorire il ripristino della barriera cutanea: questa linea terapeutica può essere affiancata da una terapia immuno – modulatrice, mirata a normalizzare una risposta immunitaria sbilanciata che favorisce l'insorgere della malattia.

Sono numerosi i principi attivi o le proposte terapeutiche formulate per raggiungere questo obiettivo: dagli inibitori della calcineurina (il tacrolimus e la ciclosporina), agli inibitori delle Janus chinasi (l'Oclacitinib), agli interferoni (INFs), alla terapia con gli anticorpi monoclonali e infine all'immuno – terapia o iposensibilizzazione.

### **5.1 CICLOSPORINA**

La ciclosporina è un macrolide oligopeptide ciclico lipofilo con proprietà immunomodulatrici e immunosoppressive, definita come un inibitore della calcineurina, isolata per la prima volta negli anni '70 (Olivry et al., 2002; Guaguère et al., 2004).

La sua efficacia è stata documentata in medicina veterinaria per la cura della dermatite atopica canina per la prima volta nel 2001 (Fontaine et al., 2001); ben prima invece in medicina umana, dove il suo utilizzo nella terapia di questa patologia risale al 1987 (Joost et al., 1987).

La ciclosporina è uno dei farmaci anti-pruriginosi più potenti valutata da “buona ad eccellente” in circa il 75% dei soggetti atopici (Olivry et al., 2002).

In origine, in medicina umana le sue proprietà immunosoppressive venivano sfruttate in pazienti sottoposti a trapianti d'organo; ad oggi viene ampiamente utilizzata nelle condizioni allergiche, anche in medicina veterinaria.

Il suo meccanismo d'azione è mirato ad inibire la produzione di prostaglandine, l'espressione di citochine, in particolare l'interleuchina-2 (IL-2), molecola che andrebbe poi ad attivare le cellule coinvolte nella risposta immunitaria cutanea; tra queste, le cellule del Langherans e i linfociti –

soprattutto i linfociti CD4<sup>+</sup> - e le cellule effettrici dei processi allergici: gli eosinofili e i mastociti, di cui limita la sopravvivenza e il successivo rilascio di istamina.

Inibisce l'espressione anche di altre citochine, quali l' IL-4, IL-5, IL-3, IL-8, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$  e GM-CSF.

Allo stesso tempo tuttavia favorisce l'espressione di altri geni, come quello codificante il TGF- $\beta$ , molecola che porta ad un aumento della sintesi della matrice extracellulare.

Il suo meccanismo d'azione si espleta una volta che la molecola si è legata alla ciclofillina, formando un complesso che va ad inibire la calcineurina, enzima coinvolto nello spostamento del fattore di trascrizione del gene dell'IL-2 (Figura 36) (Marsella et Olivry, 2001; Steffan et al., 2006; Guaguère et al., 2004).

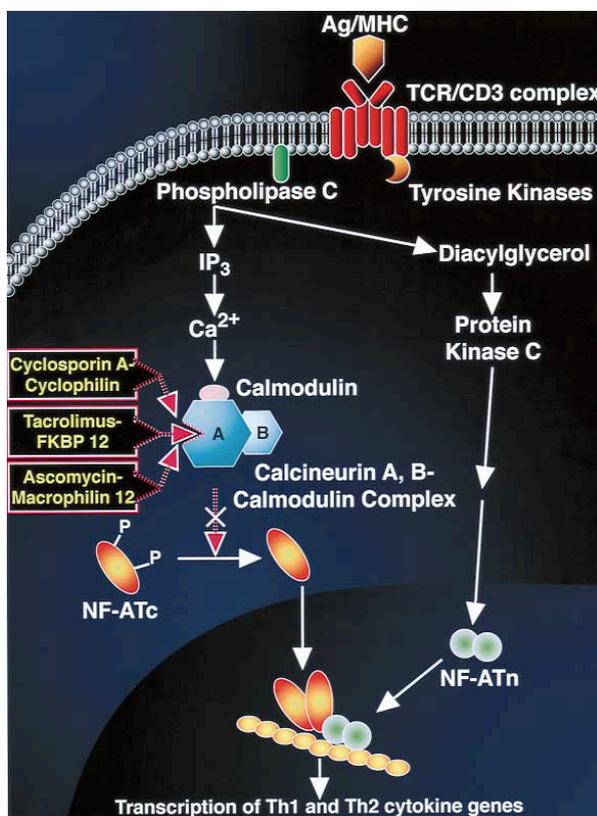


Figura 36. Meccanismo dell'azione immunosoppressiva dei macrolidi su cellule T (Leung, 2000).

Come evidenziato dal suo meccanismo d'azione la ciclosporina è un principio che va ad agire su molecole e cellule del sistema immunitario del paziente.

Partendo dal presupposto che uno spostamento a favore di una risposta dei linfociti Th2 è alla base dell'eziopatogenesi della dermatite atopica canina, il risultato che si vorrebbe ottenere con la ciclosporina è il ripristino di un equilibrio della risposta immunitaria Th1 e Th2.

I dati ottenuti dalla somministrazione del farmaco evidenziano un'inibizione della risposta delle citochine Th1/Th2 a livello cutaneo e, in contrasto con quanto affermava la letteratura precedente (Archer et al., 2011), anche un'influenza sull'immunità adattativa e innata (Kim et Park, 2016).

Tra le varie cellule implicate nei processi allergici e auto-immuni ci sono una sottocategoria di linfociti T, le cellule T regolatorie (T reg), sulle quali la ciclosporina potrebbe agire.

A causa dei risultati contrastanti ottenuti da diversi studi è difficile capire quale ruolo rivestano i T reg nell'eziopatogenesi della dermatite atopica canina e non possono essere considerati un buon indice per valutare l'efficacia d'azione del farmaco, dal momento che il trattamento con questo principio attivo sembra non interferire con le sottopopolazioni di linfociti circolanti (Beccati et al., 2016).

Un altro dato che andrebbe considerato è il rapporto tra i linfociti CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>: un'alterazione delle concentrazioni di queste popolazioni linfocitarie a favore della popolazione CD8<sup>+</sup> può indurre delle risposte immunitarie anomale. Tuttavia, sembra che anche il rapporto CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> non venga modificato dal trattamento con la ciclosporina (Conegliani et al., 2012).

Pochi sono ancora gli studi in medicina veterinaria mirati ad eseguire valutazioni su soggetti che presentano patologie immuno – mediate.

L'effetto immunomodulatore può essere dovuto e spiegato con l'influenza della ciclosporina sull'espressione delle citochine prevalentemente implicate nell'eziopatogenesi della dermatite atopica: 3 potenziali marker di questo effetto potrebbero essere l'IL-2, l'IL-4 e l'IFN- $\gamma$ .

Uno studio condotto da Archer e colleghi nel 2011, relativamente alla valutazione della popolazione linfocitaria a seguito di trattamento con ciclosporina, dimostra come l'IL-2 e l'INF- $\gamma$  in soggetti in cura con ciclosporina a dosaggi immunosoppressivi siano in concentrazioni minori e possano considerarsi quindi degli ottimi biomarkers dell'effetto del farmaco sul sistema immunitario: studi ulteriori saranno comunque necessari per arrivare a predire in modo più accurato quale sia l'esatto effetto immunosoppressivo della ciclosporina (Archer et al., 2011).

La ciclosporina viene somministrata nel cane affetto da dermatite atopica al dosaggio di 5 mg/kg una volta al giorno per via orale per 4-6 settimane, come dose di attacco (fase di induzione); questo dato è stato confermato da due studi condotti in medicina veterinaria (Fontaine et Olivry, 2001; Olivry et al., 2002), i quali a loro volta hanno estrapolato questo dato sulla base di valutazioni eseguite in medicina umana (Salek et al. 1993; Joost et al., 1994; Naeyaert et al., 1999), partendo

dal presupposto che la farmacocinetica del farmaco sia simile in ambedue le specie (Gauguère et al., 2004): in medicina umana il farmaco viene solitamente somministrato allo stesso dosaggio con risultati soddisfacenti, sebbene ci siano evidenze che anche una dose giornaliera minore possa essere efficace (Olivry et al., 2002). Va sottolineato come il miglioramento clinico non sia correlato alla concentrazione ematica del farmaco (Archer et al., 2011).

Uno studio condotto nel 2006 di Steffan e colleghi ha proposto una revisione di 10 studi clinici condotti su cani affetti da dermatite atopica ai quali veniva somministrato questo principio attivo, facendo emergere risultati soddisfacenti.

Conclusa la fase di induzione ci si aspetta di ottenere una riduzione almeno del 40% delle lesioni cutanee e del 30% del prurito.

Dopo 4-6 settimane, la percentuale di soggetti in cui si è rilevata una diminuzione di più del 50% delle lesioni varia dal 28 al 71%, mentre la percentuale di soggetti in cui si è registrata una diminuzione di più del 50% del prurito varia dal 35% al 67%.

La sua efficacia viene quindi stimata in una percentuale di soggetti tra il 53-63% (Tabella 12).

Per il loro effetto anti – pruriginoso, questi valori potrebbero essere inferiori se il soggetto fosse stato trattato concomitantemente con corticosteroidi.

| Citation (reference)   | Fontaine 2001 <sup>8</sup> | Iwasaki 2002 <sup>23</sup> | Olivry 2002 <sup>17</sup>    | Olivry 2002 <sup>18</sup>  | Steffan 2003 <sup>19</sup> |
|--|----------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Induction end time point (weeks)   | 2                          | 6                          | 6                            | 6                          | 4                          |
| % of reduction from baseline lesional scores (investigators)                 | 60% (30–73)                | 53% (46–61)                | 58% (43–74)                  | 67% (53–78)†               | 44% (40–49)                |
| % of dogs with ≥ 50% reduction from baseline lesional scores (investigators) | NA                         | 60%*                       | 60%                          | 71%†                       | 42%                        |
| % of reduction from baseline pruritus scores (owners)                        | 100% (68–100)              | NA                         | 78% (52–87)                  | 45% (27–63)†               | 34% (27–41)                |
| % of dogs with ≥ 50% reduction from baseline pruritus scores (owners)        | NA                         | NA                         | 67%                          | 48%†                       | 35%                        |
| % of dogs with mild pruritus (score ≤ 2/5)                                   |                            |                            |                              |                            |                            |
| Week 0   | NA                         | 6%                         | NA                           | 13%                        | 6%                         |
| Week 4   | NA                         | 59%                        | NA                           | 56%                        | 47%                        |
| % with global assessment of treatment success (investigators)                | 93%                        | 63%                        | NA                           | 61%†                       | NA                         |
| % with global assessment of treatment success (owners)                       | NA                         | 67%*                       | NA                           | 61%†                       | NA                         |
| Citation (reference)   | Olivry 2003 <sup>21</sup>  | Burton 2004 <sup>20</sup>  | Bensignor 2004 <sup>10</sup> | Steffan 2005 <sup>24</sup> | Thelen 2005 <sup>25</sup>  |
| Induction end time point (weeks)   | 4                          | 6                          | 4 (e)                        | 4                          | 4                          |
| % of reduction from baseline lesional scores (investigators)                 | 49% (41–56)‡               | 84% (79–89)                | 30% (20–40)**                | 45% (37–48)                | 37% (28–46)¶               |
| % of dogs with ≥ 50% reduction from baseline lesional scores (investigators) | 37%‡                       | 95%                        | 20%**                        | 45%                        | 28%¶                       |
| % of reduction from baseline pruritus scores (owners)                        | 33% (27–43)‡               | NA                         | 27%                          | NA                         | 53% (42–64)¶               |
| % of dogs with ≥ 50% reduction from baseline pruritus scores (owners)        | 50%‡                       | NA                         | NA                           | NA                         | 44%¶                       |
| % of dogs with mild pruritus (score ≤ 2/5)                                   |                            |                            |                              |                            |                            |
| Week 0   | NA                         | 7%                         | NA                           | 6%                         | 0%                         |
| Week 4   | NA                         | 90%§                       | NA                           | 41%                        | 32%                        |
| % with global assessment of treatment success (investigators)                | NA                         | 53%                        | NA                           | 59%                        | NA                         |
| % with global assessment of treatment success (owners)                       | NA                         | 48%                        | NA                           | 48%                        | NA                         |

**Tabella 12.** Valutazione clinica durante la fase d'induzione con la ciclosporina (Steffan et al., 2006).

Di questi 10 studi, 5 si sono concentrati su una valutazione a lungo termine del farmaco, per una durata variabile dai 3 ai 6 mesi.

Si è dimostrato come prolungando il periodo di somministrazione del farmaco, mantenendo lo stesso dosaggio, la percentuale di pazienti che otteneva una riduzione del 50% delle lesioni variasse dal 20 al 60% e dal 63 all'87% rispettivamente dopo 4 e 12-16 settimane.

Per quanto riguarda il prurito: nella fase iniziale dello studio si è partiti da una percentuale di soggetti con un sintomo lieve variabile dallo 0 al 13%, per arrivare, dopo le 16 settimane, a dei risultati sempre maggiori, con un valore massimo del 93% di soggetti nei quali il prurito era lieve o assente.

Anche in questi studi è stata condotta una valutazione dell'efficacia, raggiunta in un intervallo di soggetti variabile tra il 65-76% (Tabella 13) (Steffan et al., 2006).

| Citation (reference)   | Steffan 2003 <sup>19</sup> |      |       |          | Olivry 2003 <sup>21</sup> |     |             |     | Bensignor 2004 <sup>10</sup> |          |      |       | Steffan 2005 <sup>24</sup> |      |       |     | Thelen 2005 <sup>25</sup> |       |     |      |             |     |      |       |          |
|--|----------------------------|------|-------|----------|---------------------------|-----|-------------|-----|------------------------------|----------|------|-------|----------------------------|------|-------|-----|---------------------------|-------|-----|------|-------------|-----|------|-------|----------|
| % of reduction from baseline lesional scores (confidence interval)                                       |                            |      |       |          | DD*                       |     | II*         |     |                              |          |      |       | With food                  |      |       |     | Without food              |       |     |      |             |     |      |       |          |
| Week 4   | 44% (40-49)                |      |       |          | 37% (33-56)               |     | 52% (42-63) |     | 30% (20-40)                  |          |      |       | 45% (41-48)                |      |       |     | 37% (28-46)               |       |     |      | 37% (14-60) |     |      |       |          |
| Week 8   | 53% (47-59)                |      |       |          | 69% (55-75)               |     | 54% (51-73) |     | 59% (39-64)†                 |          |      |       | 58% (57-64)                |      |       |     | 54% (42-66)               |       |     |      | 53% (40-74) |     |      |       |          |
| Week 12  | 50% (43-57)                |      |       |          | 58% (43-70)               |     | 66% (52-74) |     | 79% (53-83)†                 |          |      |       | 57% (63-70)                |      |       |     | 60% (49-71)               |       |     |      | 62% (44-80) |     |      |       |          |
| Week 16  | 52% (44-59)                |      |       |          | NA                        |     | NA          |     | NA                           |          |      |       | 60% (66-73)                |      |       |     | 64% (52-68)               |       |     |      | 56% (35-77) |     |      |       |          |
| % of dogs with ≥ 50% reduction from baseline lesional scores (investigations)                            | 4                          | 8    | 12    | 16 weeks | 4                         | 8   | 12 weeks    | 4   | 8                            | 12 weeks | 4    | 8     | 12 weeks                   | 4    | 8     | 12  | 16 weeks                  | 4     | 8   | 12   | 16 weeks    | 4   | 8    | 12    | 16 weeks |
|  | 43%                        | 66%  | 63%   | 66%      | 40%                       | 73% | 73%         | 60% | 67%                          | 80%      | 20%  | 67%   | 87%                        | 45   | 68    | 64  | 68                        | 26%   | 60% | 73%  | 86%         | 30% | 60%  | 80%   | 60%      |
| % of dogs with mild pruritus (score ≤ 2/5 or ≤ 100/250)  |                            |      |       |          |                           |     |             |     |                              |          |      |       |                            |      |       |     |                           |       |     |      |             |     |      |       |          |
| Week 0   | 6%                         |      |       |          | 7%                        |     |             |     | 13%                          |          |      |       | NA                         |      |       |     | 12%                       |       |     |      | 0%          |     |      |       |          |
| Week 4   | 47%                        |      |       |          | 60%                       |     |             |     | 67%                          |          |      |       | NA                         |      |       |     | 58%                       |       |     |      | 20%         |     |      |       |          |
| Week 8   | 51%                        |      |       |          | 73%                       |     |             |     | 53%                          |          |      |       | NA                         |      |       |     | 64%                       |       |     |      | 80%         |     |      |       |          |
| Week 12  | 47%                        |      |       |          | 46%                       |     |             |     | 53%                          |          |      |       | NA                         |      |       |     | 63%                       |       |     |      | 53%         |     |      |       |          |
| Week 16  | 51%                        |      |       |          | NA                        |     |             |     | NA                           |          |      |       | 64%                        |      |       |     | 80%                       |       |     |      | 60%         |     |      |       |          |
| % of dogs receiving reduced Doses during weeks   | 4-8                        | 8-12 | 12-16 | 4-8      | 8-12                      | 4-8 | 8-12        | 4-8 | 8-12                         | 4-8      | 8-12 | 12-16 | 4-8                        | 8-12 | 12-16 | 4-8 | 8-12                      | 12-16 | 4-8 | 8-12 | 12-16       | 4-8 | 8-12 | 12-16 |          |
| Half dose = e.o.d. or 2.5 mg kg <sup>-1</sup> q.i.d.   | 50%                        | 58%  | 42%   | 40%      | 33%                       | 60% | 47%         | NA  | NA                           | 38%      | 50%  | 35%   | 7%                         | 47%  | 13%   | 30% | 30%                       | 40%   | 30% | 30%  | 40%         | 30% | 30%  | 40%   |          |
| Quarter dose = TW or 1.25 mg kg <sup>-1</sup> q.i.d.   | 14%                        | 26%  | 40%   | 20%      | NA                        | 20% | NA          | 11% | 21%                          | 0%       | 13%  | 68%   | 20%                        | 70%  | 68%   | 20% | 70%                       | 68%   | 20% | 70%  | 68%         | 20% | 70%  |       |          |
| % of dogs with /good-to-excellent/ global assessment of efficacy as assessed by investigators and owners | 75%-76%                    |      |       |          | NA                        |     |             |     | NA                           |          |      |       | 65%-69%                    |      |       |     | 68%                       |       |     |      |             |     |      |       |          |

**Tabella 13. Valutazione clinica durante la fase di mantenimento con la ciclosporina** (Steffan et al., 2006).

Durante la fase di mantenimento, la ciclosporina non dovrebbe mai essere somministrata in dosi ridotte rispetto al dosaggio d'attacco, perché si rischia di causare un peggioramento della sintomatologia.

La risposta di un soggetto al farmaco già dopo le prime 4 settimane di terapia è predittiva di una buona riuscita dell'iter terapeutico della durata di 12-16 settimane, con un potenziale netto miglioramento delle lesioni cutanee (Steffan et al., 2006).

È prevedibile che nel caso di lesioni croniche (i.e. lichenificazione), trattamenti non prolungati nel tempo non portino a dei risultati clinici evidenti e soddisfacenti (Olivry et al., 2002).

Per quanto riguarda l'efficacia, questo farmaco può essere paragonato ai corticosteroidi dal punto di vista dei risultati clinici ottenuti, ma lo stesso non si può affermare per gli effetti collaterali (Tabella 15) (Olivry et al., 2002).

I corticosteroidi si sono rivelati efficaci per la gestione del paziente atopico soprattutto nel caso in cui il trattamento non richiedesse periodi eccessivamente lunghi di somministrazione (Olivry et al., 2015).

L'obiettivo che ci si prefigge è quello di utilizzare, qualora possibile, sempre meno i corticosteroidi a vantaggio di altri farmaci che inducano nel paziente meno effetti collaterali (Olivry et al., 2002).

Uno studio del 2002 mette a confronto i risultati ottenuti su pazienti atopici gestiti per 6 settimane con il prednisolone e la ciclosporina.

Con entrambe le molecole si osserva una diminuzione dell'indice delle lesioni e del livello di prurito (Tabella 14), rispettivamente del 69% e dell'81% con il prednisolone e del 58% e del 78% con la ciclosporina. Nei due gruppi di soggetti la valutazione del prurito (PVAS) e l'indice delle lesioni (CADESI) non dimostravano differenze statisticamente significative (Figura 37) (Olivry et al., 2002).

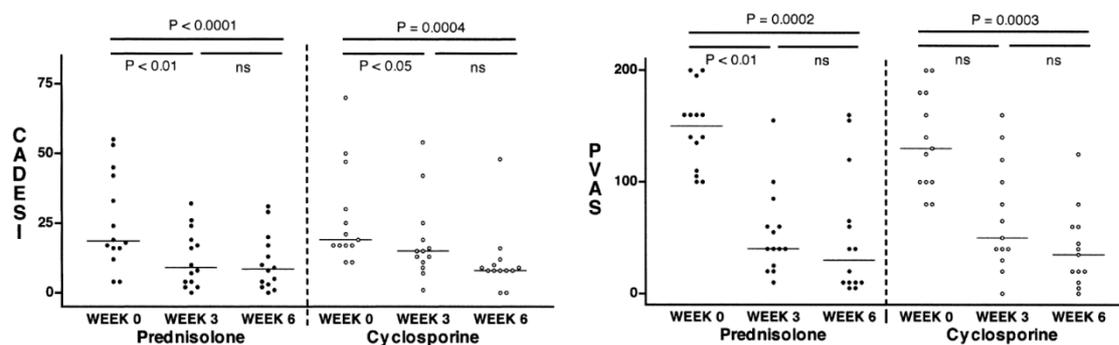


Figura 37. Indice delle lesioni e del prurito dopo trattamento con prednisolone e ciclosporina (Olivry et al., 2002).

| Treatment group | % reduction CADESI | % reduction PVAS |
|-----------------|--------------------|------------------|
| Prednisolone    | 69 (30–84)*        | 81 (45–86)†      |
| Cyclosporine    | 58 (43–74)*        | 78 (52–87)†      |

Tabella 14. Riduzione percentuale delle lesioni e del prurito a seguito di trattamento con prednisolone e ciclosporina (Olivry et al., 2002).

Sicuramente, un uso spropositato dei corticosteroidi ha una probabilità di indurre gravi effetti collaterali molto alta rispetto ad un trattamento a lungo termine con la ciclosporina, per la quale gli effetti collaterali solitamente riscontrati sono a carico dell'apparato digerente e non richiedono interventi.

Altri ne erano stati indicati tuttavia, ma rari e di minore importanza, risolvibili con una diminuzione della dose somministrata e/o una sospensione del farmaco (Steffan et al., 2006).

Ad esempio uno studio degli anni 2000, supportato da altri studi condotti negli anni '80 (Rosenkrantz et al., 1989; Ryffel et al., 1983; Ruehl et al., 1987; Seibel et al., 1989) evidenziava, oltre alla possibilità di effetti collaterali a carico dell'apparato gastroenterico, l'esplosione di eruzioni papillomatose generalizzate, risolte poi sospendendo per due mesi la terapia. Dal punto di vista istopatologico queste hanno l'aspetto di lesioni maligne, per la presenza di attività mitotica aumentata e occasionali figure mitotiche anomale (Olivry et al., 2002).

Uno degli effetti collaterali che si riscontra in medicina umana a seguito di una somministrazione protratta per lungo tempo è la presenza di valori aumentati di urea, nitrati e creatinina nel sangue. Probabilmente l'effetto di fibrosi renale che alle volte si riscontra è imputabile ad un' aumentata trascrizione del TGF- $\beta$  (Gauguère et al., 2004). Questo effetto in medicina veterinaria non è ancora stato documentato (Tabella 15) (Olivry et al., 2002).

Considerati i risultati ottenuti dagli studi attuali si può concludere che non vi sia la necessità, qualora il farmaco venga somministrato per tempi brevi, di ricorrere a test ematobiochimici di controllo, dati i pochi effetti collaterali evidenziati (Gauguère et al., 2004).

Un altro aspetto interessante della ciclosporina è che alcuni farmaci, se somministrati concomitantemente, ne elevano i livelli ematici, permettendo quindi, una riduzione del dosaggio del principio attivo, oltre che delle tempistiche di utilizzo della ciclosporina stessa.

Nell'uomo, sono numerose le interazioni che si sono studiate, per la necessità di mantenere bassi i livelli ematici della ciclosporina a causa del basso margine di sicurezza della molecola.

Nel cane un principio con cui si è visto che la ciclosporina dà interazione è il ketoconazolo, principio attivo utilizzato, anche se non di frequente, nel trattamento delle dermatofitosi (Figura 6) (Gauguère et al., 2004).

L'aumento ematico della ciclosporina è direttamente proporzionale alla concentrazione di ketoconazolo nel range di 2-12 mg/kg: la co-somministrazione dei due principi è positiva data la notevole riduzione della dose giornaliera della ciclosporina che si può ottenere (Mouatt, 2002).

Confrontando l'efficacia di un utilizzo combinato di ciclosporina, somministrata alla dose di 5 mg/kg una volta al giorno per 28 giorni, con il prednisolone, somministrato per 20 giorni al dosaggio di 1 mg/kg per una settimana e successivamente ad 1 mg/kg a giorni alterni per le restanti

sette somministrazioni, si è visto che il risultato è sicuro e ha portato ad una rapida riduzione del prurito.

Come già emerso da studi precedenti, l'efficacia della ciclosporina si evidenzia dopo un periodo di somministrazione di 4 settimane in concomitanza con i corticosteroidi e dal punto di vista clinico i benefici risultano da una riduzione accelerata del sintomo prurito e un miglioramento delle lesioni cliniche; la probabile riduzione di atteggiamenti auto-traumatici ha permesso anche di rilevare una minor incidenza di piodermiti in questi pazienti.

Noti gli effetti collaterali indotti dai corticosteroidi, questi si sono evidenziati anche in un numero non elevato di soggetti coinvolti in questo studio, confermando le conseguenze che questi farmaci possono avere sui pazienti (Dip et al., 2013).

Nonostante la ciclosporina si riveli un farmaco nel complesso sicuro, ancora numerosi potrebbero essere gli studi da condurre su di esso:

- non si sono ancora accertati e confermati i suoi effetti su periodi di tempo molto lunghi (fino all'anno e oltre): uno studio, ad esempio, ha evidenziato un trend crescente di possibilità di sviluppo di effetti collaterali nel caso di somministrazioni del farmaco prolungate nel tempo (Radowicz et Power, 2003), però mancano ancora evidenze su quali tipo di effetti scatenino, a quali dosaggi e dopo che finestra temporale;
- non si è ancora studiata una precisa evoluzione della patologia dopo l'interruzione dell'assunzione del farmaco;
- non esistono ancora dati in merito ad una potenziale efficacia di questo principio nei soggetti affetti da dermatite atopica refrattari ai corticosteroidi.

Quindi, per i suoi costi elevati e dei tempi d'azione relativamente lunghi, i corticosteroidi vengono sempre utilizzati come terapia d'attacco mentre la ciclosporina è considerato un farmaco di seconda scelta: è evidente come sia però un farmaco di sempre maggiore interesse ed utilizzo, sia per la sua efficacia che per la sua sicurezza.

|                                   | <b>CANE</b>   | <b>UOMO</b>   |
|-----------------------------------|---|---|
| <b>BIODISPONIBILITA'</b>          | 35%   | 30-40%  |
| <b>FORMULAZIONE</b>               | Prima formulazione a base di olio vegetale, poi microemulsione in soffici capsule gelatinose di 10, 25, 50 e 100 mg.<br>Nuovo prodotto oggi in commercio: una formulazione orale a 100 mg/ml.                             | Prima formulazione in olio vegetale a 100 mg/ml presente come soluzione o capsule gelatinose, poi microemulsione.   |
| <b>SOMMINISTRAZIONE</b>           | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Due ore prima o dopo il pasto (variazioni dell'assorbimento se a contatto con il cibo);</li> <li>➤ 1 volta al giorno.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Due ore prima o dopo il pasto (variazioni dell'assorbimento se a contatto con il cibo). Scarso effetto se somministrata per via topica (scarso assorbimento cutaneo);</li> <li>➤ 2 volte al giorno.</li> </ul> |
| <b>INTERAZIONI FARMACOLOGICHE</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ketoconazolo;</li> <li>➤ cimetidina (anti istaminico di tipo 2)</li> <li>➤ vitamina E;</li> <li>➤ glicole polietilenico;</li> <li>➤ acido succinico.</li> </ul>                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ ketoconazolo;</li> <li>➤ eritromicina;</li> </ul>  |
| <b>EFFETTI COLLATERALI</b>        | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Disturbi gastroenterici (vomito nel 14-42% e diarrea nel 16%-18% dei casi);</li> <li>➤ edema gengivale (3%);</li> <li>➤ lesioni simil - papillomatose (1 unico caso).</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Nefrotossicità;</li> <li>➤ aumento pressione ematica;</li> <li>➤ aumento dell'attività degli enzimi epatici;</li> <li>➤ disturbi cutanei (2%).</li> </ul>  |
| <b>INDICAZIONI</b>                | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Dermatite atopica canina;</li> <li>➤ fistole perianali.</li> </ul>   | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Dermatite atopica umana;</li> <li>➤ psoriasi.</li> </ul>   |

**Tabella 15. Ciclosporina.** Proprietà della molecola nel cane e nell'uomo (Gauguère et al., 2004; Navarro et al., 2016).

## 5.2 TACROLIMUS

Il tacrolimus è un macrolide inibitore della calcineurina, ad attività immunosoppressiva, di recente acquisizione in medicina umana per la gestione dei casi di dermatite atopica da moderata a grave, utilizzato per la riduzione del prurito e dei segni clinici della malattia.

Come visto per la ciclosporina, il suo meccanismo d'azione si basa sul legame con la ciclofillina, formando un complesso finalizzato ad inibire l'enzima calcineurina (Figura 36).

In medicina umana il prodotto esiste per il bambino nella formulazione in unguento allo 0,03% e per l'adulto allo 0,1%: grazie alla sua efficacia e all'assenza di effetti collaterali nel breve periodo è uno dei prodotti più utilizzati per le manifestazioni localizzate della dermatite atopica.

Una sua applicazione, anche per tempi prolungati, non si è vista indurre atrofia cutanea – a differenza dei corticosteroidi - nè l'insorgenza di infezioni secondarie né l'alterazione dei parametri ematobiochimici (Bensignor et Olivry, 2005).

L'uso di farmaci immuno-soppressori è sempre da considerare con prudenza, dal momento che è teoricamente plausibile che possa aumentare il rischio di insorgenza di forme tumorali, sebbene ancora non vi sia alcuna evidenza scientifica a riguardo.

Molto spesso in medicina umana la necessità di trattare forme, anche gravi, di dermatite atopica spinge ad associare alle classiche terapie sintomatiche (i.e. corticosteroidi) anche altre proposte terapeutiche: non si può affermare con certezza che l'utilizzo degli inibitori della calcineurina comporti il successivo sviluppo di linfomi, tuttavia, data l'evidenza di casi nei quali questo si è rivelato, bisogna sempre considerare la necessità di utilizzare questi farmaci con cautela ed è auspicabile vengano condotti ulteriori studi a riguardo per confermare o meno l'ipotesi (Ormerod, 2005).

Piuttosto l'applicazione di tacrolimus può scatenare un fastidio legato al prurito e al bruciore indotto dal prodotto, risolvibile nell'arco di un paio di giorni.

Il suo utilizzo terapeutico risulta utile nel caso di una gestione intermittente a lungo termine, nel momento in cui il paziente non risulti responsivo alle terapie convenzionali.

L'infiammazione nel sito di applicazione del prodotto evidenziata in medicina umana non è stata valutata negli studi condotti in medicina veterinaria (Marsella et al., 2002; Marsella et al., 2004), sebbene nel 25% dei pazienti si sia evidenziata irritazione cutanea (Bensignor et Olivry, 2005).

Pochi sono gli studi condotti in medicina veterinaria sull'efficacia del principio attivo (Figura 38).

È un prodotto ben tollerato e assorbito in minima parte. Lo studio eseguito da Marsella e colleghi nel 2002 non aveva ottenuto risultati troppo incoraggianti se confrontati con quelli ottenuti poi nel 2004: nel primo studio si era utilizzato il tacrolimus allo 0,3%, mentre nel secondo allo 0,1%. La discordanza di risultati ottenuti la si può spiegare con le variabilità evidenziate nei due studi; la considerazione più importante riguarda le condizioni cliniche dei soggetti: in uno stato di patologia generalizzata l'efficacia del principio risulta minore, sebbene comunque presente (Marsella et al., 2002; Marsella et al., 2004).

Un'applicazione giornaliera del farmaco allo 0,1% per 6 settimane si è rivelata efficace nel trattamento della dermatite atopica localizzata nel cane, con un successo del 75% dei soggetti trattati, risultato che evidenzia un parallelismo con quelli ottenuti in medicina umana (Bensignor et Olivry, 2005; Hanifin et al., 2001).

Quindi, grazie all'assenza di evidenze di sintomi sistemici e di alterazioni ematobiochimiche significative, il tacrolimus potrebbe essere considerato un farmaco adeguato nella gestione a lungo termine del paziente atopico, sebbene manchino studi che ne confermino la sua reale sicurezza.

Un dato sicuramente confortante riguardo questo prodotto è la sua presunta incapacità di indurre infezioni secondarie: essendo un farmaco immunomodulatore è un risultato inaspettato, tuttavia si è ipotizzato che le sue proprietà anti-infiammatorie migliorino la barriera cutanea e il prodotto con cui viene veicolato svolga anche un effetto emolliente quando applicato.

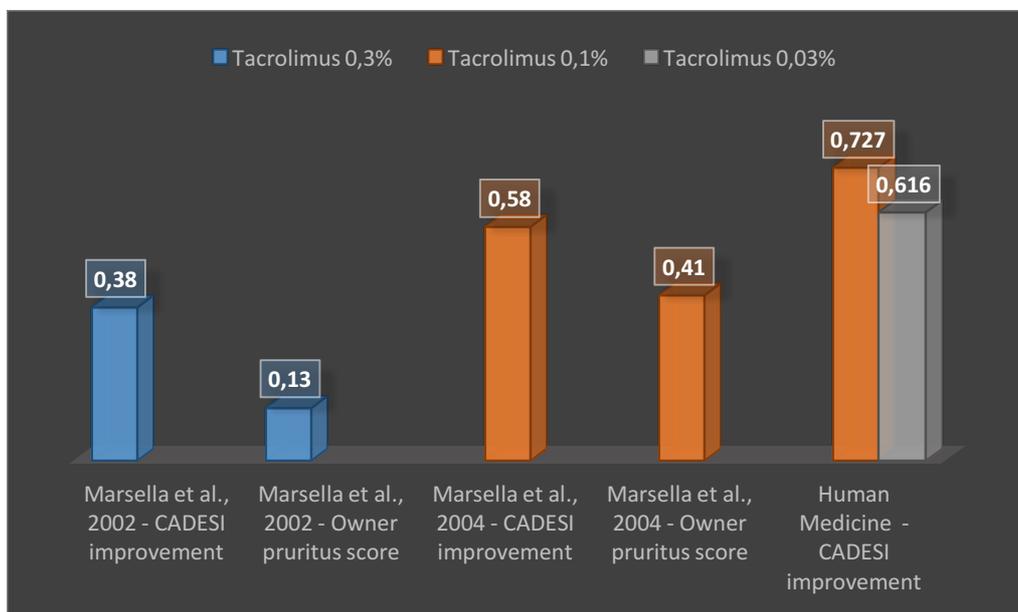
Inoltre, va ad inibire le cellule epidermiche dendritiche infiammatorie presenti nei siti delle lesioni, senza tuttavia coinvolgere le cellule del Langherans, responsabili dell'immunità locale, aspetto che lo differenzia dalla ciclosporina che invece inibisce anche quest'ultime.

Sicuramente tra gli svantaggi del tacrolimus va menzionato il costo, sebbene sia più contenuto se confrontato con quello richiesto per il trattamento quotidiano con la ciclosporina.

Tuttavia, data la sua relativa velocità d'azione, l'efficacia e il margine di sicurezza evidenziati, il tacrolimus potrebbe considerarsi un'ottima alternativa nel caso di dermatite atopica localizzata, anche vantaggiosa - economicamente parlando - se confrontata con trattamenti prolungati nel tempo con la ciclosporina o i corticosteroidi.

L'attività di queste molecole inibitori della calcineurina è diventata di enorme interesse visti i risultati incoraggianti ottenuti dal loro utilizzo; soprattutto in medicina umana si stanno testando altri prodotti potenzialmente efficaci: la rapamicina o il pimecrolimus. Sono molecole che stanno dando risultati ma che in medicina veterinaria non sono ancora state prese in considerazione,

sebbene potrebbero essere la base per condurre ulteriori studi finalizzati a sostituire le terapie convenzionali (Monti et al., 2003; Nghiem et al., 2002).



**Figura 38. Efficacia del Tacrolimus** (Hanifin et al., 2001; Marsella et al., 2002; Marsella et al., 2004).

### 5.3 OCLACITINIB

L'Oclacitinib è un nuovo prodotto inibitore delle Janus Chinasi di recente approvazione in Europa e negli Stati Uniti, per il controllo o il trattamento del prurito associato alle condizioni di dermatite allergica o di dermatite atopica canina in soggetti di almeno 12 mesi d'età.

Ha un'azione di inibizione selettiva nei confronti di molecole coinvolte nelle reazioni pruriginose e infiammatorie presenti nelle condizioni allergiche.

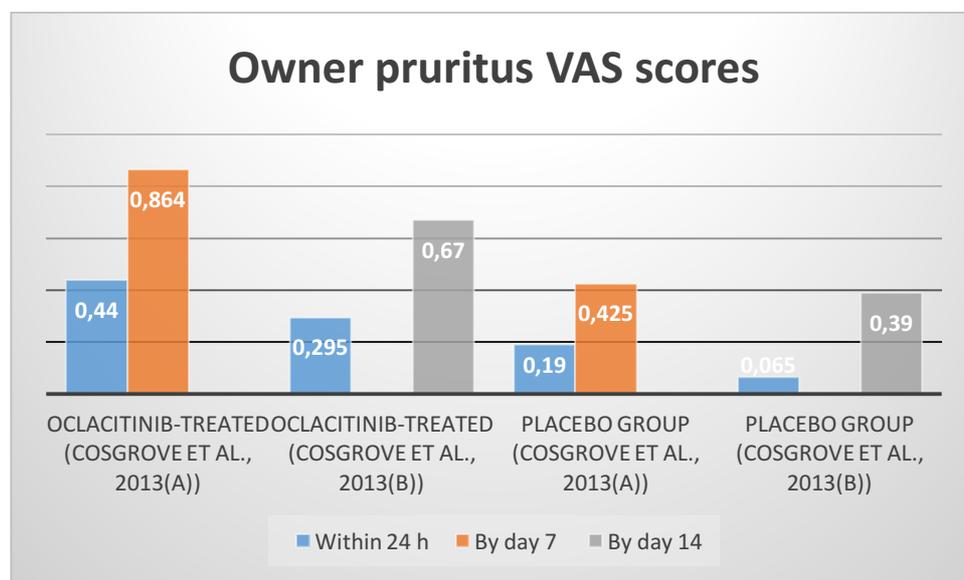
È un inibitore delle Janus chinasi di tipo 1, enzima citoplasmatico coinvolto nelle operazioni di trasduzione del segnale di citochine pro-infiammatorie, allergiche e pruriginose implicate nella dermatite atopica: IL-2, IL-4, IL-6, IL-13 e IL-31. Quest'ultima in particolare è stata di recente identificata come responsabile della sensazione di prurito nei pazienti atopici; da qui, l'efficacia di questo principio attivo nel ridurre il sintomo prurito: infatti, grazie alla dose di attacco si riesce sin da subito a diminuire di molto la sensazione pruriginosa percepita dal paziente (Gonzales et al., 2014).

L'Oclacitinib viene prescritto al dosaggio di 0,4-0,6 mg/kg da somministrare per via orale due volte al giorno per 14 giorni.

È stato dimostrato che permette di ottenere un controllo rapido (già entro le prime 24 ore dalla prima somministrazione), sicuro ed efficace del prurito con un miglioramento sostanziale anche delle manifestazioni cliniche.

Inoltre, c'è la possibilità di utilizzare il farmaco in una gestione a lungo termine della patologia, somministrandolo una volta al giorno, una volta conclusa la fase di induzione.

La sua azione anti-pruriginosa si dimostra di gran lunga efficace, favorendo una riduzione del discomfort del paziente migliorandone la qualità di vita e riducendo i continui auto-traumatismi indotti dal prurito (Figura 39) (Cosgrove et al., 2013(a); Cosgrove et al., 2013(b)).



**Figura 39. Owner pruritus VAS score** (Cosgrove et al., 2013(a); Cosgrove et al., 2013(b)).

Non sono stati condotti molti studi di comparazione con altre molecole terapeutiche, ma dal punto di vista dell'efficacia sembra essere paragonabile a quella della ciclosporina e dei corticosteroidi sistemici.

Paragonandolo al prednisolone, risulta avere la stessa efficacia nel ridurre il prurito e i segni clinici associati ad una dermatite allergica (Gadeyne et al., 2014)

Nei trattamenti a breve termine il farmaco appare sicuro: per le sue proprietà potenzialmente immunosoppressive è consigliabile non affiancarlo ad una terapia con corticosteroidi, soprattutto in caso di infezioni, sebbene non esistano evidenze scientifiche a riguardo.

Come durante qualsiasi altro trattamento immunomodulatore è necessario monitorare con attenzione l'eventuale insorgere di infezioni batteriche, fungine o parassitarie (Cosgrove et al., 2013; Olivry et al., 2015).

Tra gli effetti collaterali più frequenti ci sono quelli che colpiscono l'apparato gastroenterico (vomito e diarrea), solitamente blandi e facilmente risolvibili con una sospensione del farmaco. I casi di anoressia che si sono identificati sono stati transitori e si sono risolti senza ulteriori trattamenti. Pochi i pazienti che hanno sviluppato polidipsia.

Anche per l'oclocitinib come per la ciclosporina si è evidenziato nei pazienti in trattamento lo sviluppo di noduli dermici, potenzialmente benigni, solo due dei quali mastocitomi. Non c'è una diretta e sicura correlazione con il farmaco, tuttavia i farmaci che agiscono sul sistema immunitario possono esacerbare le condizioni neoplastiche, necessitando quindi di monitoraggi continui (Cosgrove et al., 2013).

## 5.4 INTERFERONI

Gli interferoni (IFNs) sono delle molecole implicate nei meccanismi di immunità innata ed adattativa. Possono venir indotti da virus e batteri: la loro funzione infatti riveste il ruolo di antivirale, antiproliferativo e immunomodulatore.

Come già spiegato nel capitolo relativo all'eziopatogenesi, la dermatite atopica è caratterizzata da uno *switch* in cui la risposta immunitaria è mediata principalmente dai linfociti T helper di tipo 2, con un'espressione relativamente alta dell'IL-4, citochina prodotta da queste cellule, nei siti delle lesioni e una bassa concentrazione di IFN- $\gamma$ , un INF di tipo 2 prodotto invece dai linfociti di tipo 1, sia nelle cellule ematiche periferiche sia nelle siti delle lesioni (Olivry et al. 1999; Hayashiya et al., 2002; Nuttall et al., 2002; Schroder et al., 2004).

L'elevato rapporto IL-4/INF- $\gamma$  comporta un'aumentata produzione di IgE allergene-specifiche nei pazienti atopici.

Questo è stato riscontrato sia in medicina umana sia in medicina veterinaria.

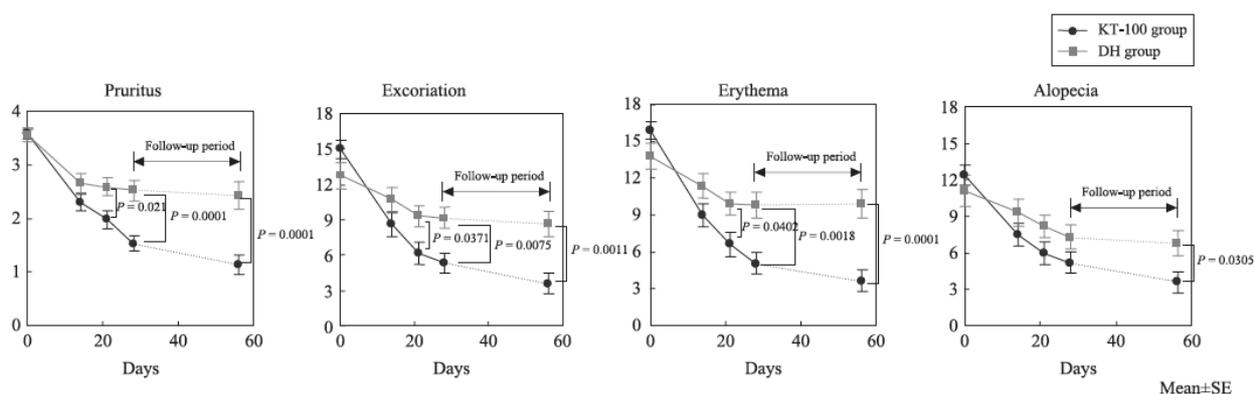
L'interferone- $\gamma$  ricombinante canino (rCalFN- $\gamma$ ) è un principio attivo estratto dal baco da seta attraverso un baculovirus ricombinante. È risultato efficace nella terapia della dermatite atopica canina e il suo utilizzo risale al dicembre 2005 dove per la prima volta è stato distribuito in Giappone. Questo farmaco non è attualmente disponibile in Europa.

L'interferone- $\gamma$  è una molecola utilizzata per i suoi effetti immuno-modulatori sul sistema immunitario.

Era già stata dimostrata l'efficacia di questa molecola con dei risultati positivi dopo la sua somministrazione: una riduzione del rapporto IL-4/ INF- $\gamma$ , una notevole riduzione del livello di IgE e una diminuzione del numero di mastociti nello strato dermico più superficiale (Iwasaki et al., 2005).

L'efficacia dell'interferone- $\gamma$  ricombinante canino (KT-100) viene dimostrato in uno studio del 2006 in cui si mettono a confronto con questa molecola le applicazioni di un antistaminico topico (difenidramina) e si utilizzano come criteri di valutazione la presenza di segni clinici come prurito, escoriazioni, eritema ed alopecia.

Rispetto al gruppo di controllo per tutte queste manifestazioni c'è stato un miglioramento a seguito della somministrazione dell'INF- $\gamma$  (Figura 40) (Iwasaki et Hasegawa, 2006).



**Figura 40. Evoluzione delle lesioni nel corso del tempo** (Iwasaki et Hasegawa, 2006).

Dei risultati si sono ottenuti somministrando il farmaco per 4 settimane una volta al giorno tre volte alla settimana. Gli effetti si sono protratti anche dopo il periodo di somministrazione.

La posologia ideale alla quale somministrare la molecola è stata indagata in un recente studio condotto da Yasukawa et al. . In Giappone il dosaggio approvato è di 10.000 unità/kg somministrato per via sottocutanea tre volte alla settimana per 4 settimane. Rimane ancora un dato sconosciuto quello relativo alla dose minima efficace.

In questo studio del 2010, vengono paragonati gli effetti di un dosaggio di 2000 unità/kg e di 5000 unità/kg somministrati 3 volte alla settimana per 4 settimane, poi una volta la settimana per le 4

settimane successive. L'efficacia maggiore si è dimostrata nel secondo caso con un miglioramento netto degli indici delle lesioni e un tasso di miglioramento mantenuto anche nelle 4 settimane successive alla sospensione del trattamento.

Evidentemente, il dosaggio di 2000 unità/kg non è sufficiente a garantire i risultati desiderati sebbene in alcuni dei soggetti testati vi sia stata una riduzione del 50% delle lesioni un mese dopo la sospensione della terapia.

Confrontandolo al precedente studio di Iwasaki et al. del 2006, si può affermare che la risposta clinica alla somministrazione di questo farmaco sia dose dipendente: il tasso di miglioramento è più correlato con la somministrazione delle dosi di 10.000 unità/kg e di 5000 unità/kg rispetto a quella di 2000 unità/kg (Tabella 16) (Yasukawa et al., 2010).

Questo è un principio che può potenzialmente considerarsi efficace nella gestione a lungo termine del paziente atopico: nel 66.7% dei casi i pazienti non hanno dimostrato delle recidive della patologia e non è stato necessario somministrare ulteriori trattamenti medici per il controllo delle lesioni secondarie.

| Symptom     | This study    |               | Iwasaki <i>et al.</i> |
|-------------|---------------|---------------|-----------------------|
|             | 2000 units/kg | 5000 units/kg | 10 000 units/kg       |
| Pruritus    | 36.40%        | 64.30%        | 79.20%                |
| Excoriation | 36.40%        | 57.10%        | 79.20%                |
| Erythema    | 45.50%        | 78.60%        | 81.10%                |
| Alopecia    | 36.40%        | 78.60%        | 73.60%                |
| Mean        | 38.70%        | 69.70%        | 78.30%                |

**Tabella 16. Tasso di miglioramento delle lesioni a seguito di 8 settimane di trattamento** (Yasukawa et al., 2010).

La sua somministrazione protratta per un periodo di due mesi non ha portato ad evidenziare effetti collaterali. In un range variabile tra lo 0.1 e il 5% si sono osservati vomito, feci non formate, riduzione dell'appetito e minor attività fisica (Iwasaki et al., 2006). Un solo soggetto ha sviluppato edema facciale, che può sottendere una reazione allergica che potrebbe mettere in allarme come grave effetto collaterale da controllare in caso di somministrazione (Yasukawa et al., 2010).

Dal momento che non è un farmaco utilizzabile in Europa, altri studi sono stati condotti utilizzando l'interferone- $\omega$  ricombinante felino (rfeIFN- $\omega$ ) il cui utilizzo è stato autorizzato nel cane per le infezioni da parvovirus.

La problematica maggiore nella sua somministrazione è il possibile sviluppo di anticorpi neutralizzanti, che si sono evidenziati in uno studio condotto sui gatti utilizzando l'IFN umano somministrato per via sottocutanea.

Lo studio condotto da Litzlbauer et al. nel 2014 non ha portato all'evidenza di formazione di questi anticorpi nel cane, con nessuna delle due vie di somministrazione utilizzate (orale e sottocutanea). Dal punto di vista dell'efficacia sembra raggiungere dei risultati migliori la via di somministrazione orale, rispetto alla sottocutanea: è carente la letteratura a riguardo, quindi ulteriori studi andrebbero condotti per confermare questa ipotesi (Litzlbauer et al., 2014).

Interessante il paragone della molecola in rapporto alla ciclosporina in previsione di una gestione della fase cronica della patologia: ambedue i principi si sono dimostrati efficaci nell'assicurare un miglioramento delle manifestazioni cliniche del soggetto in un tempo variabile tra il mese ed i tre mesi.

Tuttavia, l'azione dell'INF- $\omega$  può essere meglio paragonata agli effetti indotti dall'immuno-terapia allergene-specifica dal punto di vista delle tempistiche: i risultati clinici si rendono evidenti dopo un periodo variabile dai tre ai dodici mesi.

Considerata anche la potenziale assenza di effetti collaterali indotti da un utilizzo prolungato del farmaco è lecito ritenerlo idoneo come principio per una gestione a lungo termine della patologia (Carlotti et al., 2009).

## **5.5 ANTICORPI MONOCLONALI**

Nella patogenesi della dermatite atopica sono ben conosciute le citochine responsabili del prurito e dell'infiammazione tipiche della malattia.

L'azione mirata di un principio attivo può essere, quindi, quella di inibire l'attività svolta da queste molecole per alleviare di conseguenza le manifestazioni cliniche che queste comportano.

Il meccanismo alla base di una terapia basata sugli anticorpi monoclonali sta nella loro capacità di legarsi ad un antigene specifico per distruggerlo, tramite l'attivazione del sistema immunitario.

Il prurito è uno dei sintomi cardine che si sviluppano nel paziente atopico e coinvolta nella sua insorgenza si riscontra l'IL-31, citochina ritenuta responsabile del sintomo anche nella dermatite atopica dell'uomo.

Quindi la neutralizzazione di questa molecola da parte di anticorpi monoclonali potrebbe essere una nuova via terapeutica di risoluzione del problema, associata al vantaggio di un minor utilizzo di altri farmaci.

La molecola che è stata messa a punto è il Lokivetmab (ZTS-00103189), un anticorpo monoclonale che si lega nello specifico all'IL-31 inibendone il legame al suo recettore.

Viene somministrato per via sottocutanea e si è rilevato efficace dopo una singola somministrazione per 8 settimane (Walters et al., 2015).

Uno studio successivo ha poi evidenziato come due somministrazioni sottocutanee di 2.0 mg/kg a distanza di 14 giorni l'una dall'altra ugualmente riducessero il prurito e le lesioni cutanee (Michels et al., 2016).

Recente lo studio che ne dimostra l'efficacia e la sicurezza: l'efficacia si è vista essere tale con dosaggi dallo 0.5 mg/kg ai 2 mg/kg con una diminuzione del prurito e delle manifestazioni cliniche dei soggetti. Le manifestazioni cliniche sono scomparse per tutto il mese successivo alla somministrazione della dose e in tempi brevissimi: entro un giorno il prurito, entro 7 le manifestazioni secondarie (Figura 41; Figura 42).

Nonostante la valutazione sia stata fatta basandosi su una singola somministrazione, non sono stati rilevati effetti collaterali (Michels et al., 2016).

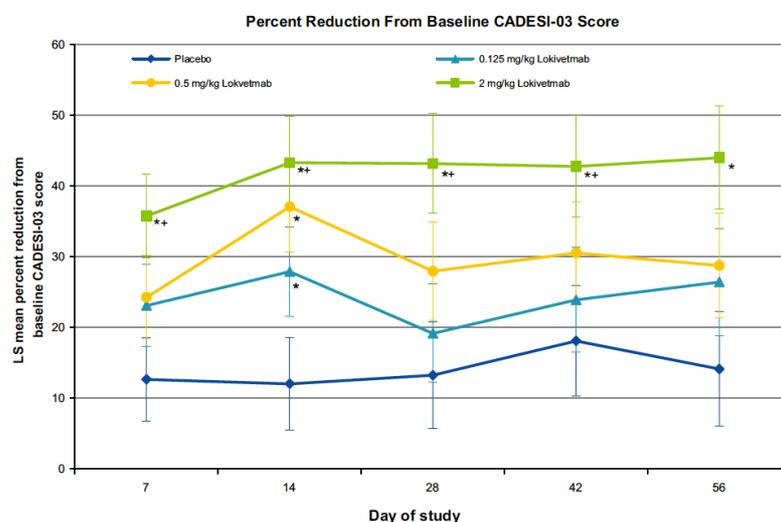


Figura 41. Miglioramenti clinici basati sulla CADESI-03 (Michels et al., 2016).

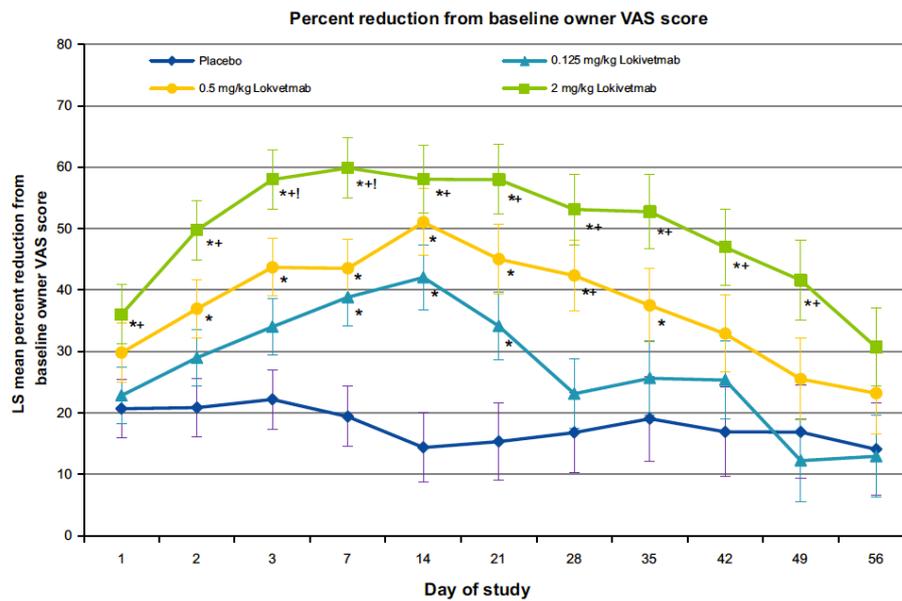


Figura 42. Miglioramenti del prurito basati sulla VAS (Michels et al., 2016).

A sostegno di questo approccio terapeutico un ulteriore studio condotto sui ratti utilizzando un'applicazione topica di Fab (frammento legato all'antigene) di IgG1 allergene-specifiche sulla cute ha evidenziato una riduzione sia del numero che della gravità delle lesioni cutanee simili a quelle indotte dalla dermatite atopica, una riduzione dell'iperplasia epidermica e dell'infiltrazione di cellule infiammatorie come mastociti e neutrofili.

L'efficacia terapeutica di questa molecola è stata paragonata a quella del desametasone rilevando che è molto superiore, perché in grado di inibire la sintesi dell'IL-17A, coinvolta nello sviluppo delle lesioni.

L'iperplasia epidermica nel caso di lesioni croniche viene ridotta dall'utilizzo combinato del prodotto con i corticosteroidi, associata ad una diminuita produzione dell'IL-13 (Sae-Wong et al., 2015).

Questi studi gettano delle basi promettenti per approfondire i vari aspetti relativi alle implicazioni terapeutiche di questi farmaci nei confronti della dermatite atopica canina, soprattutto delle molecole di più recente acquisizione: il fine è agire con terapie mirate e selettive, efficaci e sicure in una gestione a lungo termine della patologia.

Potrebbero venire considerate una valida alternativa a delle terapie non specifiche, sebbene efficaci in tempi brevi, come ad esempio la gestione tramite l'uso dei corticosteroidi.

La possibilità di arrivare a delineare una terapia specifica che agisce sull'effettiva causa del problema è di auspicio anche nel diminuire il rischio di recidive, che obbligano ad impostare continui cicli terapeutici, alle volte anche controproducenti per la salute stessa del paziente.

## **5.6 IMMUNOTERAPIA ALLERGENE – SPECIFICA**

Secondo la definizione data dalla World Health Organization (WHO), l'immunoterapia allergene-specifica (ASIT) è la pratica con la quale vengono somministrate delle concentrazioni di volta in volta maggiori di allergene ad un soggetto che ne risulta sensibile, per migliorare la sintomatologia conseguente all'esposizione all'agente scatenante (Bosquet et al., 1998).

In medicina veterinaria è stata utilizzata con successo la prima volta in un caso di febbre da fieno (Wittich, 1941) e ad oggi si rivela di largo utilizzo nel controllo della dermatite atopica canina, mentre in medicina umana è stata utilizzata inizialmente nelle forme di rinite ed asma allergica oppure nelle reazioni di ipersensibilità al morso degli insetti (Noon, 1911; Freeman, 1911).

L'ASIT si può considerare l'unico trattamento eziologico della dermatite atopica canina: non è un sistema terapeutico palliativo ed ha una durata superiore rispetto ad un trattamento sintomatico.

Lo scopo è quello di prevenire l'inizio di nuove sensibilizzazioni ad allergeni differenti, aspetto di cui non si è ancora trovato riscontro in medicina veterinaria, e ridurre i sintomi derivanti da una previa sensibilizzazione, migliorando così la qualità di vita del paziente (Larchè et al., 2006).

### **5.6.1 MECCANISMO D'AZIONE**

In medicina umana, alla base del meccanismo di funzionamento dell'immunoterapia ci sono ipotesi diverse:

- 1) Desensibilizzazione umorale;
- 2) desensibilizzazione cellulare;
- 3) immunizzazione;
- 4) tolleranza;
- 5) mix dei precedenti (Keppel et al., 2008).

Tra le cellule che rivestono un ruolo fondamentale si annoverano le cellule presentanti l'antigene, in particolare le cellule dendritiche.

La presentazione dell'antigene da parte di cellule dendritiche non completamente mature induce la formazione di linfociti T regolatori i quali producono poi citochine, come l'IL-10, a loro volta responsabili della stimolazione di una risposta immunitaria a favore dei linfociti Th1, che inibisce la conseguente reazione infiammatoria.

Gli effetti dell'immunoterapia allergene specifica possono venir riassunti come segue:

1. Aumenta la risposta immunitaria mediata dai linfociti Th1;
2. favorisce lo sviluppo di linfociti T regolatori mirati a diminuire la risposta dei linfociti T effettori;
3. aumenta la produzione di citochine regolatorie quali l'IL-10 e il TGF- $\beta$ .

Dal punto di vista anticorpale l'ASIT determina un'aumentata produzione di IgG, definiti come "anticorpi bloccanti", poiché vanno ad agire legandosi agli allergeni competendo con le IgE: ciò indurrebbe una minore risposta infiammatoria dovuta ad una minor degranolazione di mastociti e basofili, nella fase precoce dell'infiammazione.

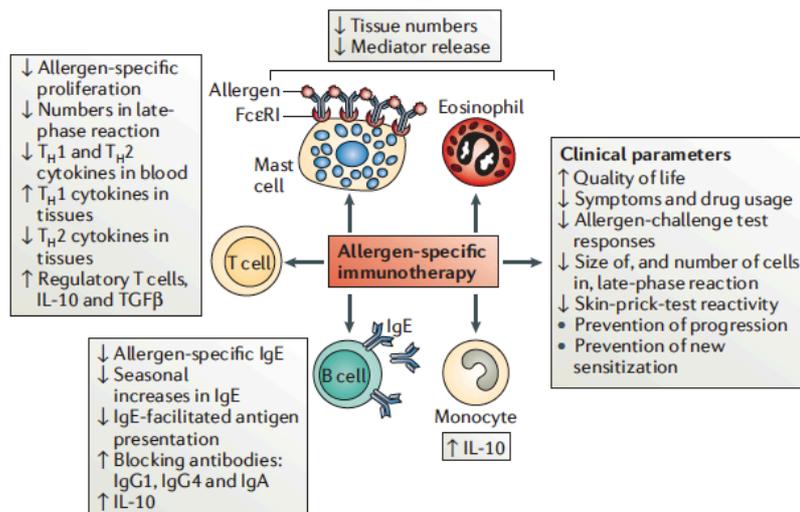
L'aumento delle IgG è strettamente correlato alla quantità di allergene con cui il soggetto entra in contatto piuttosto che con i livelli di protezione raggiunti dall'organismo: è meno plausibile l'ipotesi secondo cui le IgG blocchino gli allergeni a livello della superficie mucosale dato che, in primis, i loro livelli sembrano aumentare dopo l'insorgenza dei segni clinici, e in secondo luogo, molti mastociti a questo livello incontrano l'allergene ben prima che un anticorpo si interponga tra di essi (Frew, 2010).

La presenza di IgG allergene specifiche, inoltre, riduce l'aumento sierico di IgE diminuendo di fatto la produzione di linfociti B che poi si convertono in anticorpi specifici.

Infine, le IgG potrebbero agire rendendo meno facile l'interazione tra le IgE allergene-specifiche con i linfociti T, diminuendo così la fase tardiva dell'infiammazione (Larchè et al., 2006).

Sono state poi valutate le due principali sottopopolazioni di IgG: risultano aumentate in particolare le IgG1 e le IgG4, fondamentali molecole anti-infiammatorie che vanno a legarsi con le IgE allergene-specifiche.

In ultima istanza, si è evidenziato anche il coinvolgimento delle IgA, presumibilmente sintetizzate a seguito di un aumento dei livelli di TGF- $\beta$ , suggerendo un loro ruolo nel meccanismo di funzionamento dell'ASIT (Frew, 2010).



**Figura 43. Ruolo di cellule T regolatorie e citochine nell'immuno-terapia** (Larchè et al., 2006).

In medicina veterinaria, sebbene non sia ancora stato delineato un quadro preciso alla base del funzionamento dell'immuno-terapia, molti sono gli aspetti in comune con la medicina umana.

Un soggetto affetto da dermatite atopica generalmente presenta dei livelli di  $\text{INF-}\gamma$  e  $\text{IL-4}$  bassi rispetto a soggetti normali.

La spiegazione di questo fenomeno si basa sull'anergia sviluppata dai linfociti T e la loro diminuita capacità di differenziazione e di produzione di citochine, qualora stimolati con dosi eccessivamente alte di antigene (Schwartz, 1996).

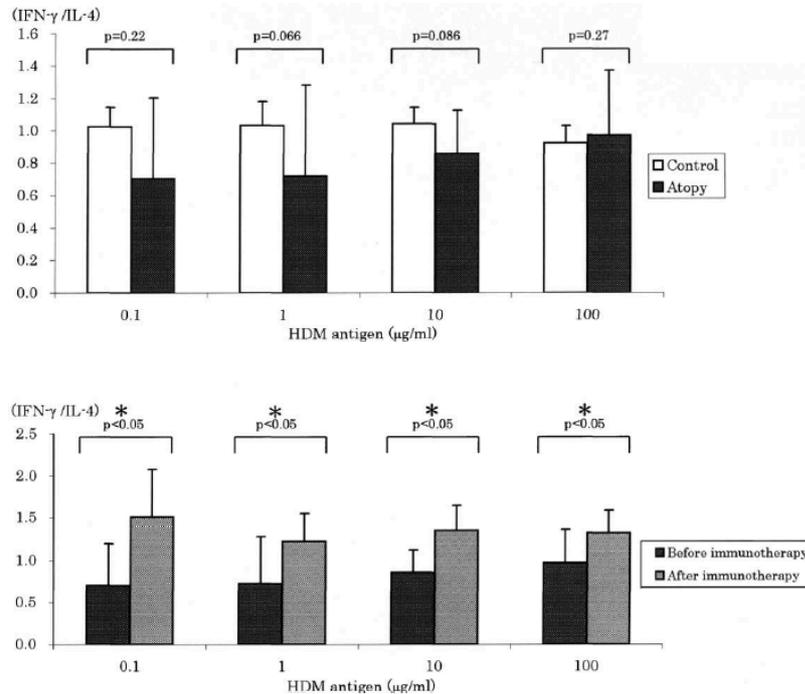
Il primo studio condotto sui meccanismi alla base dell'immuno-terapia basata sugli allergeni degli acari della polvere, ha messo in luce che i pazienti atopici, a livello delle cellule mononucleate del sangue periferico, a seguito di trattamento con l'ASIT evidenziano un'aumentata espressione di  $\text{INF-}\gamma$ , senza invece alcun cambiamento nell'espressione di  $\text{IL-4}$ ; quest'ultimo dato è in contrasto con quanto riportato dalla letteratura umana (Secrist et al., 1993)

In uno studio condotto nel 2004, le concentrazioni di  $\text{IL-4}$  ed  $\text{INF-}\gamma$  tendono ad aumentare all'aumento della concentrazione dell'antigene sia in soggetti atopici che nei soggetti di controllo.

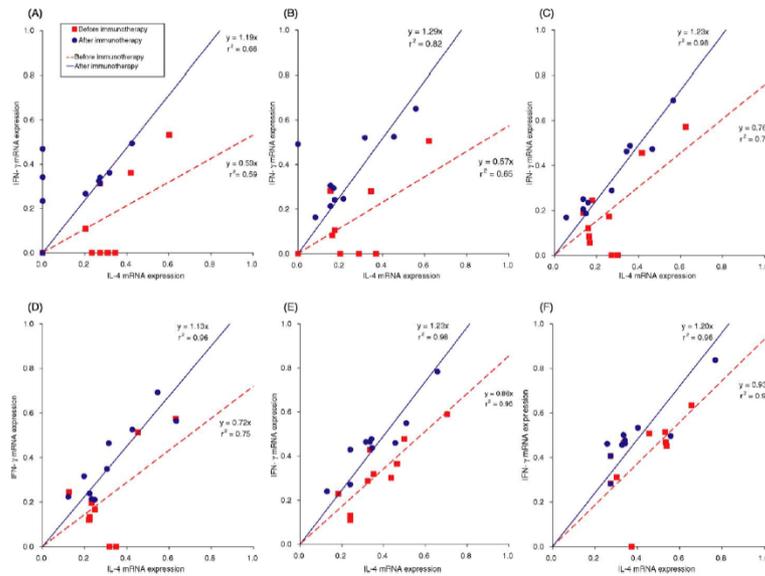
Si evidenzia inoltre un aumentato rapporto  $\text{INF-}\gamma/\text{IL-4}$  che suggerisce uno spostamento della risposta immunitaria a favore dei linfociti T helper di tipo 1 a seguito di trattamento con immuno-terapia (Figura 44).

Lo spostamento verso una risposta mediata dai linfociti Th1 a seguito di immuno-terapia è dose dipendente (Figura 45): nei soggetti che manifestano una reazione mediata dai linfociti di tipo Th2,

quando esposti a basse dosi di allergene solitamente di tipo ambientale, una conseguente immuno – terapia potrebbe essere alterata nella sua efficacia (Shida et al., 2004).



**Figura 44. Rapporto IFN- $\gamma$  e IL-4.** L'mRNA viene estratto da cellule mononucleari del sangue periferico e l'espressione di IFN- $\gamma$  ed IL-4 si stimola con concentrazioni diluite di allergene degli acari della polvere. Il livello di queste due citochine viene valutato prima in soggetti atopici confrontati con il campione di controllo, poi in soggetti prima di essere sottoposti ad immuno-terapia e dopo il trattamento (Shida et al., 2004).

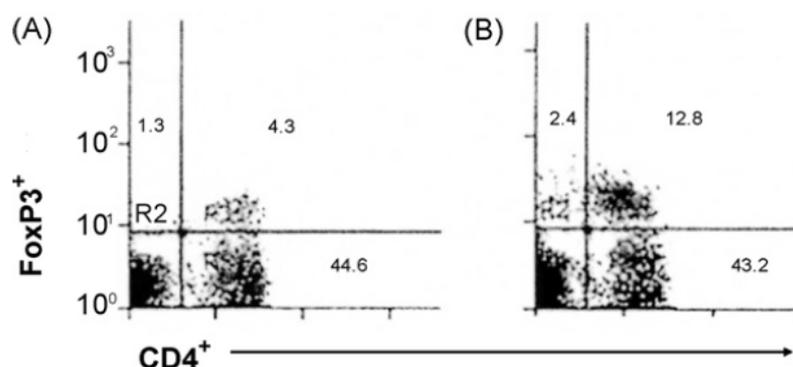


**Figura 45. Curve di regressione dei livelli di espressione di IFN- $\gamma$  ed IL-4.** Citochine espresse in cellule ematiche periferiche in soggetti atopici prima e dopo immunoterapia a dosi scalari di allergene (Shida et al., 2004).

Inoltre un altro aspetto rilevato nei pazienti nei quali il prurito è sensibilmente diminuito durante il trattamento è un aumento significativo della concentrazione dei linfociti T reg periferici concomitantemente ad un aumento della concentrazione dell'IL-10, aspetti che potrebbero spiegare il successo di questo protocollo terapeutico (Tabella 17). Questi livelli si sono dimostrati più elevati sia nel sangue che nei tessuti.

L'indagine è stata condotta valutando l'espressione di FoxP3 che nel cane è lecito supporre sia fortemente correlato all'aumentata sintesi dei linfociti T reg (Figura 46).

L'IL-10 sembra anche regolare la sintesi di specifiche IgE ed IgG4, inibendo le prime e aumentando sensibilmente le seconde, modulando quindi la produzione anticorpale (Keppel et al., 2008).



**Figura 46. Identificazione dei Treg tramite l'anticorpo Foxp3.** Utilizzando la tecnica della citofluorimetria si è evidenziata l'espressione di FoxP3 da parte dei linfociti CD4<sup>+</sup> in soggetti atopici prima dell'ASIT (A) e dopo 1 anno di trattamento (B) (Keppel et al., 2008).

| Patient population | Number of dogs | 0 months <sup>a</sup> | 3 months <sup>a</sup> | 6 months <sup>a</sup> | 9 months <sup>a</sup> | 12 months <sup>a</sup> |
|--------------------|----------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| Healthy dogs       | 25             | 19.06 ± 3.44          | 18.07 ± 3.25          | 17.90 ± 3.25          | 18.94 ± 2.85          | 19.03 ± 3.27           |
| Immunotherapy      | 53             | 20.40 ± 3.52          | 20.85 ± 3.80          | 24.82 ± 5.97          | 29.39 ± 9.13          | 37.26 ± 15.26          |

**Tabella 17. Concentrazione dell'IL-10 in soggetti di controllo e soggetti sottoposti a trattamento con l'ASIT** (Keppel et al., 2008).

Infine, per quanto riguarda l'immunità innata, si è osservato un aumento delle IgG a seguito di sei mesi di immunoterapia. Coerentemente con quanto rilevato nell'uomo, non si riscontra una correlazione significativa tra l'aumento delle IgG1 sieriche e il miglioramento clinico del paziente. È un po' controversa la questione relativa a questo concetto. Sembra che il successo del protocollo terapeutico non sia necessariamente vincolato alla produzione di anticorpi bloccanti: sebbene alcuni studi dimostrino vi sia un sostanziale aumento sia delle IgG che delle IgE nei soggetti che rispondono in modo positivo al trattamento, in altri studi questo aumento non viene rilevato come statisticamente significativo (Foster et al., 2003; Hou et al., 2004).

## 5.6.2 VIE DI SOMMINISTRAZIONE

Sia in medicina umana che in medicina veterinaria, l'immuno-terapia prevede numerose somministrazioni sottocutanee di un allergene sensibilizzante che induce la produzione di un'immunità attiva nei suoi confronti.

In medicina umana si sono rivelate sicure ed efficaci anche altre modalità di somministrazione: la via intranasale e intrabronchiale, nei casi di rinite allergica ed asma, hanno dimostrato una riduzione dei segni clinici attraverso l'induzione di una risposta immunitaria locale.

Esiste inoltre la possibilità di somministrare l'immuno – terapia per via orale, la cosiddetta immuno –terapia sublinguale (SLIT). Quest'ultima si utilizza molto nell'uomo, grazie anche alle formulazioni esistenti registrate appositamente per quest'utilizzo.

In Europa questo protocollo viene applicato su larga scala in pazienti affetti da forme allergiche respiratorie come asma o rinocongiuntivite allergica, mentre negli Stati Uniti si è anche rivelata efficace nel trattamento della dermatite atopica. La SLIT ha da poco trovato riscontro anche in medicina veterinaria (DeBoer et al., 2016; Fujimura et Ishimaru, 2016).

Infine, recentemente divenuta oggetto di studio sia in medicina umana che in medicina veterinaria, è la via di somministrazione intralinfatica (ILIT), che consiste nella desensibilizzazione con allergeni specifici iniettati nei linfonodi poplitei (Fischer et al., 2016).

|                     | MEDICINA UMANA | MEDICINA VETERINARIA |
|---------------------|----------------|----------------------|
| VIA SOTTOCUTANEA    | ✓              | ✓                    |
| VIA ORALE           | ✓              | ✓                    |
| VIA INTRANASALE     | ✓              |                      |
| VIA INTRABRONCHIALE | ✓              |                      |
| VIA INTRALINFATICA  | ✓              | ✓                    |

**Tabella 18.** Vie di somministrazione dell'immuno-terapia allergene- specifica (Griffin et Hillier, 2001; Fischer et al., 2016).

### 5.6.3 QUANDO ESEGUIRLA E PERCHE'?

L'ASIT è un protocollo terapeutico indicato in qualsiasi soggetto al quale sia stata fatta diagnosi di dermatite atopica e che:

1. sia sensibile ad allergeni specifici, rilevati attraverso l'esecuzione di test intradermici o test sierologici;
2. non riesce ad evitare il contatto con gli allergeni scatenanti la reazione di ipersensibilità;
3. presenta segni clinici che sembrano persistere per più di 4-6 mesi l'anno;
4. non si dimostra responsivo alla terapia sintomatica anti-pruriginosa o sviluppa eccessivi effetti collaterali.

| VANTAGGI  | SVANTAGGI  |
|---|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Trattamenti meno frequenti rispetto ad una terapia sintomatica;</li> <li>➤ minor impegno e tempo richiesto;</li> <li>➤ nessun rischio di effetti collaterali a lungo termine;</li> <li>➤ rischio ridotto di effetti collaterali a breve termine;</li> <li>➤ alcuni pazienti tollerano meglio un'iniezione rispetto ad un trattamento per via orale;</li> <li>➤ potrebbe alterare permanentemente il decorso della patologia;</li> <li>➤ soprattutto nei cani di taglia grande permette di avere un vantaggio economico;</li> <li>➤ nessun monitoraggio richiesto.</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Timore del proprietario nell'eseguire le iniezioni;</li> <li>➤ rischio di anafilassi;</li> <li>➤ non tutti i pazienti tollerano le iniezioni;</li> <li>➤ necessità di dare una buona spiegazione al proprietario per aumentarne la collaborazione;</li> <li>➤ non c'è la certezza che i benefici vengano ottenuti, nonostante i costi elevati.</li> <li>➤ disponibili solo in fiale di vetro con rischio di rottura;</li> <li>➤ costi elevati.</li> </ul> |

**Tabella 19.** Vantaggi e svantaggi dell'ASIT (Tratto e modificato da Griffin et Hillier, 2001).

#### 5.6.4 PROTOCOLLO

In medicina umana, al paziente vengono somministrate una serie di iniezioni di un allergene o di un mix di allergeni a partire da una dose molto bassa e andando a scalare, in modo da arrivare ad un plateau che il soggetto riesce a tollerare: una volta raggiunto il mantenimento, le iniezioni vengono fatte ad intervalli di 4-6 settimane per un periodo variabile dai 3 ai 5 anni.

Le somministrazioni nella fase d'attacco possono essere settimanali oppure si possono eseguire attraverso due tipi di protocollo:

- “*Cluster*”: ossia si somministrano più dosi nel corso di una giornata, quindi si attende una settimana prima di proseguire con le successive;

- “*Rush*”: nello stesso giorno si somministrano più fiale ognuna contenente di volta in volta una dose maggiore di allergene. Questo protocollo ha lo svantaggio di innescare una serie di reazioni avverse che possono insorgere molto rapidamente (Frew, 2010).

In medicina veterinaria, per quanto riguarda gli intervalli ideali per le iniezioni di induzione prima, e di mantenimento poi, non esistono delle linee guida prestabilite: sono consigliate dosi crescenti nella fase d’attacco a distanza di 2 – 7 giorni, mentre intervalli variabili dai 5 ai 20 giorni quando si raggiunge la fase di mantenimento (Griffin et Hillier, 2001).

Uno degli svantaggi principali delle somministrazioni sottocutanee sta nei lunghi tempi necessari sia durante le fasi di attacco che di mantenimento, motivo che potrebbe anche portare alla prematura sospensione del protocollo terapeutico per volontà del proprietario.

L’obiettivo a cui si mira è quello di raggiungere nelle tempistiche minori la fase di mantenimento alla dose maggiore di allergene sopportata dal paziente senza che siano indotti però gravi effetti collaterali.

Perciò, anche in medicina veterinaria, si sono studiati i protocolli “rush”, di breve durata e particolarmente intensi, volti a velocizzare la fase d’attacco per giungere più rapidamente a quella di mantenimento.

Si è visto che questo protocollo comporta notevoli miglioramenti clinici, tuttavia, a causa dei potenziali effetti collaterali improvvisi, come prurito molto intenso ed orticaria, molto spesso è richiesta una sospensione prematura del protocollo.

In medicina veterinaria, per quanto riguarda i dosaggi da somministrare, data la mancanza di dati standardizzati risulta difficile fare valutazioni attendibili inerenti a quali concentrazioni di allergene scegliere nelle varie fasi dell’immuno – terapia e quindi confrontare i risultati ottenuti con ogni dose utilizzata.

Solitamente il mantenimento viene effettuato con dosi di allergene variabili tra i 10.000 e i 20.000 PNU/ml.

La dose stessa di allergene scelta può inficiare l’efficacia dell’ASIT: protocolli ad alte dosi si sono dimostrati efficaci così come quelli a basse dosi.

Ci sono alcune evidenze secondo le quali i protocolli con le dosi standard sono i più efficaci: danno delle percentuali maggiori di soggetti in remissione clinica (Griffin et Hillier, 2001; Colombo et al., 2005).

Le modulazioni relative ai tempi e ai dosaggi di somministrazione dipendono da paziente a paziente, in particolare dalla risposta soggettiva dello stesso alle prime iniezioni e dal grado di miglioramento clinico che si riesce ad ottenere.

Tuttavia, per arrivare a formulare la dose ottimale il medico veterinario dovrebbe anche istruire il proprietario del paziente al fine di ottenere un riscontro su un eventuale miglioramento clinico del soggetto: tramite una scala di valutazione analogica il proprietario dovrebbe essere in grado di monitorare il prurito, previo avvertimento che nei primi periodi un lieve aumento è considerato accettabile.

Se i segni clinici si intensificano eccessivamente significa che la dose di tolleranza massima sopportata dal paziente è stata superata e che la dose finale da raggiungere per l'iposensibilizzazione deve essere abbassata (Miller et al., 2013).

Qualora fosse necessario, inizialmente si tenta di diminuire la concentrazione degli estratti utilizzati nel mantenimento (10.000 PNU) chiedendo al proprietario di valutare il prurito nei 7-14 giorni successivi.

Si diminuisce, si mantiene costante o si aumenta ulteriormente la concentrazione dei mantenimenti successivi finché non si ottiene la risposta ottimale. I parametri per deciderlo sono:

1. la concentrazione di un'iniezione conseguente potrebbe venir diminuita nel caso in cui l'iniezione precedente avesse dato dei miglioramenti al sintomo;
2. può rimanere invariata se non ci sono stati miglioramenti;
3. può aumentare se molte iniezioni precedenti hanno portato ad una diminuzione del prurito ma le più recenti hanno portato ad un aumento del sintomo (Loewenstein et Mueller, 2009; Miller et al., 2013).

Nel caso di un trattamento di 12 mesi non soddisfacente è possibile proporre un'immunoterapia in cui si combinano allergeni con complessi immunostimolatori costituiti da liposomi, plasmidi e DNA. Secondo lo studio condotto da Mueller e colleghi nel 2005 a seguito di 6 iniezioni intradermiche in un periodo di 14 settimane un miglioramento significativo di prurito e una diminuzione di IL-4 suggerisce che questo protocollo possa avere un effetto benefico (Mueller et al., 2005).

### 5.6.5 SCELTA DEGLI ALLERGENI

Attualmente il numero di allergeni utilizzati nelle somministrazioni durante l'immuno-terapia arriva fino a 30 , mentre in passato si arrivava ad un massimo di 12 allergeni (Scott, 1981; Miller et al., 2013).

Per aver una maggior sicurezza che il paziente risponderà positivamente all'immunoterapia sarebbe meglio che questa venisse impostata scegliendo gli allergeni sulla base dei risultati ottenuti da test di intradermoreazione e/o sierologici, anziché basarsi sulla probabilità di entrare in contatto con un certo tipo di allergeni (Miller et al., 2013).

È stato osservato che trattare un paziente con degli allergeni alla cieca senza essere certi che vi sia una reale ipersensibilità nei loro confronti consente un miglioramento delle lesioni del 18% dei pazienti, contro il 70% di miglioramento nei soggetti trattati sulla base dei risultati ottenuti dai test laboratoristici. Inoltre, non può escludersi il rischio di favorire l'insorgenza di nuove ipersensibilità, sebbene non sia ancora stato confermato (Anderson et al., 1993; Park et al., 2000).

Nel caso in cui il paziente presentasse un gran numero di ipersensibilità, la scelta del numero e del tipo di allergeni deve basarsi su più aspetti:

- Storia clinica;
- tipo di allergeni presenti nell'ambiente;
- frequenza di esposizione agli allergeni;
- durata della presenza degli allergeni.

Se si scegliesse di creare un mix di allergeni bisogna prestare attenzione a due fattori: evitare di diluire eccessivamente un allergene, rendendolo di fatto inefficace; ed evitare di unire tra loro allergeni che possono inibire l'un con l'altro le loro allergenicità: ad esempio le muffe contengono delle proteasi che possono inibire gli allergeni dei pollini (Griffin et Hillier, 2001).

Esistono poi veicoli diversi attraverso i quali è possibile somministrare un allergene: le soluzioni acquose, i sali precipitati e le emulsioni (Tabella 20) (Miller et al., 2013).

| <b>FORME DI ALLERGENI</b>             | <b>CARATTERISTICHE</b>  |
|---------------------------------------|---|
| <b>ALLERGENI IN SOLUZIONI ACQUOSE</b> | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Assorbiti rapidamente;</li> <li>✓ utilizzati in piccole dosi;</li> <li>✓ iniezioni frequenti e multiple;</li> <li>✓ perdita di efficacia in diluizioni elevate.</li> </ul> |
| <b>ALLERGENI SALI PRECIPITATI</b>     | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Azione intermedia tra allergeni acquosi e emulsione;</li> <li>✓ assorbimento lento;</li> <li>✓ dosi maggiori e iniezioni meno frequenti.</li> </ul>                        |
| <b>EMULSIONE DI ALLERGENI</b>         | <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Assorbimento lento;</li> <li>✓ dosi più grandi;</li> <li>✓ minor numero di iniezioni.</li> </ul>   |

**Tabella 20.** Forme di allergeni (Miller et al., 2013).

### **5.6.6 EFFETTI COLLATERALI**

Sicuramente uno degli effetti collaterali più evidenti nel cane è il prurito intenso che può svilupparsi, soprattutto nelle fasi iniziali, quando si procede con somministrazioni crescenti di allergene.

Il prurito può insorgere immediatamente dopo la prima iniezione e persistere da qualche ora ad un paio di giorni. La possibilità che ciò si sviluppi varia dal 5% al 50% (Rosser EJ, 1998).

Quando si decide di intraprendere questa strategia terapeutica è importante anche la compliance del proprietario, perché, soprattutto nei primi mesi, è necessario capire se ci sono miglioramenti o peggioramenti, come ad esempio:

- Il soggetto ansima in modo persistente ed è riluttante al movimento;
- manifesta letargia e depressione;
- ha episodi di vomito e/o diarrea;
- sviluppa angioedema facciale;

- presenta episodi di orticaria regionale o generalizzata;
- può andare incontro ad episodi di anafilassi.

La terapia si considera sicura se dopo la seconda iniezione le reazioni avverse diminuiscono sensibilmente o scompaiono del tutto.

In generale, le reazioni avverse sono relativamente rare e colpiscono circa il 5% dei soggetti sottoposti a trattamento (Miller et al., 2013).

### **5.6.7 EFFICACIA/BENEFICI**

In medicina veterinaria, il tasso di successo dell'ASIT varia dal 50 all' 80% ed è influenzato da più fattori:

1. Selezione del paziente e momento di insorgenza della patologia;
2. tipo di test allergici eseguiti;
3. tipologia e fonte di allergeni;
4. protocollo di induzione scelto;
5. dose e concentrazione di allergeni;
6. criteri utilizzati per valutare le risposte cliniche ottenute.

I benefici tratti dall'immunoterapia possono apparire 2 settimane dall'inizio del trattamento, così come 9 mesi più tardi. Tuttavia, è lecito supporre che un cane che non risponde entro i 9 mesi, presumibilmente non lo farà neanche successivamente.

L'inizio di un secondo ciclo viene eseguito al bisogno, poco prima che i segni clinici riappaiano, e può essere necessario ripeterlo ogni settimana o ogni 6 mesi (Loewenstein et Muller, 2009).

Uno dei limiti maggiori per fare delle valutazioni attendibili relativamente all'efficacia di questo trattamento in medicina veterinaria è che mancano dati standardizzati: andrebbe definita la quantità dell'allergene presente in quantità maggiori in modo da poter creare dei protocolli ripetibili e attendibili, così come mancano tabelle di valutazione relative ai segni clinici e ai sintomi, universalmente utilizzate.

Dal momento che ogni protocollo è diverso ed è studiato sul paziente, alle volte eseguire delle modifiche durante il periodo di somministrazione, a seconda delle risposte del soggetto, può aumentarne l'efficacia.

Non si pensa influiscano sull'efficacia del protocollo aspetti legati all'età e al sesso; invece altri studi hanno valutato la risposta di certe razze dopo la somministrazione dell'immunoterapia: i Boxer ed i West Highland White terriers sembrano avere scarse risposte al trattamento così come i Retrievers. Mentre per quanto riguarda gli Spaniel e i Terrier le risposte sembrano nettamente migliori, con tassi di successo attorno al 70% (Willemse et al., 1994).

Un fattore rilevante invece che si è visto avere maggiore influenza è la via di somministrazione: l'ASIT può essere somministrata o come iniezione sottocutanea/ intradermica o per via orale o per via intralinfatica.

La SLIT si è rivelata sicura ed efficace in medicina umana: in uno studio condotto su persone sensibili nei confronti degli acari della polvere, la SLIT ha portato ad un 59% di miglioramento dei segni clinici e nei bambini l'effetto risulta ancora più imponente. Le somministrazioni nella fase di mantenimento prevedevano l'assunzione del farmaco una volta al giorno (Carario et al., 2007; Pajno et al., 2007).

Sul cane per la prima volta, con uno studio di DeBoer e colleghi, si testa l'efficacia della SLIT su soggetti atopici sensibili agli acari della polvere tramite un protocollo utilizzato in medicina umana valutando poi la riduzione dei segni clinici e le variazioni immunologiche specifiche.

La terapia si è dimostrata ben tollerata e ha permesso di ottenere dei miglioramenti clinici i quali, da un punto di vista immunologico, sono stati affiancati da un aumento delle IgG allergene specifiche e ad una diminuzione delle IgE allergene specifiche, in modo parallelo a quanto rilevato per l'immuno-terapia somministrata per via sottocutanea (Deboer et al., 2016).

Anche per la SLIT si è valutata la possibilità di utilizzare il protocollo "rush" con una frequenza di somministrazione nella fase di mantenimento ogni 3-4 settimane. Gli unici effetti collaterali registrati sono il prurito e il vomito, in forma lieve, nelle prime 48 ore della fase d'attacco. Il tasso di miglioramento clinico si è registrato nell'88% dei pazienti. Di conseguenza anche questo protocollo può essere considerato efficace e relativamente sicuro.

Un fattore da sottolineare è che la decisione di passare dalla SLIT alla SCIT o viceversa può essere un beneficio nei soggetti dimostratisi non responsivi: bisogna tuttavia prestare attenzione al fatto che il passaggio dalla SLIT alla SCIT potrebbe indurre effetti collaterali come lo shock anafilattico (Fujimura et Ishimaru, 2016).

L'ILIT sembra essere un'altra via ben tollerata sia in medicina umana che in medicina veterinaria. In medicina umana ha permesso di ridurre il tempo di trattamento da 3 anni ad 8 settimane. In medicina veterinaria in un periodo complessivo di 6 mesi si è registrata una percentuale del 60% di pazienti che hanno risposto positivamente a questa modalità di trattamento e il miglioramento clinico si è evidenziato già dopo il primo mese di terapia. Sicuramente questo dato è incoraggiante, sostenuto anche dall'assenza di effetti collaterali sviluppati durante il trattamento, per considerare l'ILIT una valida alternativa alla via di somministrazione sottocutanea dell'immunoterapia (Fischer et al., 2016).

L'efficacia dell'ASIT infine può essere modulata se concomitantemente il soggetto fosse in terapia con altri trattamenti sintomatici (i.e. corticosteroidi).

Sembra che la somministrazione di prednisolone a basse dosi o a giorni alterni non influenzi il trattamento, sebbene, secondo alcuni studi, ne sia sconsigliato l'utilizzo nella fase di induzione del protocollo. I corticosteroidi potrebbero mascherare eventuali effetti collaterali indotti dall'ASIT, rendendo impossibile fare delle modifiche del trattamento.

La ciclosporina sembra invece non interferire, sebbene i suoi effetti a lungo termine non siano ancora conosciuti (Loewenstein et Muller, 2009).

### **5.6.8 CONSIDERAZIONI**

In medicina umana così come in medicina veterinaria, non è ancora chiaro se questo protocollo terapeutico sia indiscutibilmente il più efficace nel trattamento della dermatite atopica, tuttavia ci sono notevoli evidenze che possa contribuire a dare dei miglioramenti nel lungo periodo, prevenendo lo sviluppo dei segni clinici.

È un approccio terapeutico diverso rispetto alla classica terapia sintomatica e di questo il proprietario deve esserne messo al corrente: ci sono delle tempistiche, dei costi e degli impegni superiori richiesti rispetto a qualsiasi altra strategia terapeutica.

In primis, va considerata l'effettiva lunghezza delle tempistiche con cui i reali benefici possono essere percepiti: il proprietario spesso è demotivato a procedere perché non vi sono dei miglioramenti tangibili dal punto di vista clinico del proprio animale domestico a differenza di quanto invece accade se si procede con una terapia sintomatica come può essere quella con i corticosteroidi.

Non si esclude inoltre che durante il trattamento vi sia la possibilità di peggioramento della condizione clinica del soggetto: potrebbe sviluppare infezioni secondarie o sviluppare nuove allergie.

Tuttavia l'efficacia di un trattamento immunomodulatore sta nei vantaggi che una sua buona riuscita potrebbe apportare al paziente nel lungo periodo (Olivry et al., 2015).

### **5.6.9 PROSPETTIVE FUTURE**

Nei bambini le allergie hanno uno sviluppo graduale: inizialmente verso un unico agente che poi nel tempo può evolvere a più di uno.

Non è chiaro se l'immunoterapia possa avere un effetto preventivo, tuttavia è sicuramente un metodo con il quale si evita di acquisire nuove sensibilizzazioni, per lo meno in medicina umana.

Ad oggi non sono molti gli studi a riguardo, però si è evidenziato che soggetti (fino ai 16 anni) trattati con l'immunoterapia e presentanti nella loro storia clinica episodi di asma, vedono ridurne l'incidenza (~70% dei bambini trattati riducono gli episodi dopo 4 anni di terapia), così come soggetti atopici non ancora affetti da episodi asmatici, non svilupparli affatto nel 26% dei casi (Niggemann et al., 2006).

Non si sono ottenuti gli stessi risultati per gli adulti (Shaik WA, 1997).

Ad oggi l'aspetto che più preme è capire se effettivamente l'immunoterapia sia l'opzione migliore sotto tutti i punti di vista (rapporto costo/qualità, qualità della vita, sicurezza, ...), comparata alla classica terapia sintomatica e soprattutto comprendere se può essere considerata un trattamento preventivo piuttosto che curativo.

Con gli allergeni ricombinanti si possono ottenere buoni risultati nella maggior parte dei pazienti con forme allergiche forti: sono stati standardizzati dei set di allergeni che vengono somministrati assieme e verso i quali più del 50% della popolazione risulta sensibile.

In futuro si mira ad ottenere un "vaccino" quanto più standardizzato possibile con gli allergeni ricombinanti, atto ad evitare effetti collaterali e dare maggiori garanzie possibili di buona riuscita.

Tutto ciò non ha ancora trovato riscontro in medicina veterinaria, tuttavia, è la direzione verso cui sono mirati tutti gli studi ad oggi in atto: arrivare alla standardizzazione di un protocollo che permetta di ottenere una gestione terapeutica sicura, efficace e a lungo termine del paziente affetto da dermatite atopica (Frew, 2010).



## 6 PREVENZIONE

La dermatite atopica è una patologia a carattere progressivo che nel momento in cui si instaura richiede una gestione a lungo termine, senza prospettive di remissione completa.

La necessità di provare a delineare dei protocolli preventivi, basandosi sul carattere ereditario e familiare della patologia, è divenuto uno dei più recenti oggetti di studio.

La prevalenza della patologia si è rivelata aumentata soprattutto nei paesi più sviluppati: in accordo con la “teoria dell’igiene”, secondo cui un’insufficiente esposizione ai patogeni ambientali è una delle cause dell’insorgere della patologia, modulare la risposta immunitaria sin da neonati è un sistema con il quale prevenire l’insorgenza di patologie infiammatorie ed allergiche.

Non è più rilevante l’idea secondo la quale evitare l’allergene sia il modo per risolvere la patologia, piuttosto si è sviluppato un concetto di “tolleranza immunitaria”, indotta da un’esposizione graduale all’allergene, che è considerato uno dei sistemi per prevenire l’insorgenza di allergie.

Da qui lo sviluppo di gruppi di ricerca impegnati nel capire quale ruolo possano avere i probiotici e i prebiotici nel manipolare e stimolare la microflora intestinale per sviluppare un metodo innovativo e non invasivo nel modulare lo sviluppo della patologia infiammatoria e allergica agendo a livello del sistema immunitario; tuttavia il loro effetto rimane ancora elusivo, soprattutto in medicina veterinaria, dove gli studi a riguardo sono ancora agli albori (Torii et al., 2009; Vitaliti et al., 2014).

Quello che ad oggi si è intuito è che, per quanto riguarda la dermatite atopica canina, potrebbero essere efficaci nel cucciolo per ritardare l’insorgenza della malattia e quindi il suo successivo sviluppo, tuttavia non si conoscono le modalità di somministrazioni migliori, le posologie e quali ceppi di probiotici agiscano più efficacemente di altri.

Dato il possibile carattere familiare della patologia un altro aspetto su cui si è posta attenzione è quello relativo al trattamento della madre in gravidanza, in modo tale da ridurre il rischio di insorgenza della patologia in un cucciolo potenzialmente predisposto a svilupparla, attraverso il trattamento della madre negli ultimi mesi di gestazione.

A partire da un genitore affetto dalla patologia o da un cucciolo neonato l’obiettivo è quello di modulare la risposta immunitaria in modo tale da inibire lo sviluppo di una patologia allergica, quale la dermatite atopica (Marsella et al., 2012).

Fisiologicamente, subito dopo la nascita l'ospite subisce uno stimolo microbico primario grazie all'esposizione a specifici ceppi batterici.

Lo sviluppo di una flora microbica nel primo periodo postnatale attiva il sistema immunitario innato e adattativo e una stimolazione continua induce una maturazione del sistema immunitario mucosale intestinale (Rather et al., 2016).

L'obiettivo dovrebbe essere quello di prevenire l'insorgenza di patologie allergiche agendo su soggetti di età non superiore ai 3 anni, poiché in un neonato la probabilità di buona riuscita nella modulazione del sistema immunitario è sicuramente più elevata considerando che deve ancora svilupparsi una tolleranza immunologica. In un soggetto più anziano invece le potenzialità di una terapia immuno-modulatrice sono quelle di alleviare i sintomi della patologia (Vitaliti et al., 2014)

I probiotici sono dei microrganismi vivi considerati efficaci per la prevenzione delle patologie allergiche, qualora somministrati nelle condizioni e nelle tempistiche idonee ad evitarne lo sviluppo.

Il probiotico viene definito tale quando resiste ad ambienti acidi, si lega all'epitelio intestinale, permane nel tratto digerente abbastanza da stimolare la produzione di agenti antimicrobici e modulare le risposte immunitarie.

È molto importante sapere di quale genere di probiotico si parla: ogni genere ha delle proprietà, di conseguenza, degli effetti diversi sul paziente a cui li si somministra (Morelli et Capurso, 2012).

Solitamente si parla di lattobacilli gram positivi, bifidobatteri e streptococchi: in particolare il *Lactobacillus rhamnosus GG* è un genere riconosciuto come avente attività probiotica effettiva sia in medicina veterinaria che in medicina umana, mentre efficace si è rivelato anche il *Lactobacillus acidophilus* del ceppo L-92 nella prevenzione delle riniti allergiche in medicina umana e la commistione di due ceppi del *Lactobacillus*, ossia il *rhamnosus* 19070-2 e il *reuteri* DSM 122460: la significativa riduzione dei segni clinici si è evidenziata in soggetti di età compresa tra l'anno d'età e i 13 anni nella riduzione dell'eczema (Rosenfeldt et al., 2003; Torii et al., 2009; Marsella et al., 2012).

Alla base delle patologie allergiche, dal punto di vista immunitario, c'è un alterato rapporto tra la risposta dei linfociti T helper 1 e 2: i probiotici agiscono a favore della risposta mediata dai T helper 1, aumentando la concentrazione dei linfociti T regolatori ed è questo il motivo per cui potrebbero essere considerati ottimi alleati nella prevenzione della patologia (Rather et al., 2016).

Alcuni studi condotti in medicina umana sono a favore dell'utilizzo di probiotici nella prevenzione e nel trattamento dell'eczema atopico dal momento che sembra allevino sia l'infiammazione locale che sistemica. La loro azione è un'azione immunoregolatrice che si basa sul bilanciamento delle citochine pro infiammatorie ed antiinfiammatorie.

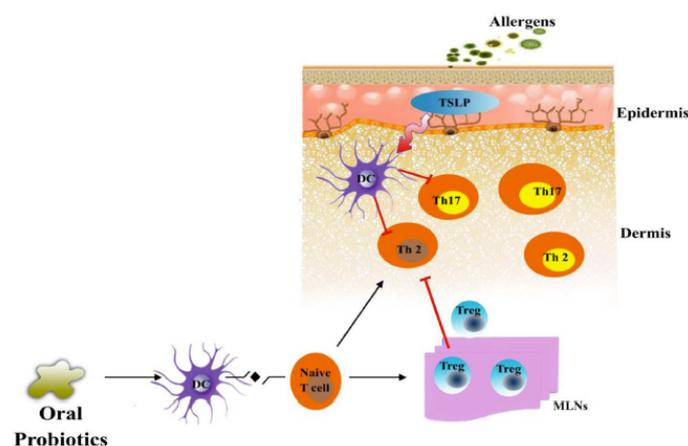
Alleviano l'infiammazione intestinale, diminuiscono le disfunzioni della mucosa e diminuiscono le reazioni di ipersensibilità.

Fintanto che la mucosa intestinale è "sterile", ossia non ancora sensibilizzata da nessun tipo di allergene, è opportuno che venga stimolata con batteri commensali essenziali per lo sviluppo di una tolleranza adeguata (Shohani et al., 2013).

Gli effetti immunomodulatori dei probiotici non sono ancora del tutto chiari, però la loro capacità anti infiammatoria è stata studiata su un modello animale ed ha evidenziato una diminuzione dei livelli di IFN- $\gamma$ , IL-4 ed un'aumentata espressione dei linfociti T regolatori, di IL-10 e di TGF- $\beta$  nei linfonodi mesenterici: la migrazione dei linfociti regolatori nella cute poi va ad inibire lo spostamento verso una risposta immunitaria mediata dai linfociti Th2.

I probiotici vanno ad inibire la differenziazione delle cellule dendritiche impedendo quindi ai linfociti T naive di differenziarsi verso i linfociti Th2 (Figura 47) (Rather et al., 2016).

Inoltre, la somministrazione di probiotici in medicina umana ha evidenziato la secrezione di IL-12 da parte delle cellule dendritiche, associata ad un'attenuazione della risposta dei linfociti T, poiché di questi ne viene indotta l'apoptosi (Torii et al., 2009).



**Figura 47. Meccanismo d'azione dei probiotici.** L'inibizione dell'effetto infiammatorio da parte dei probiotici è reso possibile grazie ad un'aumentata sintesi dei linfociti T regolatori (Rather et al., 2016).

Uno studio del 2010 eseguito da Jung e colleghi è stato condotto eseguendo delle prove sui topi affetti da disordini cutanei ai quali veniva somministrato il prodotto fermentato di un albero da frutto appartenente alla famiglia delle Rosacee miscelato a dei probiotici del genere *Saccharomyces* e *Lactobacillus*; i risultati ottenuti sono incoraggianti:

1. Diminuita gravità dei segni clinici;
2. riduzione dell'infiammazione cutanea;
3. riduzione delle IgE sieriche e degli eosinofili;
4. aumentata espressione dell'IL-10.

Queste evidenze hanno suggerito che una dieta arricchita con probiotici può ritardare lo sviluppo della dermatite atopica e ridurre le manifestazioni cliniche.

Bisogna ricordare che il topo può fungere da modello per la specie umana e canina, di conseguenza, questo studio dimostrandosi positivo dal punto di vista dei risultati, può esserlo anche in funzione di una trasposizione di questo modello al cane e all'uomo (Jung et al., 2010).

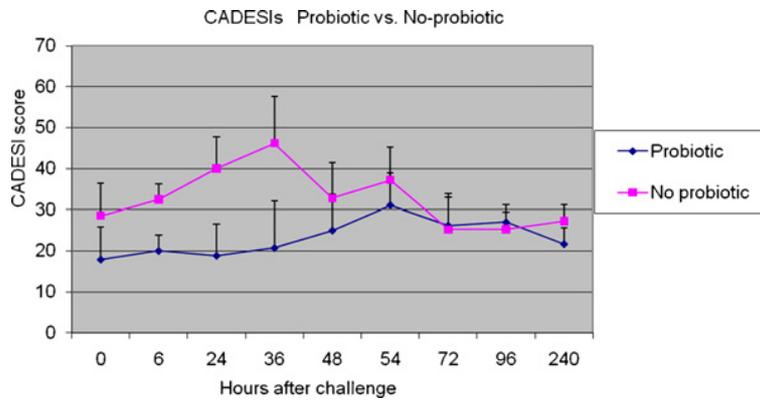
A sua volta, nello studio della dermatite atopica umana, il cane molte volte si è rivelato un'ottima base di studio, grazie alla somiglianza degli aspetti clinici e immunologici; di conseguenza, si può pensare che siano comparabili anche per quanto riguarda l'aspetto della prevenzione, come si è cercato di dimostrare nello studio del 2009 di Marsella e colleghi condotto su cuccioli di beagle.

Nello specifico questo studio evidenzia come la somministrazione prenatale di *Lactobacillus rhamnosus GG* (LGG) ha portato ad una significativa diminuzione delle IgE allergene – specifiche. Non si è giunti alla conclusione definitiva che la somministrazione di questi principi prevenga completamente l'insorgere della condizione patologica, tuttavia i soggetti inclusi nello studio hanno dimostrato dei segni clinici di molto ridotti in gravità (Marsella et al., 2009).

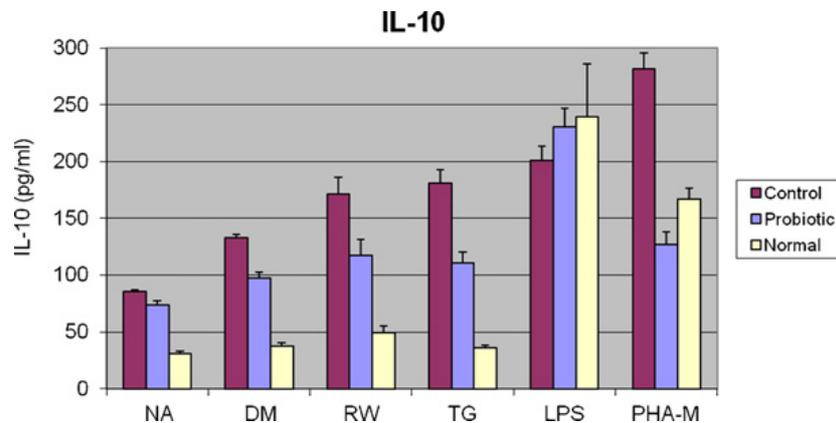
Successivamente lo stesso gruppo di ricerca ha pubblicato uno studio di follow – up (Marsella et al. 2012), a tre anni dalla sospensione della somministrazione di probiotici, con l'obiettivo di valutare la gravità dei segni clinici e ed eseguire misurazioni riguardo alle IgE allergene -specifiche, all' IL-10 e al TGF- $\beta$  a seguito della stimolazione allergenica.

Si sono rilevati una diminuzione della sintomatologia clinica (Figura 48) a seguito della stimolazione allergenica, l'IL-10 risulta presente a livelli più alti nei soggetti non trattati (Figura 49), suggerendo che in questo caso si comporti maggiormente come una citochina pro-infiammatoria che anti-infiammatoria; mentre non si sono rilevate differenze significative per

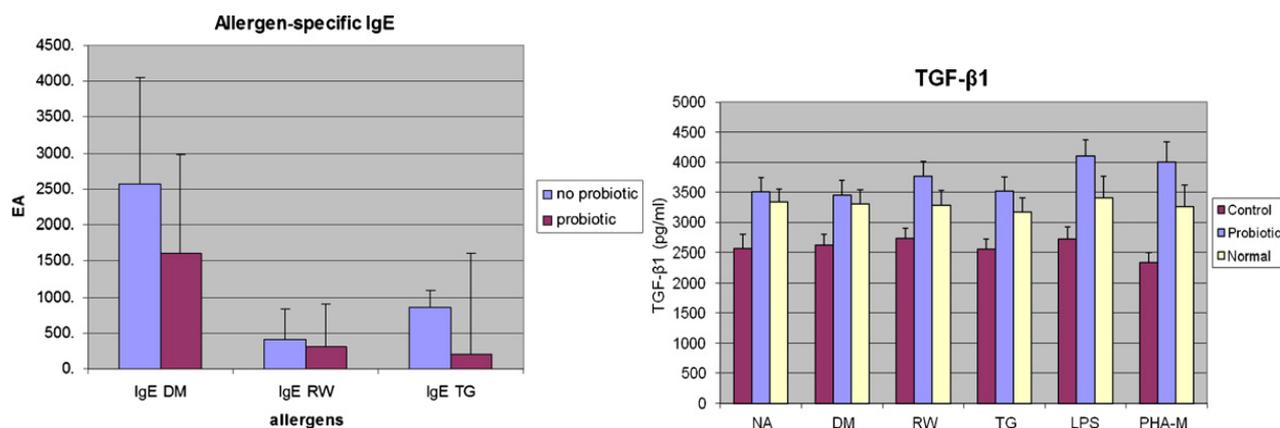
quanto riguarda le concentrazioni di TGF- $\beta$  così come per l'aumento delle IgE allergene specifiche (Figura 50).



**Figura 48. CADESI score.** Confronto tra la condizione clinica dei soggetti sottoposti a trattamento con probiotici e soggetti non esposti al trattamento. Il miglioramento clinico è rilevante nei soggetti che hanno assunto il trattamento (Marsella et al., 2012).



**Figura 49. Valutazione dei livelli di IL-10.** Questa interleuchina appare nettamente più elevata nei gruppi non sottoposti a trattamento con probiotici (Marsella et al., 2012).



**Figura 50. Valutazione delle IgE allergene-specifiche e dei livelli di TGF-β1.** Non si sono evidenziate differenze statisticamente significative tra i soggetti trattati con probiotici e quelli non trattati (Marsella et al., 2012).

Questi risultati sono paragonabili a due studi condotti su bambini rispettivamente di 2 e 4 anni d'età, nei quali si è dimostrata una riduzione del 50% della presenza di eczema ma non si è rilevata nel tempo una differenza di sensibilizzazione. Si può dedurre che l'effetto del probiotico non protegge dalla sensibilizzazione mentre sono evidenti gli effetti sulle manifestazioni cliniche (Kalliomaki et al., 2001; Kalliomaki et al., 2003).

Dati i risultati ottenuti è lecito supporre che il meccanismo d'azione dei probiotici sia legato al ripristino di una risposta immunitaria alterata e l'obiettivo sia quello di annullare la risposta infiammatoria generata nell'organismo.

A tal proposito va ricordato che nell'eziopatogenesi della dermatite atopica entrano in gioco fattori diversi, tra i quali alterazioni delle caratteristiche della barriera cutanea; in particolare, mutazioni del gene della filaggrina, proteina presente a livello cutaneo deputata a favorire l'integrità della cute, comportano un fattore di rischio per l'insorgenza della patologia: si è visto che l'azione dei probiotici su questo fronte è nulla, ossia un'esposizione precoce ai probiotici non altera l'espressione della filaggrina (Marsella et al., 2013).

L'utilizzo dei probiotici come metodo preventivo nell'ambito della dermatite atopica è ancora una vastissima area su cui è necessario far ricerca.

Da questi studi condotti in medicina umana e in medicina veterinaria si può evincere che l'attività del probiotico sia migliorativa dal punto di vista della sintomatologia clinica, poiché contribuisce a ridurre l'impatto della gravità delle manifestazioni della dermatite atopica.

D'altro canto non si può ancora sostenere con certezza la somministrazione dei probiotici garantisca lo sviluppo di una tolleranza immunitaria.

Quello che ad oggi è emerso è che si può ottenere un beneficio dall'utilizzo di questi prodotti, mediante somministrazioni orali a quei soggetti altamente predisposti a sviluppare atopica; il fine è quello di ritardare l'insorgenza della patologia e ridurre l'impatto e la gravità delle lesioni caratterizzanti (Marsella et al., 2012).

Questo lo si può affermare dai riscontri osservati:

1. miglioramento della SCORAD;
2. diminuzione delle IgE;
3. aumento del TGF- $\beta$ ;
4. diminuzione dell'IFN- $\gamma$ ;
5. diminuzione degli eosinofili e della concentrazione di IL-4 (Marsella et al., 2012; Rather et al., 2016).

Un loro utilizzo prolungato nel tempo sia nella fase pre-natale, attraverso la somministrazione durante la gravidanza della madre, sia nella fase post natale può aiutare a diminuire l'incidenza della patologia, tuttavia i fattori che possono alterarne gli effetti sono molti (antibiotici, dieta prenatale e postnatale, via di somministrazione e ambiente di vita).

Le loro potenzialità si sanno essere ceppo-dipendenti e specie dipendenti, di conseguenza la loro efficacia deve essere studiata nella singola patologia di interesse considerandone tutte le variabili.

La loro sicurezza a lungo termine e l'assenza di gravi effetti collaterali, anche se somministrati nelle fasi più precoci della vita di un soggetto, li rendono degli oggetti di studio molto stimolanti, dal momento che un loro utilizzo come supporto ad una terapia standard potrebbe rivelarsi altamente benefico per la salute del paziente (Vitaliti et al., 2014; Rather et al., 2016).

È chiaro che è ancora troppo precoce considerare questi prodotti come un'efficace strategia terapeutica e preventiva nell'approccio alle malattie allergiche, tuttavia i diversi studi condotti apportano degli interessanti stimoli per il futuro.

Un'altra opzione che potrebbe essere considerata, ma che richiede numerosi approfondimenti, per potenziare il beneficio che si è visto derivare dall'utilizzo dei probiotici è la loro associazione ai prebiotici, finalizzati a potenziarne l'effetto, tramite diete arricchite: se vengono somministrate nelle

prime fasi di vita di un organismo dovrebbero essere efficaci nel modificare e indirizzare la giusta colonizzazione microbica intestinale e di conseguenza indurre una corretta tolleranza immunologica (Prescott et Björkstén, 2007).

## CONCLUSIONI

Nell'ambito della dermatologia veterinaria, la dermatite atopica canina è fra le patologie di più alto interesse e sulla quale si sono eseguiti e si stanno tutt'ora eseguendo una grandissima quantità di studi. Nel corso degli ultimi anni la ricerca ha portato alla luce nuovi e fondamentali concetti che, oltre a riguardare anomalie a carico della cute, hanno spostato l'attenzione anche su tutti quei meccanismi molecolari e di risposta immunitaria alterata che si sono rivelati centrali nell'eziopatogenesi della malattia.

Se in passato si riconduceva la patologia ad una semplice reazione di ipersensibilità di tipo 1 scatenata da un agente allergizzante verso il quale il soggetto si dimostrava sensibile ad oggi il quadro si è visto essere molto più elaborato e complesso, caratterizzato da una presenza dinamica di elementi cellulari e molecolari eterogenei, espressi in misura diversa a seconda dello stadio della patologia, del sistema immunitario del soggetto e delle terapie in quel momento in atto sul paziente.

In un soggetto atopico, non è possibile delineare, a prescindere, un unico tipo di risposta immunitaria, dal momento che si è visto che può esserci uno spostamento della stessa a favore dei linfociti Th1 o dei Th2, con le relative citochine, a seconda della fase acuta o cronica della malattia.

La scoperta poi che accanto ai linfociti T effettori vi fossero altri elementi coinvolti, come i linfociti T regolatori ad attività immuno-soppressiva, è un altro aspetto importante nell'acquisizione della piena comprensione del meccanismo eziopatogenetico della dermatite atopica.

Tutto quello che si è visto avvenire a carico del sistema immunitario è poi intrecciato - non è ancora chiaro se come causa o come conseguenza - ad alterazioni a carico della barriera cutanea.

L'acquisizione di queste nozioni ha portato quindi a sperimentare e a validare nuovi approcci terapeutici, mirati a ristabilire un equilibrio del sistema immunitario altrimenti sbilanciato.

Sono dei protocolli immuno-modulatori per i quali non ci sono ancora studi sufficienti per considerarli sostitutivi delle terapie sintomatiche che per anni si sono utilizzate.

Il sintomo principale, il prurito, si è sempre controllato mediante la prescrizione di terapie a base di corticosteroidi, i quali nel lungo periodo si sono visti essere altamente dannosi per la salute del paziente.

Ad oggi i principi attivi che costituiscono delle valide alternative nella gestione del sintomo e che possono essere somministrati anche per periodi di tempo prolungati sono numerosi: dagli inibitori della calcineurina, come la Ciclosporina e il Tacrolimus, agli inibitori delle Janus Kinasi come l'Oclacitinib, agli interferoni e agli anticorpi monoclonali.

Esiste anche la possibilità di sottoporre il paziente ad immuno – terapia o iposensibilizzazione: è il protocollo che garantisce i migliori risultati, dal punto di vista dei sintomi clinici e delle possibilità di recidive, nel 50-80% dei soggetti ai quali la si consiglia.

Le terapie immuno-modulatrici possono essere associate a trattamenti antibiotici per il controllo delle manifestazioni cliniche secondarie della patologia oppure a protocolli terapeutici finalizzati al ripristino della barriera cutanea, quali la somministrazione di diete arricchite con acidi grassi essenziali o prodotti topici a base di molecole lipidiche.

L'obiettivo a cui si mira è quello di formulare un piano terapeutico che garantisca una gestione del paziente quanto più a lungo termine possibile cercando di limitare al minimo gli effetti collaterali legati alla somministrazione di farmaci.

Infine, tali acquisizioni hanno spostato l'attenzione sull'importanza degli aspetti preventivi nella gestione della dermatite atopica: l'utilizzo di probiotici, ad esempio, ha come scopo il modulare il sistema immunitario, prima che venga sensibilizzato da allergeni che potrebbero indurre una risposta immunitaria anomala e alterata; la loro somministrazione permetterebbe di impedire o limitare lo sviluppo della malattia in soggetti predisposti.

Questo aspetto richiederà in futuro ancora numerosi approfondimenti; tuttavia i risultati che in quest'ambito si sono ottenuti in medicina umana sono incoraggianti anche per la medicina veterinaria.

## BIBLIOGRAFIA

- Amon U., Memmel U., Stoll R. and Amon S. 2000. Comparison of severity scoring of atopic dermatitis values and serum levels of eosinophil cationic protein and mast cell tryptase for routine evaluation of atopic dermatitis. *Acta dermatovenereologica-Stockholm* - 80(4): 284-286.
- Anderson R. and Sousa C. 1993. In Vivo vs In Vitro testing for canine atopy. *Advances in veterinary dermatology* 2425-427.
- Archer T.M., Fellman C.L., Stokes J.V., Pinchuk L.M., Lunsford K.V., Pruett S.B., Langston V.C. and Mackin A.J. 2011. Pharmacodynamic Monitoring of Canine T-Cell Cytokine Responses to Oral Cyclosporine. *Journal of veterinary internal medicine* 25(6): 1391-1397.
- Asahina R. and Maeda S. 2016. A review of the roles of keratinocyte-derived cytokines and chemokines in the pathogenesis of atopic dermatitis in humans and dogs. *Veterinary dermatology*.
- Beccati M., Martini V., Comazzi S., Fanton N. and Corneigliani L. 2016. Lymphocyte subpopulations and Treg cells in dogs with atopic dermatitis receiving ciclosporin therapy: a prospective study. *Veterinary dermatology* 27(1): 17-e5.
- Bensignor E. and Olivry T. 2005. Treatment of localized lesions of canine atopic dermatitis with tacrolimus ointment: a blinded randomized controlled trial. *Veterinary dermatology* 16(1): 52-60.
- Bethlehem S., Bexley J. and Mueller R. 2012. Patch testing and allergen-specific serum IgE and IgG antibodies in the diagnosis of canine adverse food reactions. *Veterinary immunology and immunopathology* 145(3-4): 582-589.
- Bizikova P., Pucheu-Haston C., Eisenschenk M.N.C., Marsella R., Nuttall T. and Santoro D. 2015(a). Review: Role of genetics and the environment in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 26(2): 95-e26.
- Bizikova P., Santoro D., Marsella R., Nuttall T., Eisenschenk M.N.C. and Pucheu-Haston C. 2015(b). Review: Clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 26(2).

Bousquet J., Lockey R. and Malling H. 1998. Allergen immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases A WHO position paper. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 102(4): 558-562.

Brazis P., Queralt M., de Mora F., Ferrer L. and Puigdemont A. 1998. Comparative study of histamine release from skin mast cells dispersed from atopic, ascaris-sensitive and healthy dogs. *Veterinary immunology and immunopathology* 66(1): 43-51.

Carario G., Galluccio A. and Pezza M. 2007. Sublingual immunotherapy efficacy in patients with atopic dermatitis and house dust mite sensitivity: a prospective study. *Curr Med Res Opin* 232503-2506.

Carlotti D., Boulet M., Ducret J., Machicote G., Jasmin P., RÃame C. and Albouy M. 2009. The use of recombinant omega interferon therapy in canine atopic dermatitis: a double-blind controlled study. *Veterinary dermatology* 20(5-6): 405-411.

Chamlin S.L., Frieden I.J., Fowler A., Williams M., Kao J., Sheu M. and Elias P.M. 2001. Ceramide-dominant, barrier-repair lipids improve childhood atopic dermatitis. *Archives of Dermatology* 137(8): 1110-1112.

Charman C.R., Venn A.J. and Williams H.C. 2004. The patient-oriented eczema measure: development and initial validation of a new tool for measuring atopic eczema severity from the patients' perspective. *Archives of Dermatology* 140(12): 1513-1519.

Codner E.C. and Griffin C.E. 1999. I test allergometrici nel cane. *Veterinaria* 13(4): 13.

Colombo S., Hill P., Shaw D. and Thoday K. 2005. Effectiveness of low dose immunotherapy in the treatment of canine atopic dermatitis: a prospective, double-blinded, clinical study. *Veterinary dermatology* 16(3): 162-170.

Cork M.J., Danby S.G., Vasilopoulos Y., Hadgraft J., Lane M.E., Moustafa M., Guy R.H., MacGowan A.L., Tazi-Ahnini R. and Ward S.J. 2009. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology* 129(8): 1892-1908.

Cornegliani L., Comazzi S., Beccati M., Martini V. and Vercelli A. 2012. Valutazione del rapporto CD4+/CD8+ nei cani affetti da dermatite atopica prima e dopo terapia con ciclosporina A: risultati preliminari. *Veterinaria* 26(3): 31.

Cosgrove S.B., Wren J., Cleaver D., Walsh K., Follis S., King V., Tena J. and Stegemann M. 2013 (a). A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the Janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel®) in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 24(6): 587-e142.

Cosgrove S.B., Wren J.A., Cleaver D.M., Martin D.D., Walsh K.F., Harfst J.A., Follis S.L., King V.L., Boucher J.F. and Stegemann M.R. 2013 (b). Efficacy and safety of oclacitinib for the control of pruritus and associated skin lesions in dogs with canine allergic dermatitis. *Veterinary dermatology* 24(5): 479-e114.

Cowell R.L. and Valenciano A.C. 2013. *Cowell and Tyler's Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat (4th Edition)*. Elsevier Health Sciences.

Czogala J., Marycz K., Kuryszko J. and Zawadzki M. 2011. Cells of the skin immune system in dogs with atopy. *Acta veterinaria Brno* 80(1): 11-17.

Day M.J. 1999. *Clinical immunology of the dog and cat*.

De Benedetto A., Yoshida T., Fridy S., Park J.S., Kuo I. and Beck L.A. 2015. Histamine and Skin Barrier: Are Histamine Antagonists Useful for the Prevention or Treatment of Atopic Dermatitis? *Journal of clinical medicine* 4(4): 741-755.

DeBoer D.J. and Griffin C.E. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXI): antihistamine pharmacotherapy. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 323-329.

DeBoer D., Verbrugge M. and Morris M. 2016. Clinical and immunological responses of dust mite sensitive, atopic dogs to treatment with sublingual immunotherapy (SLIT). *Veterinary dermatology* 27(2): 82-e24.

DeBoer D.J. and Hill P.B. 1999. Serum immunoglobulin E concentrations in West Highland White Terrier puppies do not predict development of atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 10(4): 275-281.

DeBoer D.J. and Hillier A. 2001(a). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 271-276.

- DeBoer D.J. and Hillier A. 2001(b). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVI): laboratory evaluation of dogs with atopic dermatitis with serum-based “allergy” tests. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 277-287.
- DeBoer D.J. and Marsella R. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 239-249.
- Dellmann H.D. and Eurell J.A. 2000. *Istologia e anatomia microscopica veterinaria*.
- Dip R., Carmichael J., Letellier I., Strehlau G., Roberts E., Bensignor E. and Rosenkrantz W. 2013. Concurrent short-term use of prednisolone with cyclosporine A accelerates pruritus reduction and improvement in clinical scoring in dogs with atopic dermatitis. *BMC veterinary research* 9(1): 1.
- Elias P.M., Hatano Y. and Williams M. 2009. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: Outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 121(6): 1337-1343.
- Elias P.M. 2008 (a). Barrier-repair therapy for atopic dermatitis: corrective lipid biochemical therapy. *Expert Review of Dermatology* 3(4): 441-452.
- Elias P.M. 2008 (b). Barrier repair trumps immunology in the pathogenesis and therapy of atopic dermatitis. *Drug discovery today. Disease mechanisms* 5(1): e33-e38.
- Favrot C., Steffan J., Seewald W. and Picco F. 2010. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary dermatology* 21(1): 23-30.
- Fischer N., A. Rostaher A. and Favrot C. 2016. Intralymphatic immunotherapy: An effective and safe alternative route for canine atopic dermatitis. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde* 158(9): 646-652.
- Flohr C., Pascoe D. and Williams H.C. 2005. Atopic dermatitis and the 'hygiene hypothesis': too clean to be true? *British journal of dermatology* 152(2): 202-216.
- Fontaine J. and Olivry T. 2001. Treatment of canine atopic dermatitis with cyclosporine: pilot clinical study. *Veterinary Record* 148663.

- Foster A.P., Knowles T.G., Moore A.H., Cousins P.D.G., Day M.J. and Hall E.J. 2003. Serum IgE and IgG responses to food antigens in normal and atopic dogs, and dogs with gastrointestinal disease. *Veterinary immunology and immunopathology* 92(3): 113-124.
- Freeman J. 1911. Further observations on the treatment of hay fever by hypodermic inoculations of pollen vaccine. *The Lancet* 178(4594): 814-817.
- Frew A. 2010. Allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 125(2): S306-S313.
- Fujimura M. and Ishimaru H. 2016. Rush sublingual immunotherapy in canine atopic dermatitis: a prospective pilot study. *Polish journal of veterinary sciences* 19(1): 3-6.
- Gadeyne C., Little P., King V.L., Edwards N., Davis K. and Stegemann M.R. 2014. Efficacy of oclacitinib (Apoquel®) compared with prednisolone for the control of pruritus and clinical signs associated with allergic dermatitis in client-owned dogs in Australia. *Veterinary dermatology* 25(6): 512-e86.
- Gáspár K., Baráth S., Nagy G., Mócsai G., Gyimesi E., Szodoray P., Irinyi B., Zeher M., Remenyik É. and Szegedi A. 2015. Regulatory T-cell subsets with acquired functional impairment: important indicators of disease severity in atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica* 95(2): 151-155.
- Germain P.A. 2005. CADESI (canine atopic dermatitis extent and severity index) reproducibility. *Revista de Medicina Veterinaria* 156(7): 382.
- Gonzales A., Bowman J., Fici G., Zhang M., Mann D. and Mitton-Fry M. 2014. Oclacitinib (APOQUEL®) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics* 37(4): 317-324.
- Gonzales A., Humphrey W., Messamore J., Fleck T., Fici G., Shelly J., Teel J., Bammert G., Dunham S., Fuller T. and McCall R. 2013. Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 24(1): 48.
- Griffin C.E. and DeBoer D.J. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 255-269.

- Griffin C. and Hillier A. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 363-383.
- Gross T. L., Ihrke P.J., Walder E.J. and Affolter V.K. 2005. Skin diseases of the dog and cat. *Clinical and histopathologic diagnosis. 2nd edn. Ames: Blackwell Science.*
- Guaguère E., J. Steffan J. and Olivry T. 2004. Cyclosporin A: a new drug in the field of canine dermatology. *Veterinary dermatology* 15(2): 61-74.
- Halliwell R. 2006. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary immunology and immunopathology* 114(3-4): 207-208.
- Hanifin J.M., Ling M.R., Langley R., Breneman D., Rafal E. and T. O. S. Group. 2001. Tacrolimus ointment for the treatment of atopic dermatitis in adult patients: part I, efficacy. *Journal of the American Academy of Dermatology* 44(1): S28-S38.
- Hauck V., Hügli P., Meli M., Rostaher A., Fischer N., Hofmann Lehmann R. and Favrot C. 2016. Increased numbers of FoxP3-expressing CD4+CD25+regulatory T cells in peripheral blood from dogs with atopic dermatitis and its correlation with disease severity. *Veterinary dermatology* 27(1): 26-e9.
- Hayashiya S., Tani K., Morimoto M., Hayashi T., Hayasaki M., Nomura T., Une S., Nakaichi M. and Taura Y. 2002. Expression of T helper 1 and T helper 2 cytokine mRNAs in freshly isolated peripheral blood mononuclear cells from dogs with atopic dermatitis. *Journal of veterinary medicine. Series A* 49(1): 27-31.
- Hensel P., Santoro D., Favrot C., Hill P. and Griffin C. 2015. Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC veterinary research* 11(1): 1.
- Hill P., Lau P. and Rybnicek J. 2007. Development of an owner-assessed scale to measure the severity of pruritus in dogs. *Veterinary dermatology* 18(5): 301-308.
- Hill P., Moriello K.A. and DeBoer D.J. 1995. Concentrations of total serum IgE, IgA, and IgG in atopic and parasitized dogs. *Veterinary immunology and immunopathology* 44(2): 105-113.
- Hill P. and Olivry T. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (V): biology and role of inflammatory cells in cutaneous allergic reactions. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3-4): 187-198.

- Hill P. and DeBoer D. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 169-186.
- Hillier A. and DeBoer D. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 289-304.
- Hillier A. and Griffin C.E. 2001(a). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 147-151.
- Hillier A. and Griffin C.E. 2001(b). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (X): is there a relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions? *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 227-231.
- Hou C., Nuttall T., Day M. and Hill P. 2004. Dermatophagoides farinae-specific IgG subclass responses in atopic dogs undergoing allergen-specific immunotherapy. *Veterinary dermatology* 15(s1): 5-5.
- Ito Y., Adachi Y., Makino T., Higashiyama H., Fuchizawa T., Shimizu T. and Miyawaki T. 2009. Expansion of FOXP3-positive CD4 CD25 T cells associated with disease activity in atopic dermatitis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology* 103(2): 160-165.
- Iwasaki T., Park S. and Kagawa N. 2005. Effect of recombinant canine IFN gamma (rCaIFN- $\gamma$ ) on canine atopic dermatitis evaluated by clinical signs, histopathology and TH1/TH2 cytokine mRNA. *Advances in Veterinary Dermatology* 582-88.
- Iwasaki T. and Hasegawa A. 2006. A randomized comparative clinical trial of recombinant canine interferon-gamma (KT-100) in atopic dogs using antihistamine as control. *Veterinary dermatology* 17(3): 195-200.
- Jaeger K., Linek M., Power H.T., Bettenay S.V., Zabel S., Rosychuk R.A.W. and Mueller R. 2010. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Veterinary dermatology* 21(1): 118-122.
- Jassies-van der Lee A., Rutten V.P.M.G., Bruijn J., Willemse T. and Broere F. 2014. CD4+and CD8+skin-associated lymphocytes in canine atopic dermatitis produce interleukin-13, interleukin-22 and interferon- $\gamma$  and contain a CD25+FoxP3+subset. *Veterinary dermatology* 25(5): 456-e72.

Joost T.V., Stolz E. and Heule F. 1987. Efficacy of low-dose cyclosporine in severe atopic skin disease. *Archives of Dermatology* 123(2): 166-167.

Joost T., Heule F., Korstanje M., Broek M., Stenveld H. and Vloten W.V. 1994. Cyclosporin in atopic dermatitis: a multicentre placebo-controlled study. *British Journal of Dermatology* 130(5): 634-640.

Jung B., Cho S., Koh H., Han D. and Lee B. 2010. Fermented Maesil (*Prunus mume*) with probiotics inhibits development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Veterinary dermatology* 21(2): 184-191.

Kalliomäki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P. and Isolauri E. 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 357(9262): 1076-1079.

Kalliomäki M., Salminen S., Poussa T., Arvilommi H. and Isolauri E. 2003. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *The Lancet* 361(9372): 1869-1871.

Kang M., Kim H., Jang H., Park H. and Korean S. 2014. Sensitization rates of causative allergens for dogs with atopic dermatitis: detection of canine allergen-specific IgE. *Journal of veterinary science* 15(4): 545-550.

Keppel K. E., Campbell K.L., Zuckermann F.A., Greeley E.A., Schaeffer D.J. and Husmann R.J. 2008. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Veterinary immunology and immunopathology* 123(3): 337-344.

Kim H. and Park H. 2016. Effect of Cyclosporine in Canine Atopic Dermatitis: Safety, Clinical Evaluation, and Mechanism Studies. *Pakistan Veterinary Journal* 36(2): 194-198.

Kramer A., Bekeschus S., Bröker B.M., Schleibinger H., Razavi B. and Assadian O. 2013. Maintaining health by balancing microbial exposure and prevention of infection: the hygiene hypothesis versus the hypothesis of early immune challenge. *Journal of hospital infection* 83S29-S34.

- Kunz B., Oranje A., Labreze L., Stalder J., Ring J. and Taieb A. 1997. Clinical validation and guidelines for the SCORAD index: consensus report of the European Task Force on Atopic Dermatitis. *Dermatology* 195(1): 10-19.
- Larché M., Akdis C.A. and Valenta R. 2006. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nature Reviews. Immunology* 6(10): 761-771.
- Leung D.Y.M. 2000. Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 105(5): 860-876.
- Litzlbauer P., Weber K. and Mueller R.S. 2014. Oral and subcutaneous therapy of canine atopic dermatitis with recombinant feline interferon omega. *Cytokine* 66(1): 54-59.
- Loewenstein C. and Mueller R. 2009. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Veterinary dermatology* 20(2): 84-98.
- Löflath, A., Von Voigts-Rhetz A., Jaeger K., Schmid M., Kuechenhoff H. and Mueller R.S. 2007. The efficacy of a commercial shampoo and whirlpooling in the treatment of canine pruritus – a double-blinded, randomized, placebo-controlled study. *Veterinary dermatology* 18(6): 427-431.
- Maeda S., Tsuchida H. and Marsella R. 2007. Allergen challenge decreases mRNA expression of regulatory cytokines in whole blood of high-IgE beagles. *Veterinary dermatology* 18(6): 422-426.
- Maeda S., Tsukui T., Saze K., Masuda K., Ohno K., Tsujimoto H. and Iwabuchi S. 2005. Production of a monoclonal antibody to canine thymus and activation-regulated chemokine (TARC) and detection of TARC in lesional skin from dogs with atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology* 103(1): 83-92.
- Maeda S., Okayama T., Omori K., Masuda K., Sakaguchi M., Ohno K. and Tsujimoto H. 2002. Expression of CC chemokine receptor 4 (CCR4) mRNA in canine atopic skin lesion. *Veterinary immunology and immunopathology* 90(3): 145-154.
- Maeda S., H. Tsuchida H., Shibata S., Kawakami T., Tsukui T., Ohba Y., Fukata T. and Kitagawa H. 2008. Expression analysis of CCL27 and CCL28 mRNA in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Journal of Veterinary Medical Science* 70(1): 51-55.

- Maeda S., Fujiwara S., Omori K., Kawano K., Kurata K., Masuda K., Ohno K. and Tsujimoto H. 2002. Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology* 88(1): 79-87.
- Marsella R., Nicklin C. and Lopez J. 2006. Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Veterinary dermatology* 17(5): 306-312.
- Marsella R. and Olivry T. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VII): mediators of cutaneous inflammation. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3-4): 205-213.
- Marsella R., Nicklin C., Saglio S. and Lopez J. 2004. Investigation on the clinical efficacy and safety of 0.1% tacrolimus ointment (Protopic®) in canine atopic dermatitis: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, cross-over study. *Veterinary dermatology* 15(5): 294-303.
- Marsella R., Hillier A. and Olivry T. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIII): are essential fatty acids effective? *Veterinary immunology and immunopathology* 81:347-362.
- Marsella R. 2009. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG for the prevention of atopic dermatitis in dogs. *American Journal of Veterinary Research* 70(6): 735-740.
- Marsella R. and Nicklin C.F. 2002. Investigation on the use of 0.3% tacrolimus lotion for canine atopic dermatitis: a pilot study. *Veterinary dermatology* 13(4): 203-210.
- Marsella R., Santoro D. and Ahrens K. 2012. Early exposure to probiotics in a canine model of atopic dermatitis has long-term clinical and immunological effects. *Veterinary immunology and immunopathology* 146(2): 185-189.
- Marsella R., Olivry T. and Carlotti D. 2011. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 22(3): 239-248.
- Marsella R., Olivry T. and Maeda S. 2006 (a). Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles. *Veterinary dermatology* 17(2): 111-120.

- Marsella R., Santoro D., Ahrens K. and Thomas A. 2013. Investigation of the effect of probiotic exposure on filaggrin expression in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 24(2): 260-e57.
- Marsella R., Olivry T., Nicklin C. and Lopez J. 2006 (b). Pilot investigation of a model for canine atopic dermatitis: environmental house dust mite challenge of high-IgE-producing beagles, mite hypersensitive dogs with atopic dermatitis and normal dogs. *Veterinary dermatology* 17(1): 24-35.
- Marsella R., Sousa C.A., Gonzales A.J. and Fadok V.A. 2012. Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 241(2): 194-207.
- Marsella R. and Girolomoni G. 2009. Canine Models of Atopic Dermatitis: A Useful Tool with Untapped Potential. *Journal of investigative dermatology* 129(10): 2351.
- Marsella R., 2004(a). Dermatite atopica nel cane: Epidemiologia, aspetti genetici, patogenesi (teorie del passato). *Quaderni di dermatologia* 1: 7-8.
- Marsella R., 2004(b). Dermatite atopica nel cane: Nuove teorie eziopatogenetiche. *Quaderni di dermatologia* 1: 9-10
- McGavin M.D. and Zachary J.F. 2008. *Patologia veterinaria sistematica*. S.l.: Elsevier Health Sciences Italy.
- Meury S., Molitor V., Doherr M.G., Roosje P., Leeb T., Hobi S., Wilhelm S. and Favrot C. 2011. Role of the environment in the development of canine atopic dermatitis in Labrador and golden retrievers. *Veterinary dermatology* 22(4): 327-334.
- Michels G.M., Ramsey D.S., Walsh K.F., Martinon O.M., Mahabir S.P., Hoevers J.D., Walters R.R. and Dunham S.A. 2016. A blinded, randomized, placebo-controlled, dose determination trial of lokivetmab (ZTS-00103289), a caninized, anti-canine IL-31 monoclonal antibody in client owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*.
- Miller W.H., Griffin C.E. and Campbell K.L. 2013. *Muller and Kirk's Small Animal Dermatology (7th Edition)*. Elsevier Health Sciences.

- Mizuno T., Kanbayashi S., Okawa T., Maeda S. and Okuda M. 2009. Molecular cloning of canine interleukin-31 and its expression in various tissues. *Veterinary immunology and immunopathology* 131(1): 140-143.
- Monti P., Mercalli A., Leone B.E., Allavena P. and Piemonti L. 2003. Rapamycin impairs antigen uptake of human dendritic cells<sup>1</sup>. *Transplantation* 75(1): 137-145.
- Morelli L. and Capurso L. 2012. FAO/WHO guidelines on probiotics: 10 years later. *Journal of clinical gastroenterology* 46 SupplS1-S2.
- Mouatt J. 2002. Cyclosporin and ketoconazole interaction for treatment of perianal fistulas in the dog. *Australian Veterinary Journal* 80(4): 207-211.
- Mueller R.S., Burrows A. and Tsohalis J. 1999. Comparison of intradermal testing and serum testing for allergen-specific IgE using monoclonal IgE antibodies in 84 atopic dogs. *Australian Veterinary Journal* 77(5): 290-294.
- Mueller R., Veir J., Fieseler K. and Dow S. 2005. Use of immunostimulatory liposome-nucleic acid complexes in allergen-specific immunotherapy of dogs with refractory atopic dermatitis - a pilot study. *Veterinary dermatology* 16(1): 61-68.
- Mueller R. 1998. Evaluation of serum allergen-specific IgE for the diagnosis of food adverse reactions in the dog. *Veterinary dermatology* 9(3): 167-171.
- Naeyaert J.M., Lachapelle J.M., Degreef H., de la Brassinne M., Heenen M. and Lambert J. 1999. Cyclosporin in atopic dermatitis: review of the literature and outline of a Belgian consensus. *Dermatology (Basel, Switzerland)* 198(2): 145-152.
- Nam E., Park S., Jung J., Han S., Youn H., Chae J. and Hwang C. 2012. Evaluation of the effect of a 0.0584% hydrocortisone aceponate spray on clinical signs and skin barrier function in dogs with atopic dermatitis. *Journal of veterinary science* 13(2): 187-191.
- Navarro C., Séguy L., Vila M. and Birckel P. 2016. Bioequivalence study between two formulations of ciclosporin A (Cyclavance® oral solution and Atopica® soft capsules) following a single oral administration to dogs. *BMC veterinary research* 12(1): 1.

- Nghiem P., Pearson G. and Langley R.G. 2002. Tacrolimus and pimecrolimus: from clever prokaryotes to inhibiting calcineurin and treating atopic dermatitis. *Journal of the American Academy of Dermatology* 46(2): 228-241.
- Niggemann B., Jacobsen L., Dreborg S., Ferdousi H.A., Halken S., Høst A., Koivikko A., Koller D., Norberg L. and Urbanek R. 2006. Five-year follow-up on the PAT study: specific immunotherapy and long-term prevention of asthma in children. *Allergy* 61(7): 855-859.
- Nobbe S., Dziunycz P., Mühleisen B., Bilsborough J., Dillon S.R., French L.E. and Hofbauer G.F. 2012. IL-31 expression by inflammatory cells is preferentially elevated in atopic dermatitis. *Acta Dermato-Venereologica* 92(1): 24-28.
- Nødtvedt A., Egenvall A., Bergvall K. and Hedhammar Å. 2006. Incidence of and risk factors for atopic dermatitis in a Swedish population of insured dogs. *Veterinary Record: Journal of the British Veterinary Association* 159(8).
- Noon L. 1911. Prophylactic inoculation against hay fever. *The Lancet* 177(4580): 1572-1573.
- Nuttall T. 2013. The genomics revolution: will canine atopic dermatitis be predictable and preventable? *Veterinary dermatology* 24(1): 10-e4.
- Nuttall T., Knight P., McAleese S., Lamb J. and Hill P. 2002. Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy* 32(5): 789-795.
- Nuttall T., Knight P., McAleese S., Lamb J. and Hill P. 2002. T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology* 87(3-4): 379-384.
- Olivry T., Dean G., Tompkins M., Dow J. and Moore P. 1999. Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Experimental dermatology* 8(3): 204-211.
- Olivry T. and Saridomichelakis M. 2013. Evidence-based guidelines for anti-allergic drug withdrawal times before allergen-specific intradermal and IgE serological tests in dogs. *Veterinary dermatology* 24(2): 225-e49.

- Olivry T. and Hill P.B. 2001(a). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVIII): histopathology of skin lesions. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 305-309.
- Olivry, T. and Hill P.B. 2001(b). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IX): the controversy surrounding the route of allergen challenge in canine atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 219-225
- Olivry T., Guaguere E. and Heripret D.1997 (a). Treatment of canine atopic dermatitis with misoprostol, a prostaglandin E1 analogue: an open study. *Journal of Dermatological Treatment* 8(4): 243-247.
- Olivry T., Naydan D.K. and Moore P.F. 1997 (b). Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *The American Journal of Dermatopathology* 19(5): 477-486.
- Olivry T., Saridomichelakis M., Nuttall T., Bensignor E., Griffin C. and Hill P. 2014. Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary dermatology* 25(2): 77-e25.
- Olivry T., Marsella R., Iwasaki T., Mueller R. and The International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. 2007. Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 18(2): 78-86.
- Olivry T., Rivierre C., Jackson H., Murphy K.M., Davidson G. and Sousa C. 2002. Cyclosporine decreases skin lesions and pruritus in dogs with atopic dermatitis: a blinded randomized prednisolone-controlled trial\*. *Veterinary dermatology* 13(2): 77-87.
- Olivry T., DeBoer D., Favrot C., Jackson H., Mueller R., Nuttall T., Prelaud P. and The International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. 2010. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. 2010 (b) *Veterinary dermatology* 21(3): 233-248.
- Olivry T., DeBoer D., Favrot C., Jackson H., Mueller R., Nuttall T., Prelaud P. and The International Task Force on Canine Atopic Dermatitis 2015. Treatment of canine atopic dermatitis: 2015 updated guidelines from the International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). *BMC Veterinary Research* 11(1).

- Olivry T. and Sousa C. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIX): general principles of therapy. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 311-316.
- Ormerod A. 2005. Topical tacrolimus and pimecrolimus and the risk of cancer: how much cause for concern? *British Journal of Dermatology* 153(4): 701-705.
- Park S., Ohya F., Yamashita K., Nishifuji K. and Iwasaki T. 2000. Comparison of Response to Immunotherapy by Intradermal Skin Test and Antigen-Specific IgE in Canine Atopy. *Journal of Veterinary Medical Science* 62(9): 983-988.
- Pajno G. B., Caminiti L., Vita D., Barberio G., Salzano G., Lombardo F., Canonica G.W. and Passalacqua G. 2007. Sublingual immunotherapy in mite-sensitized children with atopic dermatitis: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of allergy and clinical immunology* 120(1): 164-170.
- Pelucchi C., Galeone C., Bach J., La Vecchia C. and Chatenoud L. 2013. Pet exposure and risk of atopic dermatitis at the pediatric age: a meta-analysis of birth cohort studies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132(3): 616-622. e7.
- Picco F., Zini E., Nett C., Naegeli C., Bigler B., Rüfenacht S., Roosje P., Gutzwiller M.E.R., Wilhelm S., Pfister J., Meng E. and Favrot C. 2008. A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Veterinary dermatology* 19(3): 150-155.
- Piekutowska A., Pin D., Rème C., Gatto H. and Haftek M. 2008. Effects of a topically applied preparation of epidermal lipids on the stratum corneum barrier of atopic dogs. *Journal of comparative pathology* 138(4): 197-203.
- Pinheiro D., Singh Y., Grant C., Appleton R., Sacchini F., Walker K.R.L., Chadbourne A., Palmer C., Chan E.A., Thompson I., Williamson L., Cunningham F. and Garden O. 2010. Phenotypic and functional characterization of a CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> FOXP3<sup>high</sup> regulatory T-cell population in the dog. *Immunology* 132(1): 111-122.
- Plant J., Gortel K., Kovalik M., Polissar N. and Neradilek M. 2012. Development and validation of the Canine Atopic Dermatitis Lesion Index, a scale for the rapid scoring of lesion severity in canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 23(6): 515-e103.

- Poli G., Cocilovo A., Dall'Ara P., Martino P.A. and Ponti W. 2005. *Microbiologia e immunologia veterinaria*.
- Prélaud P., Guaguere E., Alhaidari Z., Faivre N., Heripret D. and Gayerie A. 1998. Reevaluation of diagnostic criteria of canine atopic dermatitis. *Revue de Medecine Veterinaire (France)*.
- Prescott S. and Björkstén B. 2007. Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 120(2): 255-262.
- Pucheu-Haston C., Bizikova P., Marsella R., Santoro D., Nuttall T. and Eisenschenk M.N.C. 2015. Review: Lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1-T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 26(2): 124-e32.
- Pucheu-Haston C. M., Shuster D., Olivry T., Brianceau P., Lockwood P., McClanahan T., Waal Malefyt R., Mattson J.D. and Hammerberg B. 2006. A canine model of cutaneous late-phase reactions: prednisolone inhibition of cellular and cytokine responses. *Immunology* 117(2): 177-187.
- Raap U., Weißmantel S., Gehring M., Eisenberg A., Kapp A. and Fölster Holst R. 2012. IL-31 significantly correlates with disease activity and Th2 cytokine levels in children with atopic dermatitis. *Pediatric allergy and immunology* 23(3): 285-288.
- Radowicz S. and Power H. 2003. Long-term use of cyclosporin therapy in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 14(4): 234.
- Rather I., Bajpai V., Kumar S., Lim J., Paek W. and Park Y. 2016. Probiotics and Atopic Dermatitis: An Overview. *Frontiers in microbiology* 7.
- Rosenfeldt V., Benfeldt E., Nielsen S., Michaelsen K., Jeppesen D., Valerius N. and Paerregaard A. 2003. Effect of probiotic Lactobacillus strains in children with atopic dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 111(2): 389-395.
- Rosenkrantz W., Griffin C. and Barr R. 1989. Clinical evaluation of cyclosporine in animal models with cutaneous immune-mediated disease and epitheliotropic lymphoma. *The Journal of the American Animal Hospital Association (USA)*.
- Rosser E.J. 1998. Advances in the diagnosis and treatment of atopy. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 29(6): 1437-1447.

- Roudebush P., Bloom P. and Jewell D. 1997. Consumption of essential fatty acids in selected commercial dog foods compared to dietary supplementation. In *Proceedings. AAVD/ACVD*.
- Ruehl W., Nizet V., Blum J., Kilduff T., Hill J., Fajardo L. and Hamm T. 1987. Generalized papillomatosis in narcoleptic dogs treated with cyclosporine-A. In *Laboratory Animal Science*, 518-519. AMER ASSOC LABORATORY ANIMAL SCIENCE 70 TIMBERCREEK DR, SUITE 5, CORDOVA, TN 38018.
- Ryffel B., Donatsch P., Madörin M., Matter B., Rüttimann G., Schön H., Stoll R. and Wilson J. 1983. Toxicological evaluation of cyclosporin A. *Archives of Toxicology* 53(2): 107-141.
- Saevik B.K., Bergvall K., Holm B.R., Saijonmaa-Koulumies L.E., Hedhammar Å., Larsen S. and Kristense F. 2004. A randomized, controlled study to evaluate the steroid sparing effect of essential fatty acid supplementation in the treatment of canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 15(3): 137-145.
- Sae-Wong C., Mizutani N., Kangsanant S. and Yoshino S. 2015. Topical skin treatment with Fab fragments of an allergen-specific IgG1 monoclonal antibody suppresses allergen-induced atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *European journal of pharmacology* 779:131-137.
- Salek M., Finlay A.Y., Luscombe D.K., Allen B., Berth-Jones J., Camp R., Graham – Brown R., Khan G., Marks R. and Motley R. 1993. Cyclosporin greatly improves the quality of life of adults with severe atopic dermatitis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *British Journal of Dermatology* 129(4): 422-430.
- Santoro D., Marsella R., Pucheu-Haston C., Eisenschenk M.N.C., Nuttall T. and Bizikova P. 2015. Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host-micro-organism interaction. *Veterinary dermatology* 26(2): 84-e25.
- Saridomichelakis M. and Olivry T. 2015. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *The veterinary journal* 207:29-37.
- Schlotter Y., Rutten V.P.M.G., Riemers F., Knol E. and Willemse T. 2011. Lesional skin in atopic dogs shows a mixed Type-1 and Type-2 immune responsiveness. *Veterinary immunology and immunopathology* 143(1-2): 20-26.

- Schmidt V., McEwan N., Volk A., Helps J., Morrell K. and Nuttall T. 2010. The glucocorticoid sparing efficacy of Phytopica TM in the management of canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 21(1): 97-105.
- Schnelle G., 1933. Eczema in dogs—an allergy. *North Am Vet* 1437-44.
- Schroder K., Hertzog P., Ravasi T. and Hume D. 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *Journal of leukocyte biology* 75(2): 163-189.
- Schwartz R.H. 1996. Models of T cell anergy: is there a common molecular mechanism? *The Journal of experimental medicine* 184(1): 1-8.
- Schwartzman R.M. and Rockey J.H. 1965. Atopy in the dog. *Archives of Dermatology* 96(4): 418-422.
- Scott D. 1981. Observations on canine atopy. *The Journal of the American Animal Hospital Association (USA)*.
- Secrist H., Chelen C.J., Wen Y., Marshall J.D. and Umetsu D.T. 1993. Allergen immunotherapy decreases interleukin 4 production in CD4+ T cells from allergic individuals. *The Journal of experimental medicine* 178(6): 2123-2130.
- Seibel W., Sundberg J.P., Lesko L.J., Sauk J.J., McCleary L.B. and Hassell T.M. 1989. Cutaneous papillomatous hyperplasia in cyclosporine-A treated beagles. *Journal of Investigative Dermatology* 93(2): 224-230.
- Shaikh W. 1997. Immunotherapy vs inhaled budesonide in bronchial asthma: an open, parallel, comparative trial. *Clinical & Experimental Allergy* 27(11): 1279-1284.
- Shida M., Kadoya M., Park S., Momoi Y., Iwasaki T. and Nishifuji K. 2004. Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology* 102(1-2): 19-31.
- Shohani M., Shohani N., Azizian R. and Khosravi A. 2013. The Impact of Probiotics and Prebiotics on Serum Levels of Allergy Associated Th1 and Th2 Cytokines. *Journal of pure & applied microbiology* 7(3): 1821-1830.

- Simpson A., Maeda S. and Marsella R. 2009. Temporal Dynamic Changes of Phenotypic Expression of Peripheral CD4 Cells during Environmental Allergen Challenge in an Experimental Model of Canine Atopic Dermatitis: A Pilot Study. *Journal of Veterinary Medical Science* 71(9): 1177-1181.
- Sousa C.A. and Marsella R. 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetic factors. *Veterinary immunology and immunopathology* 81(3): 153-157.
- Steffan J., Fisch R., Prelaud P., Guaguere E., Fontaine J., Carlotti D., European V., Amer V. and Olivry T. 2002. Randomized controlled trial of the efficacy of cyclosporine in the treatment of atopic dermatitis in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 221(3): 370-377.
- Steffan J., Favrot C. and Mueller R. 2006. A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of cyclosporin for the treatment of atopic dermatitis in dogs. *Veterinary dermatology* 17(1): 3-16.
- Tatsuno K., Fujiyama T., Yamaguchi H. and Tokura Y. 2016. TSLP and IL-4 interact to promote mutual receptor expression on CD4 T cells in atopic dermatitis. *Journal of dermatological science* 84(1): e158.
- Terada Y., Nagata M., Murayama N., Nanko H. and Furue M. 2011. Clinical comparison of human and canine atopic dermatitis using human diagnostic criteria (Japanese Dermatological Association, 2009): proposal of provisional diagnostic criteria for canine atopic dermatitis. *The Journal of dermatology* 38(8): 784-790.
- Tokura Y. 2010. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *Journal of dermatological science* 58(1): 1-7.
- Torii S., Torii A., Itoh K., Urisu A., Terada A., Fujisawa T., Yamada K., Suzuki H., Ishida Y., Nakamura F., Kanzato H., Sawada D., Nonaka A., Hatanaka M. and Fujiwara S. 2011. Effects of oral administration of *Lactobacillus acidophilus* L-92 on the symptoms and serum markers of atopic dermatitis in children. *International archives of allergy and immunology* 154(3): 236-245.
- Vitaliti G., Pavone P., Guglielmo F., Spataro G. and Falsaperla R. 2014. The immunomodulatory effect of probiotics beyond atopy: an update. *The Journal of asthma* 51(3): 320-332.

- Walters R., Boucher JP, Paquette JA et al. 2015. Laboratory dose titration efficacy study of ZTS-00103289, a caninized anti-IL-31 monoclonal antibody, in a canine model of IL-31-induced pruritus. *Veterinary dermatology* 26:145.
- Watson A.L., Fray T.R., Bailey J., Baker C.B., Beyer S.A. and Markwell P.J. 2006. Dietary constituents are able to play a beneficial role in canine epidermal barrier function. *Experimental dermatology* 15(1): 74-81.
- Wilhem S., Kovalik M. and Favrot C. 2011. Breed-associated phenotypes in canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology* 22(2): 143-149.
- Willemse T. 1994. Hyposensitization of dogs with atopic dermatitis based on the results of in vivo and in vitro (IgGd ELISA) diagnostic tests. In *Proceedings of the Annual Meeting of the American Academy of Veterinary Dermatology and American College of Veterinary Dermatology, Charleston, SC*, 61.
- Willemse T. 1986. Atopic skin disease: a review and a reconsideration of diagnostic criteria. *Journal of small animal practice*.
- Wittich F. 1941. Spontaneous allergy (atopy) in the lower animal: seasonal hay fever (fall type) in a dog. *Journal of Allergy* 12(3): 247-251.
- Wolkerstorfer A., De Waard van der Spek FB., Glazenburg E., Mulder P. and Oranje A. 1999. Scoring the severity of atopic dermatitis: three item severity score as a rough system for daily practice and as a pre-screening tool for studies. *Acta dermatovenereologica-Stockholm*-79356-359.
- Wood S.H., Clements D.N., Ollier W.E., Nuttall T., McEwan N.A. and Carter S.D. 2009. Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores. *Journal of dermatological science* 55(1): 27-33.
- Yasukawa K., Kubo T., Shibasaki Y., Yamaoka K., Hachimura H., Kuyama T., Amimoto A., Kumata T., Kitahara Y., Takenaka M., Matsumura H., Uno T., Uchino T., Takehara K., Nishida K., Kadoya M., Sato M., Kato K., Matsumoto K., Saito S. and Shimoda T. 2010. Low-dose recombinant canine interferon- $\gamma$  for treatment of canine atopic dermatitis: An open randomized comparative trial of two doses. *Veterinary dermatology* 21(1): 42-49.

Zhang Q., Putheti P., Zhou Q., Liu Q. and Gao W. 2008. Structures and biological functions of IL-31 and IL-31 receptors. *Cytokine & growth factor reviews* 19(5): 347-356.

Zur G., Ihrke P.J., White S.D. and Kass P.H. 2002. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992–1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Veterinary dermatology* 13(2): 89-102.