



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

L'IMPORTANZA DELLA BARRIERA CUTANEA NELLA
PATOGENESI DELLA DERMATITE ATOPICA CANINA.
RECENTI ACQUISIZIONI E PROSPETTIVE TERAPEUTICHE

Relatore: Dott.ssa Helen Poser

Correlatore: Dott. Michele Berlanda

Laureanda: Laura Berto

Matricola n. 592989

ANNO ACCADEMICO 2014 – 2015

Sommario

INTRODUZIONE	1
1 ANATOMIA DELLA CUTE	3
1.1 STRUTTURA DEL DERMA.....	4
1.2 STRUTTURA DELL'EPIDERMIDE	5
1.2.1 Strato basale	5
1.2.2 Strato spinoso	5
1.2.3 Strato granuloso.....	6
1.2.4 Strato lucido.....	6
1.2.5 Strato corneo	6
2 STRUTTURA E FUNZIONE DELLA BARRIERA CUTANEA.....	9
2.1 PROTEINE STRUTTURALI	11
2.1.1 Proteine dei filamenti intermedi.....	11
2.1.2 Filaggrina e proteine correlate.....	11
2.1.3 Proteine dell'envelope corneo.....	15
2.2 PROTEINE FUNZIONALI DELLO STRATO CORNEO	18
2.2.1 Proteine correlate alla desquamazione.	18
2.3 LIPIDI DELLO STRATO CORNEO	21
2.3.1 Ceramidi.....	21
2.3.2 Colesterolo.....	26
2.3.3 Acidi grassi	27
2.4 ASSEMBLAGGIO DELL'ENVELOPE CORNEO.....	29
3 DERMATITE ATOPICA NEL CANE	33
3.1 EZIOPATOGENESI	34
3.2 SINTOMATOLOGIA CLINICA	40

3.3 DIAGNOSI	44
3.4 INDICI PER LA DETERMINAZIONE DELLA GRAVITÀ DELLA MALATTIA	49
3.5 TERAPIA.....	54
4 ALTERAZIONI MORFOLOGICHE E FUNZIONALI DELLA BARRIERA CUTANEA	59
4.1 METODI PER LA VALUTAZIONE DELL'INTEGRITÀ DELLA BARRIERA CUTANEA.....	60
4.2 ALTERAZIONI DELLE PROTEINE DELLO STRATO CORNEO.....	66
4.2.1 Alterazioni nelle proteine strutturali	66
4.2.2 Alterazioni nelle proteine funzionali.....	73
4.3 ALTERAZIONE DEI LIPIDI DELLO STRATO CORNEO	77
4.3.1 Alterazioni nei corpi lamellari e nelle lamelle lipidiche	77
4.3.2 Alterazioni nella composizione lipidica dello strato corneo	80
5 APPROCCI TERAPEUTICI PER IL RIPRISTINO DELLA BARRIERA CUTANEA.....	87
5.1 TERAPIE TOPICHE	87
5.2 TERAPIA ORALE	97
CONCLUSIONI	103
BIBLIOGRAFIA	105

ELENCO DELLE ABBREVIAZIONI

ABCA12	ATP-binding Cassette Subfamily A Member 12
AD	Atopic Dermatitis
ASIT	Allergen-specific Immunotherapy
CADESI	Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index
CE	Cornified Envelope
CER	Ceramide
CerS	Ceramide Synthases
CDSN	Corneodesmosin
DLA	Dog Leucocyte Antigen
DSC	Desmocollins
DSG	Desmogleins
EDC	Epidermal Differentiation Complex
EFA	Essential Fatty Acid
ELOVL	Elongation of Very Long Chain Fatty Acid
FAS	Apoptosis Stimulating Fragment
FATP4	Fatty Acid Transport Protein 4
FLG	Filaggrin
GlcCer	Glucosylceramide
HDM	House dust mites
HPTLC	High Performance Thin-Layer Chromatography
IFN- γ	Interferone- γ
IL	Interleukin
JAK	Janus-Kinases
KLK	Kallikrein
KRT	Keratin

LB	Lamellar Bodies
LEKTI	Lympho-epithelial Kazal-type-related Inhibitor
MCC	Mast Cell Chymase
NHE1	Sodium/Hydrogen Exchanger 1
NMF	Natural Moisturizing Factor
PAR-2	Protease Activator Receptor 2
PCA	Pyrrolidone Carboxylic Acid
PICAD	Pruritus Index for Canine Atopic Dermatitis
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acid
rFeIFN- ω	Recombinant Feline Interferon-omega
S1P	Sphingosine-1-phosphate
SCORAD	Scoring Atopic Dermatitis
SGPL1	Sphingosine-1-phosphate lyase
SM-deacylase	Sphingomyelin Deacylase
SP	Serine Protease
SPINK5	Serine Protease Inhibitor Kazal-type 5
SPRs	Small Proline Rich Proteins
TEWL	Trans-Epidermal Water Loss
TGase	Transglutaminase
TGF- β	Transforming Growth Factor- β
TNF	Tumor Necrosis Factors
UA	Arbitrary Unit
UCA	Urocanic Acid

INTRODUZIONE

La dermatite atopica è una delle malattie di natura allergica a più alta incidenza tra le patologie dermatologiche che interessano la popolazione canina (Hillier and Griffin, 2001). È una malattia multifattoriale derivante da una complessa interazione tra fattori ambientali e genetici; spesso fonte di notevoli frustrazioni sia per il medico veterinario sia per il proprietario dell'animale, a causa del lungo iter diagnostico e della complessa gestione terapeutica in termini di tempo e costi. Inoltre, la comparsa generalmente precoce dei sintomi, che tendono a protrarsi per tutta la vita, può condizionare notevolmente la qualità della vita dell'animale. Al giorno d'oggi, sono disponibili varie opzioni terapeutiche in grado di controllare i sintomi ma ognuna di queste presenta diversi svantaggi e possibili effetti collaterali (Olivry et al., 2010a). Per queste ragioni è importante continuare ad indagare per acquisire maggiori conoscenze sui complessi meccanismi eziopatogenetici e per poter sviluppare interventi terapeutici innovativi e sempre più efficaci.

Nel corso degli ultimi anni, le nozioni riguardo la patogenesi della dermatite atopica sono state ampliate in modo sostanziale, sia per quanto riguarda i meccanismi coinvolti primariamente nella malattia sia riguardo al ruolo dei cofattori secondari e queste nuove scoperte hanno influenzato notevolmente l'attuale approccio alla diagnosi e al trattamento della dermatite atopica (Marsella et al., 2012). In particolare, nella medicina umana, è sempre più evidente che nella barriera cutanea dei soggetti affetti da dermatite atopica sono presenti difetti sia strutturali che funzionali che portano ad una maggiore penetrazione degli allergeni (Levin et al., 2013a). Molto meno si sa attualmente in medicina veterinaria, ma le prime evidenze sembrano confermare l'importante ruolo della barriera cutanea anche nella dermatite atopica canina viste le molteplici somiglianze cliniche ed immunologiche con la sua controparte umana (Santoro et al., 2015).

Sulla base di queste evidenze sono state sviluppate dall'industria farmaceutica nuove specialità mirate al "ripristino" della barriera cutanea la cui efficacia è attualmente oggetto di interesse da parte dei ricercatori (Blaskovic et al., 2014; Glos et al., 2008; Mueller et al., 2004; Piekutowska et al., 2008; Popa et al., 2012).

Lo scopo della presente tesi è quello di fare una revisione della letteratura scientifica inerente le recenti acquisizioni sul ruolo fisiopatologico della barriera cutanea nella dermatite atopica canina e sull'efficacia delle terapie mirate al ripristino della sua funzione.

1 ANATOMIA DELLA CUTE

La cute costituisce la barriera anatomica e fisiologica tra l'animale e l'ambiente e rappresenta l'organo più esteso e visibile del corpo. È un organo complesso, costituito da 3 strati diversi per origine embrionale, struttura e funzione: l'epidermide, il derma e in alcune zone l'ipoderma (sottocute) (Miller et al., 2013).

Svolge numerose funzioni tra cui:

- barriera efficace nel prevenire la perdita di acqua, elettroliti e macromolecole;
- protezione meccanica dai danni di tipo chimico, fisico e microbiologico;
- conferisce elasticità permettendo il movimento;
- produzione di annessi come peli ed unghie;
- organo di senso per la percezione della temperatura, della pressione, del dolore e del prurito;
- termoregolazione;
- stoccaggio di vitamine, elettroliti, acqua, grasso, carboidrati e proteine;
- immunosorveglianza nel prevenire lo sviluppo di infezioni;
- attività antibatterica e antifungina;
- produzione della vitamina D;
- produzione di pigmenti necessari a prevenire i danni arrecati dalle radiazioni solari;
- secrezione ed escrezione di numerose sostanze;
- organo importante anche per l'identità fisica e sessuale, e come indicatore dello stato di salute generale (Paterson, 2008).

1.1 STRUTTURA DEL DERMA

Il derma è costituito da fibre collagene ed elastiche, dalle cellule che le producono (fibrociti) e da una matrice mucopolisaccaridica che sostiene fibre, annessi, vasi e nervi. Le fibre collagene, più lasse in superficie e più dense in profondità, forniscono resistenza alla trazione, ed evitano le lacerazioni. Le fibre elastiche permettono invece alla cute di tornare alla sua posizione originale dopo trazione o movimento, soprattutto in corrispondenza delle articolazioni o prominenze ossee. La matrice mucopolisaccaridica costituisce un efficace cuscinetto protettivo e rappresenta un'importante riserva di acqua e di elettroliti. All'interno della matrice si muovono cellule, quali fibrociti e cellule infiammatorie.

I vasi cutanei sono organizzati in tre plessi: quello superficiale porta nutrimento all'epidermide, quello medio all'istmo follicolare e alle ghiandole sebacee e quello profondo ai bulbi e alle ghiandole apocrine.

I nervi seguono per lo più il decorso dei vasi. Numerose strutture percettive, in stretto rapporto con i nervi, veicolano le sensazioni di dolore, prurito, tatto, pressione e movimento. Queste sono i peli tattili (vibrisse), i corpuscoli di Pacini (meccanocettori presenti specialmente nei cuscinetti plantari), le terminazioni libere nell'epidermide (dolore e prurito) o associate a cellule di Merkel (pressione), e altri corpuscoli la cui distribuzione dipende dalla specie e dalla localizzazione del corpo.

Infine, nel derma sono alloggiati anche i muscoli erettori del pelo, ancorati al follicolo pilifero nel segmento inferiore dell'istmo, i quali, contraendosi, permettono l'orripilazione (Noli and Toma, 2011).

1.2 STRUTTURA DELL'EPIDERMIDE

Lo strato esterno della cute, o epidermide, è composto da più strati di cellule definite in base alla posizione, alla forma, alla morfologia, e allo stato di differenziazione dei cheratinociti. L'epidermide viene così suddivisa, dalla base verso la superficie, in strato basale (*stratum basale*), strato spinoso (*stratum spinosum*), strato granuloso (*stratum granulosum*), strato lucido (*stratum lucidum*), e strato corneo (*stratum corneum*); costituiti da quattro tipi cellulari distinti: cheratinociti (≈85% delle cellule epidermiche), melanociti (≈5%), cellule di Langerhans (3-8%), e cellule di Merkel (≈2%) ma non è raro osservare anche alcuni linfociti.

L'epidermide non contiene vasi, il che significa che il nutrimento giunge dal circolo ematico del derma per diffusione (Miller et al., 2013).

1.2.1 Strato basale

Lo strato basale è formato da un unico strato di cellule colonnari o cubiche che poggiano sulla membrana basale (zona che separa l'epidermide dal derma) (Miller et al., 2013). La maggior parte di queste cellule sono cheratinociti che, mano a mano che proliferano e migrano verso la superficie, maturano sino a perdere completamente il nucleo trasformandosi in rigide squame cornee (corneociti) (Noli and Toma, 2011). Le cellule sono unite fra di loro, e alle cellule del soprastante strato spinoso, mediante desmosomi, e sono ancorate alla sottostante lamina basale mediante emidesmosomi (Dellmann and Eurell, 2012). Lo strato basale è il sito iniziale di produzione della cheratina (Paterson, 2008).

1.2.2 Strato spinoso

Lo strato successivo, procedendo verso la superficie, è lo strato spinoso. Nella cute ricoperta da peli ha uno spessore generalmente di 1-2 cellule di forma poliedrica. Nei cuscinetti plantari, nel piano nasale e a livello di giunzione mucocutanea ci possono essere invece fino a 20 strati di cellule, unite tra loro mediante desmosomi (Paterson, 2008).

I cheratinociti all'interno di questo strato sintetizzano dei granuli ricoperti da membrana chiamati corpi lamellari (LBs - *lamellar bodies*) contenenti i precursori dei lipidi dello strato corneo: glicoproteine, glicolipidi, fosfolipidi, glucosilceramidi, acidi grassi liberi, e un numero variabile di acidi grassi idrolizzati. Questi granuli

sono poi secreti nello spazio intercellulare dello strato granuloso, dove liberano i lipidi che svolgono un ruolo importante per la funzione di barriera della cute. Nello strato spinoso la cheratina viene prodotta in quantità maggiori e si distribuisce in filamenti, insieme ad altre proteine come actina e tubulina, per formare il citoscheletro della cellula (Miller et al., 2013; Paterson, 2008).

1.2.3 Strato granuloso

Lo strato granuloso non è sempre presente nella cute ricoperta dai peli e quando presente è composto da 1 o 2 lamine di cellule appiattite; nelle regioni sprovviste di peli è composto invece da 4-8 lamine. Le cellule di questo strato contengono granuli di cheratoialina, di forma irregolare e non delimitati da membrana, ricchi di proteine come profilaggrina, precursore della filaggrina, loricrina e involucrina. Queste proteine formano uno strato proteico denso ed altamente reticolato: l'envelope cheratinico protettivo, che circonda e lega i filamenti di cheratina.

I granuli lamellari migrano verso la periferia della cellula e liberano il loro contenuto, ricco in fosfolipidi e ceramidi, all'interno dello spazio intercellulare formando le lamelle lipidiche. A questo livello inizia inoltre la degenerazione del nucleo e degli organelli cellulari (Paterson, 2008).

1.2.4 Strato lucido

Lo strato lucido, o strato trasparente, è uno strato sottile e compatto di cellule morte anucleate completamente cheratinizzate. Differisce a livello istochimico dallo strato corneo in quanto c'è un numero più elevato di legami tra i residui aminoacidici di alcune proteine dell'envelope corneo e i lipidi che lo circondano. Lo strato lucido è maggiormente sviluppato nei cuscinetti plantari, meno sviluppato nel piano nasale ed è assente in tutte le aree di pelle normale (Miller et al., 2013).

1.2.5 Strato corneo

Lo strato corneo è lo strato più esterno dell'epidermide, formato da lamine di cellule morte completamente cheratinizzate (corneociti) che si distaccano continuamente e che si caratterizzano per essere eosinofile, appiattite ed anucleate (Dellmann and Eurell, 2012). La desquamazione graduale di tale strato è normalmente bilanciata dalla proliferazione delle cellule basali, che mantengono uno spessore epidermico

costante (Miller et al., 2013). I corneociti sono disposti in più strati, sospesi in una matrice lipidica extracellulare, spesso paragonati ad una serie di mattoncini (corneociti) legati con il cemento (lipidi). Nella cute con poco pelo o glabra gli strati sono più numerosi (Nemes and Steinert, 1999).

2 STRUTTURA E FUNZIONE DELLA BARRIERA CUTANEA

Una barriera cutanea intatta è fondamentale per evitare l'eccessiva perdita di acqua e la penetrazione di sostanze esogene dannose per l'organismo. Il maggior responsabile di questo ruolo protettivo è lo strato corneo (Olivry, 2011).

In passato, lo strato corneo veniva percepito come una sorta di “cimitero dei corneociti”, un inutile ammasso di detriti, originato dal disfacimento cui si riteneva le cellule andassero incontro, al termine del loro ciclo vitale, dopo aver esaurito ogni attività. Al contrario, oggi sappiamo che lo strato corneo rappresenta il prodotto finale di un lungo e articolato processo di maturazione. La necessità di interporre un bastione tra le asperità dell'habitat esterno e l'ambiente biochimico interno ha costretto l'evoluzione delle specie animali a “progettare” questa sofisticata formazione tissutale e ad approntare sistemi di monitoraggio, dispositivi d'allarme e meccanismi di riparazione per salvaguardarne l'integrità morfologica e funzionale (Terranova, 2006).

Lo strato corneo funge quindi da barriera principale contro la penetrazione percutanea di prodotti chimici e microbiologici; è in grado di sopportare elevate forze meccaniche, ed è inoltre coinvolto nella regolazione del rilascio di acqua dall'organismo, nota come “perdita di acqua transepidermica” (TEWL - *Transepidermal Water Loss*). I corneociti contengono, inoltre, una varietà di sostanze con funzione umettante e protettiva nei confronti dei raggi UV, che vengono sintetizzate dalle proteine e giocano un ruolo importante nella funzione protettiva della cute (Miller et al., 2013).

Al di sotto della membrana plasmatica dei corneociti troviamo una struttura altamente specializzata: l'envelope corneo (CE) (fig. 1). L'envelope corneo costituisce uno strato impermeabile che fornisce sostegno strutturale alla cellula e la rende capace di resistere ai microrganismi e agli agenti ambientali potenzialmente dannosi per l'intero organismo. La formazione dell'envelope corneo è associata all'aumento dell'attività calcio-dipendente delle transglutaminasi epidermiche o del

follicolo pilifero, le quali catalizzano il legame di alcuni precursori proteici solubili in grandi polimeri insolubili (Eckert et al., 2005; Miller et al., 2013).

Tra le proteine dell'envelope corneo abbiamo l'involucrina, che legandosi in modo covalente alle ceramidi (principale componente lipidica dello strato corneo), forma lo scheletro per l'attacco dei lipidi intracellulari (Miller et al., 2013).

I corneodesmosomi sono invece proteine che mediano l'adesione cellulare tra i corneociti. La degradazione dei corneodesmosomi, nella parte superiore dello strato corneo, è un passo fondamentale nel processo di desquamazione cutanea (Serre et al., 1991).

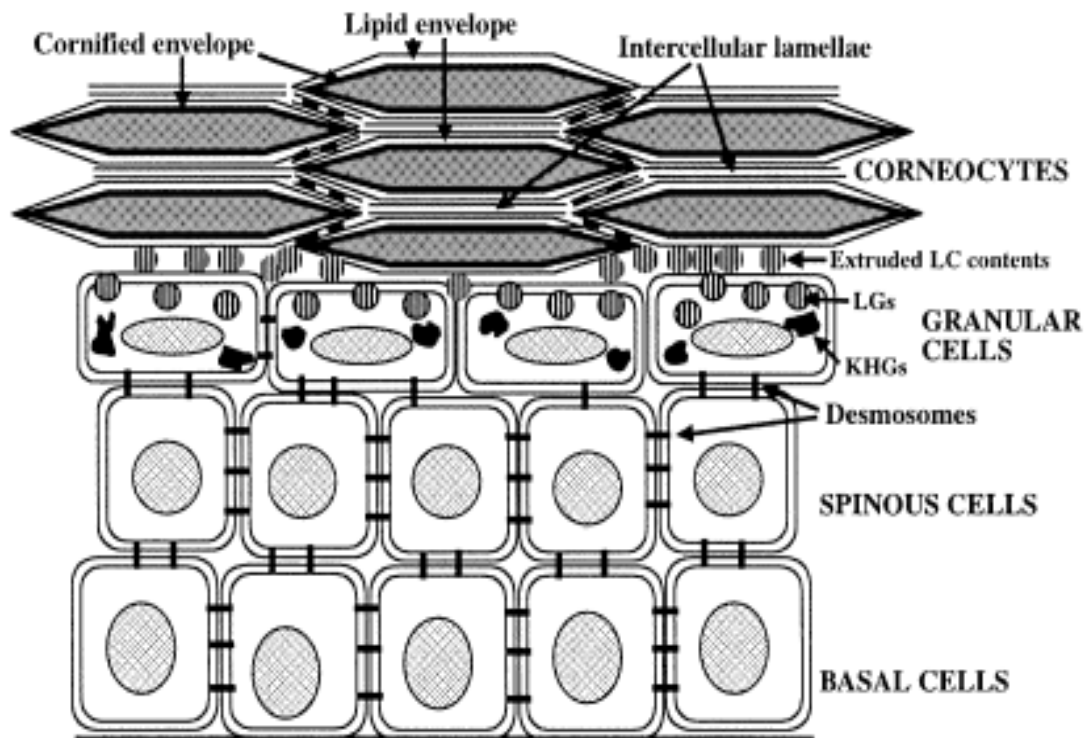


Figura 1. Rappresentazione schematica della differenziazione epidermica e delle strutture lipidiche. Si notano gli strati che caratterizzano l'epidermide, ed i cambiamenti morfologici cui vanno incontro le cellule durante il differenziamento epidermico. Durante la sua maturazione, il cheratinocita subisce l'attivazione o l'inibizione di geni specifici di ogni stadio differenziativo (Madison, 2003).

2.1 PROTEINE STRUTTURALI

2.1.1 Proteine dei filamenti intermedi

La cheratina (codificata da geni KRT) è una proteina strutturale fibrosa sintetizzata dalle cellule epiteliali, tra cui i cheratinociti. I monomeri di cheratina vengono assemblati in fasci per formare i filamenti intermedi, componenti del citoscheletro che terminano nei desmosomi per formare una rete citoplasmatica. Nell'epidermide dei mammiferi, cheratine di tipo I (acide) e cheratine di tipo II (neutro-basiche) sono legate con ponti disolfuro per formare eterodimeri. I vari tipi di cheratine specifiche si trovano maggiormente in alcuni strati dell'epidermide rispetto ad altri, ad esempio: cheratina 5 (K5) e cheratina 14 (K14) formano eterodimeri nei cheratinociti basali, cheratina 1 (K1) e cheratina 10 (K10) formano eterodimeri nei cheratinociti soprabasali, cheratina 2 (K2) è espressa nella strato granuloso (Shimizu, 2007).

Numerosi lavori condotti sui topi indicano che i diversi filamenti di cheratina sono fondamentali per l'integrità strutturale dei cheratinociti epidermici, e l'ablazione mirata di alcuni geni KRT provoca fragilità dell'epidermide (Nishifuji and Yoon, 2013). Ad esempio una mutazione puntiforme nel gene KRT2 (T500P) in topi con cute scura (DSK2), causa un alterato assemblaggio dei filamenti intermedi, anche se nella letteratura non sono state documentate anomalie nella funzione di barriera cutanea in relazione alla mutazione KRT2 (Fitch et al., 2003).

2.1.2 Filaggrina e proteine correlate

La profilaggrina, precursore proteico della filaggrina (termine che deriva da *filaggrin-aggregating protein*), è il principale costituente dei granuli cheratoialini nello strato granuloso. La profilaggrina (codificata dal gene FLG) è una grande proteina insolubile, altamente fosforilata, ricca di istidina, costituita da diverse unità di filaggrina che si ripetono (4 ripetizioni nel cane, 10-12 negli esseri umani), unite ai lati da due parziali unità di filaggrina e dai domini N- e C- terminale (Kanda et al., 2013). Negli esseri umani, ogni ripetizione di filaggrina consiste di 324 aminoacidi e mostra significative omologie; nel cane, invece, le ripetizioni sono più grandi e sono costituite da 549 aminoacidi, eccetto una più piccola di 507 aminoacidi (Kanda et al., 2013; Sandilands et al., 2009). La composizione degli aminoacidi che costituiscono

le ripetizioni è stata comparata con quella nei topi e negli esseri umani grazie a Kanda et al. (2013), e si è potuto constatare che la percentuale dei principali aminoacidi, come serina, glicina, arginina, glutammina ed istidina è stata conservata lungo l'evoluzione tra queste specie. Questi risultati permettono di ipotizzare che la composizione degli aminoacidi, piuttosto che la sequenza, giochi un ruolo molto importante per la funzione di questa proteina (Kanda et al., 2013).

Il dominio N-terminale è suddiviso a suo volta nei due sottodomini A e B. Il sottodominio A contiene due siti leganti il calcio, importante regolatore del processo che subisce la profilaggrina durante la differenziazione epidermica. Durante la divisione della profilaggrina nei monomeri di filaggrina i sottodomini A e B vengono scissi (Pearson et al., 2002). Il ruolo preciso del dominio C-terminale non è ancora stato chiarito ma si ritiene sia necessario per una corretta scissione della profilaggrina, in quanto soggetti umani la cui proteina risultava essere priva del dominio C-terminale a causa di mutazioni genetiche presentavano un'incapacità nel processare questa molecola (Regan et al., 2007).

La profilaggrina, dopo la sintesi, viene altamente fosforilata. Questo sembra prevenire una prematura associazione del precursore proteico con i filamenti intermedi di cheratina e, rendendola insolubile, ne facilita l'assemblamento nei granuli cheratoialini (Sandilands et al., 2009). I cambiamenti conformazionali che incorrono nella proteina fosforilata permettono di rendere inaccessibili i siti utilizzati poi dalle proteasi per scindere la molecola (Resing and Walsh, 1993). Durante la differenziazione dei cheratinociti, i granuli cheratoialini degranulano in risposta ad un aumento del livello di Ca^{2+} , e la profilaggrina viene defosforilata e proteolizzata in monomeri di filaggrina (fig. 2), al confine tra lo strato granuloso e quello corneo (Levin et al., 2013a). I monomeri di filaggrina si aggregano al citoscheletro costituito dai filamenti intermedi della cheratina in fasci stretti, favorendo il collasso della cellula e conferendole così la forma appiattita (Palmer et al., 2006).

La filaggrina, inoltre, è parte delle proteine che costituiscono l'envelope corneo (Eckert et al., 2005), e, grazie alla sua capacità di alterare la distribuzione dei filamenti di cheratina, gioca un ruolo importante nel facilitare il processo apoptotico della cellula (Presland et al., 2001).

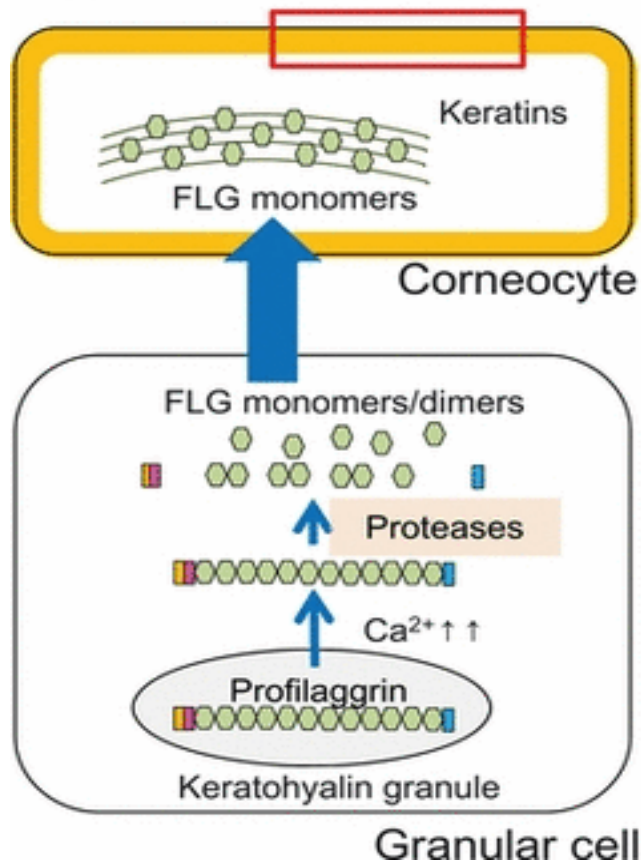


Figura 2. Rappresentazione schematica dell'attivazione della filaggrina e del suo legame con i filamenti di cheratina (Nishifuji and Yoon, 2013).

Nello strato corneo superiore, i monomeri di filaggrina vengono degradati, grazie all'attività di varie proteasi tra cui la caspasi 14, in aminoacidi liberi e peptidi idroscopici (ad esempio PCA - acido pirrolidone carbossilico e UCA - acido urocanico), che sono fattori idratanti naturali (NMFs – *natural moisturizing factors*) (Kezic et al., 2011). Topi con un deficit di caspase-14 mostrano una ridotta funzionalità della barriera cutanea ed un aumento della sensibilità verso le radiazioni UVB, questo è dovuto al fatto che, nonostante la profilaggrina venga correttamente scissa nelle unità di filaggrina, i frammenti poi si accumulano nella cute e non sono in grado di essere degradati per formare gli NMFs (Hoste et al., 2011). Questi, oltre che per un buon stato di idratazione della cute, sono fattori importanti per il mantenimento del pH acido e della capacità tamponante dello strato corneo, promuovono una corretta maturazione e desquamazione epidermica e inibiscono la

possibile colonizzazione della cute da parte di batteri patogeni (Elias and Schmuth, 2009).

Il ruolo della filaggrina nella funzione di barriera cutanea è stato studiato mediante l'uso di topi mutanti. Lo studio di topi che esibiscono la mutazione genetica spontanea *ft* (*flaky tail*) nel gene FLG, ha mostrato la comparsa spontanea di dermatite *atopic-like*, a causa dell'alterata espressione e conformazione della profilaggrina. Nei topi omozigoti *ft/ft* la profilaggrina è infatti presente con un peso molecolare più basso (220 kDa) rispetto al normale (>500 kDa) e non viene normalmente processata per formare gli intermedi proteici, causando l'assenza della filaggrina dallo strato corneo dei topi *ft/ft*. L'assenza della filaggrina, e dei peptidi igroscopici che da essa ne derivano, sono quindi ritenuti responsabili dell'alterato fenotipo di questi topi, che presentano cute secca ed una maggior desquamazione (Presland et al., 2000).

Nello studio di Kawasaki et al. (2012) sono stati generati dei topi completamente privi della profilaggrina e della filaggrina, attraverso l'ablazione mirata del gene per la filaggrina (*flg*^{-/-}). Questi topi hanno mostrato cute secca e aumento della desquamazione conseguente a stress meccanico. Lo studio di sezioni della cute tramite il microscopio confocale (un microscopio a fluorescenza), in seguito all'applicazione topica di una sostanza fluorescente, ha mostrato una maggior penetrazione di materiale estraneo nello strato corneo di topi *flg*^{-/-}. Infine si è visto che l'applicazione di sostanze irritanti, apteni ed antigeni di natura proteica induceva un'esagerata risposta umorale Th2 allergene-specifica predisponendo alla comparsa di ipersensibilità. In questi topi, l'idratazione dello strato corneo e il TEWL sono comunque normali, nonostante il livello di NMF sia diminuito (Kawasaki et al., 2012), questo probabilmente perché concorrono altri fattori al mantenimento della permeabilità e dell'idratazione cutanea oltre agli NMF, come per esempio l'organizzazione delle lamelle lipidiche intercellulari (Rawlings and Harding, 2004).

In sostanza, le funzioni più importanti della filaggrina sono tre: (1) allineare i filamenti intermedi di cheratina, (2) controllare il cambiamento morfologico delle cellule, (3) mantenere idratata l'epidermide.

2.1.3 Proteine dell'envelope corneo

L'envelope corneo è uno strato di proteine spesso circa 15 nm, che si trova sulla superficie interna della membrana plasmatica dei cheratinociti. L'envelope corneo è formato dall'assemblaggio di diversi precursori proteici, tra cui filaggrina, involucrina, loricrina, piccole proteine ricche di prolina, cistatina A, elafina, envoplachina, periplachina, cornifelina (fig. 3) (Miller et al., 2013).

L'involucrina è uno dei primi precursori che vengono utilizzati per la formazione dell'envelope, e sembra fornire l'impalcatura per l'assemblamento degli altri precursori (Nemes and Steinert, 1999). Il gene dell'involucrina è localizzato in un cluster genico, insieme ai geni di numerose altre proteine del CE, che formano il complesso di differenziamento epidermico (EDC), posto sul cromosoma 1q21 (Mischke et al., 1996). Analogamente ad altre proteine precursori dell'involucro corneo, l'involucrina è costituita da sequenze aminoacidiche ripetute, che hanno subito riarrangiamenti notevoli durante l'evoluzione. L'involucrina è composta da una base di dieci aminoacidi ripetuta 37 volte. Ciascuna ripetizione contiene tre residui glutamminici e due glutammati che fungono da substrato per le transglutaminasi (Nemes and Steinert, 1999).

La loricrina è il maggior componente dell'envelope corneo nell'epidermide. Nelle fasi terminali del processo differenziativo è rilasciata dai granuli e legata, nella superficie interna, al nascente envelope corneo (Steven and Steinert, 1994). Mutazioni a livello del dominio ricco di glicina, risultano nella formazione di una sequenza ricca di arginina, e l'accumulo di questa proteina mutata sembra portare ad un disordine nel processo di cheratinizzazione (Ishida-Yamamoto, 2003).

Le "*small proline rich proteins*" (SPRs) comprendono una famiglia di 14 membri che contiene tre distinti sottogruppi SPR1, SPR2, SPR3, espressi maggiormente in alcuni epiteli rispetto ad altri. Le SPR hanno la stessa organizzazione strutturale: hanno un dominio di testa (N-terminale) e di coda (C-terminale) in cui sono abbondanti i residui di glutamina e lisina, e un dominio centrale costituito da unità variabili (2-10) di sequenze peptidiche ripetute costituite da 8 residui (SPR1, SPR3) o da 9 residui (SPR2), queste sequenze ripetute sono ricche in prolina (Tesfaigzi and

Carlson, 1999). Queste proteine sembrano fungere da ponte per l'unione di altre proteine (Steinert et al., 1998).

Cistatina A ed elafina sono inibitori delle proteasi e la loro funzione è proprio quella di regolare l'attività di questi enzimi, necessaria per un corretto sviluppo dell'envelope (Zeeuwen et al., 2004).

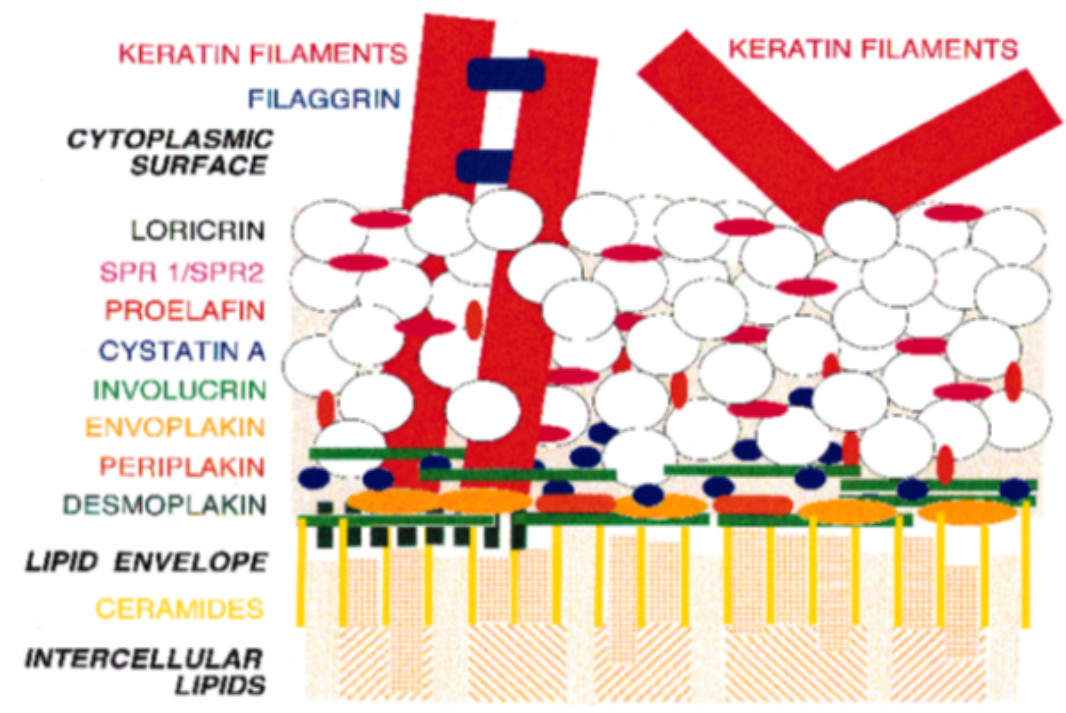


Figura 3. Rappresentazione schematica della struttura dello strato corneo e della barriera lipidica (Nemes and Steinert, 1999).

Tutte queste proteine sono legate tra loro grazie alla famiglia delle transglutaminasi, che comprende sette enzimi calcio-dipendenti che catalizzano il legame tra isopeptidi, tramite il trasferimento acilico Ca^{2+} -dipendente tra il gruppo γ -carbossiamidico di residui di glutammina e il gruppo amminico di varie ammine primarie. Il risultato della reazione è la formazione di legami ϵ -(γ -glutamil)lisina, ovvero legami crociati che si formano tra un residuo di glutammina ed uno di lisina localizzati su due diverse catene proteiche (Grenard et al., 2001). I tre membri di questa famiglia sono espressi nell'epidermide e sono responsabili dell'assemblaggio dei precursori proteici che formano l'envelope corneo: TGase 1, TGase 3, TGase 5. Le transglutaminasi epidermiche presentano localizzazioni diverse tra i vari strati

dell'epidermide, e ciascuna possiede un ruolo specifico nell'assemblaggio delle proteine (Candi et al., 2005). Tra questi sottotipi, la transglutaminasi-1 è quella espressa maggiormente nei cheratinociti con un grado più elevato di differenziazione (Inazawall et al., 1992). È sintetizzata come precursore inattivo, e viene successivamente attivata dalla catepsina D (Egberts et al., 2004).

Topi carenti per la transglutaminasi-1 presentano un difetto dello strato corneo che ne provoca la morte neonatale a causa di un aumento del TEWL confermando l'importanza di questo enzima per un corretto assemblaggio dell'envelope corneo. Inoltre, topi carenti a livello cutaneo nella catepsina D mostrano ridotta attività della transglutaminasi-1 e ridotta espressione delle proteine dell'envelope corneo (Egberts et al., 2004).

Oltre che per l'assemblaggio delle proteine, è stato visto che la TGase 1 riveste un ruolo importante anche per la formazione dei legami tra i lipidi (prevalentemente ω -idrossiceramidi) e le proteine dell'envelope corneo (Steinert et al., 1999).

In contrasto, topi carenti in loricrina mostrano un transitorio eritroderma congenito, con cute traslucida alla nascita e un aumento della suscettibilità agli stress meccanici. Tuttavia, questi topi mutanti non presentano aumento del TEWL, e perdono il fenotipo patologico 4 o 5 giorni dopo la nascita, tale variazione fenotipica può essere associata ad una aumentata espressione di altre componenti proteiche dell'involucro corneo. Prove ottenute mediante l'uso di tecniche di ingegneria genetica sui topi, suggeriscono quindi che l'assemblaggio delle proteine costituenti l'involucro cellulare è fondamentale per il normale processo di desquamazione e per l'integrità strutturale e meccanica dei corneociti nell'epidermide, anche se l'ablazione mirata di singoli geni delle proteine coinvolte non causa anomalie letali o che perdurano nel corso della vita (Koch et al., 2000).

2.2 PROTEINE FUNZIONALI DELLO STRATO CORNEO

2.2.1 Proteine correlate alla desquamazione.

Quando le cellule diventano corneificate, i desmosomi sono modificati e trasformati in corneodesmosomi. I corneodesmosomi sono strutture che legano i cheratinociti nello strato corneo e nei siti di ancoraggio per i filamenti intermedi del citoscheletro, fornendo la resistenza primaria alle forze meccaniche applicate sulla pelle. I corneodesmosomi sono composti da diverse molecole transmembrinarie e intra ed extracellulari. Le proteine transmembrinarie che facilitano l'adesione intercellulare sono caderine desmosomiali, ovvero proteine calcio-dipendenti deputate all'adesione tra le cellule, quali ad esempio la desmogleina (DSG) 1 e la desmocollina (DSC) 1. I loro domini intracellulari sono attaccati ai filamenti intermedi tramite alcune proteine come desmoplachina, placoglobina, placofilina ed una vasta gamma di altre molecole intracellulari (Ishida-Yamamoto and Igawa, 2014).

La corneodesmosina (CDSN) è invece un componente dei corneodesmosomi unicamente extracellulare (fig. 4) (Simon et al., 1997). Nell'epidermide, la corneodesmosina è secreta dai granuli lamellari, incorporata successivamente agli altri componenti dei corneodesmosomi e legata covalentemente alle proteine dell'envelope corneo. La corneodesmosina è una proteina che funge da sicura nell'adesione tra le cellule dello strato corneo. Durante la maturazione dei corneociti, per i normali processi desquamativi, la corneodesmosina viene proteolisata (Ishida-Yamamoto and Kishibe, 2011). L'importanza della corneodesmosina nell'adesione tra le cellule è stata dimostrata inizialmente dall'espressione di un fenotipo letale nei topi privi di questa proteina. Nella cute di questi topi i corneodesmosomi erano strutturalmente anormali e lo strato corneo risultava disgiunto da quello granuloso (Matsumoto et al., 2008).

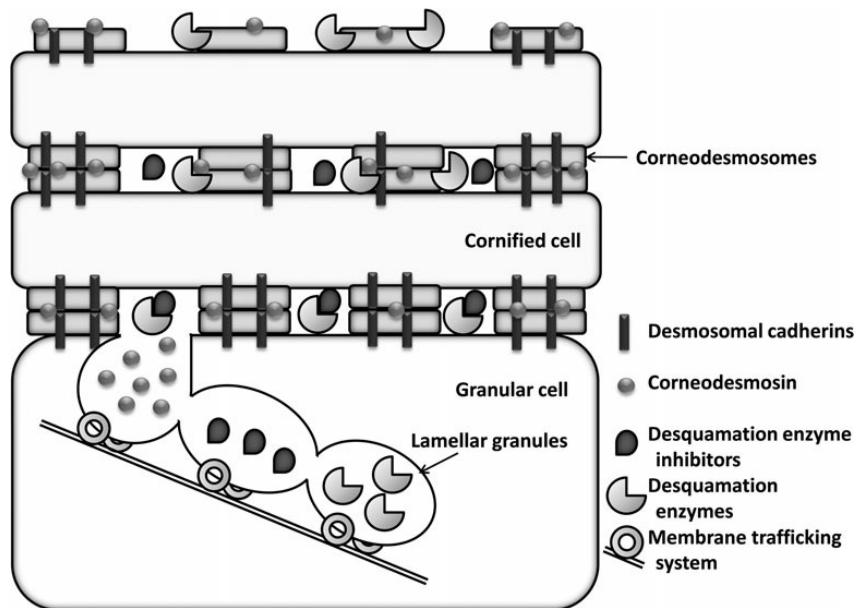


Figura 4. Rappresentazione schematica dei principali elementi costituenti i corneodesmosomi e dei membri chiave nel processo desquamativo. I granuli lamellari contengono corneodesmosina, enzimi desquamativi e i loro inibitori (Ishida-Yamamoto and Kishibe, 2011).

Durante la desquamazione, i componenti extracellulari dei corneodesmosomi sono degradati da numerose proteasi. A livello epidermico, oltre che nella desquamazione, le proteasi sono coinvolte in almeno tre processi:

- alcuni precursori proteici, come per esempio la filaggrina, necessitano di essere lisati prima di poter prender parte alla formazione dell'envelope corneo;
- le transglutaminasi necessitano di una specifica attivazione proteolitica (catepsina D) per assemblare i substrati proteici;
- la perdita del nucleo e dei mitocondri che caratterizza il cheratinocita maturo necessita un processo di proteolisi (Candi et al., 2005).

Le callicreine sono un insieme di 15 serina proteasi (KLK1-KLK15), una famiglia di enzimi la cui attività dipende da un insieme di residui aminoacidici nel sito attivo dell'enzima, uno dei quali è sempre la serina (da cui il nome serina-proteasi). Nella cute umana, almeno otto callicreine, tra cui KLK5 e KLK7, sono espresse e secrete nello spazio extracellulare tra lo strato granuloso e lo strato corneo. KLK 5 degrada

tutti i componenti cellulari dei corneodesmosomi, mentre KLK7 degrada solo DSC1 e CDSN ma non DSG1 (Borgoño et al., 2007; Candi et al., 2005). Le attività enzimatiche di KLK5 e KLK7 sono note per essere inibite dal LEKTI (*lymphoepitheliale Kazal-type 6 serine protease*), codificato dal gene SPINK5. LEKTI è sintetizzato nello strato granuloso ed è rilasciato dai granuli lamellari nello spazio extracellulare (Bonnart et al., 2005a). Topi privi del gene SPINK5 hanno mostrato una cute molto fragile con gravi lesioni incompatibili con la vita. La carenza di LEKTI nell'epidermide provoca una maggior attività di KLK5 e KLK7, si ritiene pertanto che la regolazione dell'attività enzimatica di KLKs da parte del LEKTI sia cruciale per un corretto processo di desquamazione e la formazione della barriera cutanea (Bonnart et al., 2005b).

Recenti ricerche hanno richiamato l'attenzione sull'inaspettato ruolo che, nell'espletamento della funzione di barriera, è svolto da un altro tipo di apparato di connessione intercellulare, le giunzioni serrate (*tight junctions*). Animali transgenici privi di un componente essenziale di tali dispositivi, la proteina claudina-1, rilevano un grave incremento della TEWL e muoiono poco dopo la nascita (Sugawara et al., 2013).

2.3 LIPIDI DELLO STRATO CORNEO

La componente lipidica gioca un ruolo importante nella differenziazione, struttura e funzione dell'epidermide (Miller et al., 2013). Nei cheratinociti della parte superiore dello strato spinoso e nello strato granuloso troviamo i corpi lamellari, che provengono dall'apparato di Golgi. I corpi lamellari contengono i precursori dei lipidi intercellulari nello strato corneo, quali ad esempio fosfolipidi, glucosilceramidi, sfingomieline e colesterolo (Candi et al., 2005). Nei corpi lamellari troviamo, inoltre, enzimi idrolitici in grado di degradare il materiale intercellulare (Wickett and Visscher, 2006). Durante la differenziazione dei cheratinociti, i corpi lamellari si muovono verso l'apice delle cellule granulari, si fondono con la membrana plasmatica e secernono il loro contenuto nello spazio extracellulare al confine tra lo strato granuloso e quello corneo per esocitosi (Proksch et al., 2008). I lipidi secreti vengono successivamente elaborati e organizzati in lamelle lipidiche nello spazio intercellulare dello strato corneo. Alcune classi di lipidi (come ceramide 1 e ceramide 2) formano legami covalenti con le proteine dell'envelope corneo come involucrina, envoplachina e periplachina, e formano un involucro lipidico che funge da impalcatura per le lamelle lipidiche. Ceramidi (45-50% del peso), colesterolo (25%) e acidi grassi liberi (10-15%) sono i tre principali costituenti lipidici nello strato corneo (Jungersted et al., 2008; Madison, 2003).

2.3.1 Ceramidi

Le ceramidi sono una classe di molecole lipidiche costituite da una base sfingoide legata ad un acido grasso tramite legame amidico (fig. 5). Attualmente si ritiene che le ceramidi siano i principali costituenti dello strato corneo e giochino un ruolo importante nel mantenimento della permeabilità della cute (Mizutani et al., 2009).

Nel reticolo endoplasmatico delle cellule dello strato soprabasale le ceramidi vengono sintetizzate "*de novo*" (fig. 6) (Mizutani et al., 2009).

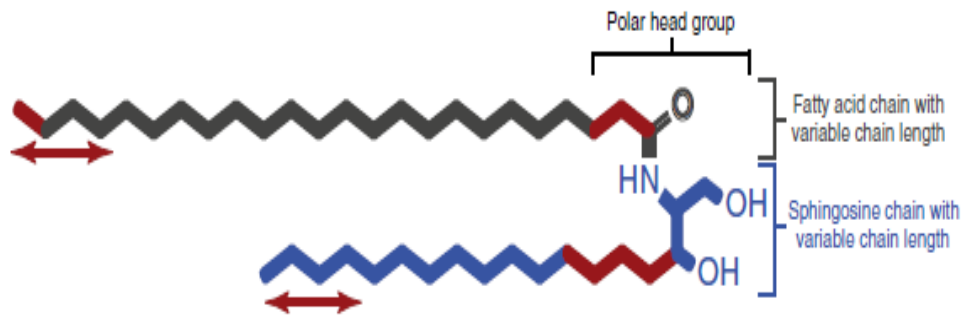


Figura 5. *Struttura delle ceramidi.* Le ceramidi sono composte da un gruppo polare e due catene carboniose di varia lunghezza (Janssens et al., 2012).

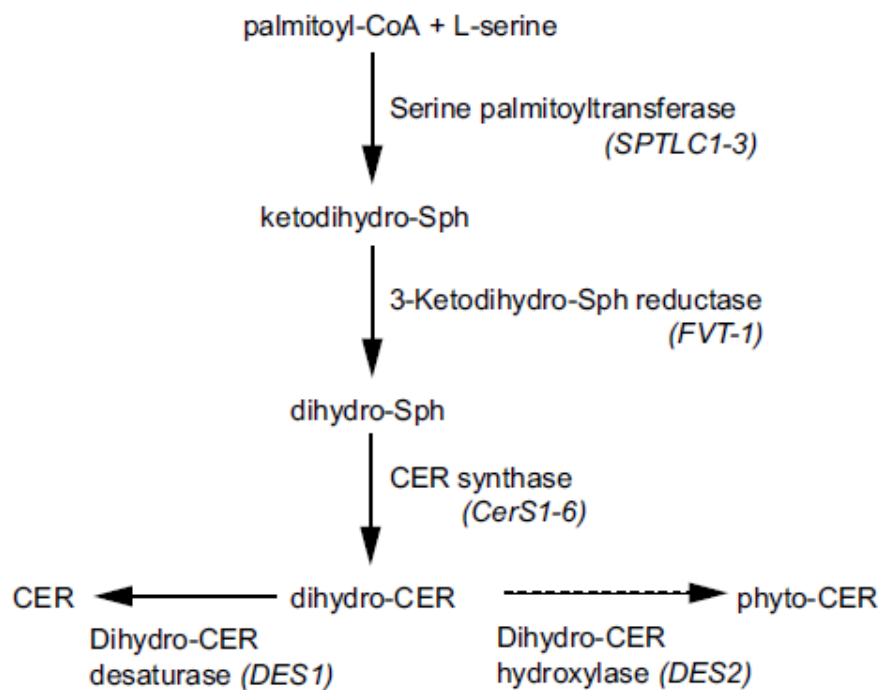


Figura 6. *Sintesi “de novo” delle ceramidi nei mammiferi.* Sono mostrati i geni e gli enzimi coinvolti nei diversi passaggi della biosintesi delle ceramidi. La freccia con linea tratteggiata indica un percorso unico per tessuti specifici, tra cui la cute (Mizutani et al., 2009).

Le diidro-CER sintasi (CERSyn) sono una famiglia di enzimi che possono N-acilare una ampia varietà di basi sfingoidi oltre alla diidrosfingosina, come la sfingosina. Nella cute dell'uomo sono state identificate sei tipologie di CERSyn, che differiscono per la preferenza nella lunghezza degli acidi grassi e per la loro espressione in tessuti specifici. CERSyn 3 per esempio è espressa maggiormente nei cheratinociti maturi e predilige acidi grassi a lunga catena. La sua attività è quindi correlata alla presenza delle ceramidi con una catena carboniosa di maggiori dimensioni (Meckfessel and Brandt, 2014).

Uno studio condotto nei topi ha mostrato che l'enzima CERSyn 3 è essenziale per la sopravvivenza. Topi carenti in CERSyn 3 sono morti subito dopo la nascita, come risultato dell'aumento del TEWL. L'analisi della composizione delle ceramidi nei topi carenti in CERSyn 3 ha rivelato la perdita delle ceramidi contenenti acidi grassi a più di 26 atomi di carbonio. La cute di questi topi neonati si è dimostrata inoltre più suscettibile alla colonizzazione da parte di *Candida Albicans* mettendo in risalto l'importanza della barriera cutanea nella protezione dagli insulti esterni (Jennemann et al., 2012).

Le ceramidi sintetizzate attraverso la via "de novo" sono poi immediatamente convertite in glucosilceramide e sfingomielina (fig. 7). Le glucosilceramidi e sfingomieline vengono poi inserite in granuli lamellari, secreti nell'interfaccia tra lo strato granuloso e quello corneo, dove sono poi riconvertiti in ceramidi dagli enzimi β -glucocerebrosidasi e ammido-sfingomielinasi (Holleran et al., 1993). Una carenza di β -glucocerebrosidasi in alcuni topi è risultata in un aumento del TEWL, aumento di glucosilceramidi, diminuito quantitativo di ceramidi nello strato corneo e un'anomala organizzazione delle lamelle lipidiche (Doering et al., 1999).

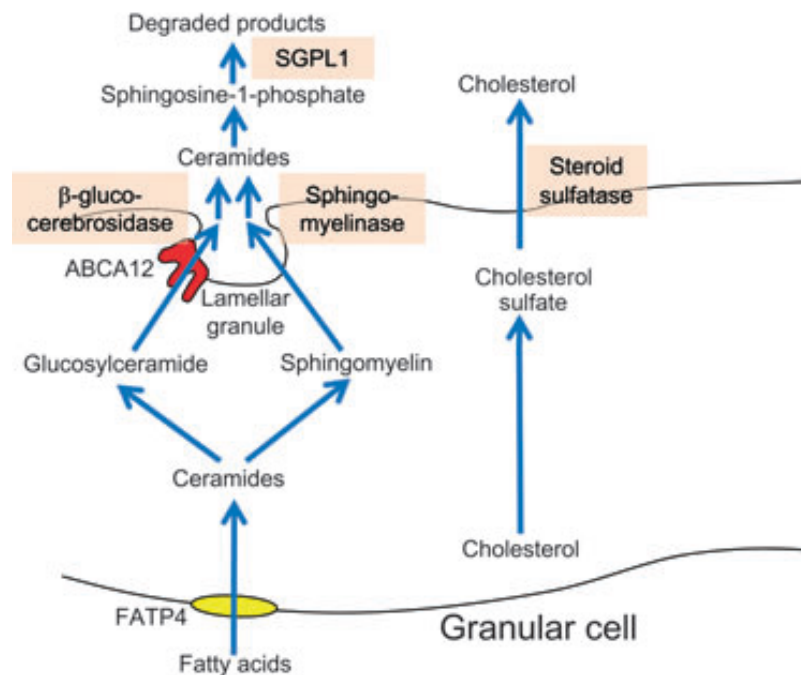


Figura 7. *Principali processi coinvolti nell'elaborazione dei lipidi.* I lipidi secreti negli spazi intercellulari durante il processo di cheratinizzazione sono successivamente elaborati e organizzati in lamelle lipidiche extracellulari nello strato corneo. Alcune classi di lipidi vengono covalentemente legate alle proteine dell'envelope corneo e formano un involucro lipidico che agisce come impalcatura per le lamelle lipidiche.

L' ABCA12 (*ATP-binding cassette subfamily A member 12*) è un trasportatore lipidico che riveste un ruolo, almeno in parte, nell'introduzione delle glucosilceramidi nei granuli lamellari. I topi omozigoti per l'allele nullo ABCA12 presentano mortalità neonatale, con fessurazioni a livello cutaneo e grave perdita di peso, probabilmente a causa di un aumento del TEWL (Yanagi et al., 2008).

Recenti studi, che si avvalgono della LC-MS (cromatografia liquida-spettrometria di massa), hanno rivelato che le ceramidi nello strato corneo umano e canino, possono essere divise in 11 gruppi in base alla struttura determinata dalla base sfingoide e dall'acido grasso (fig. 8 e 9):

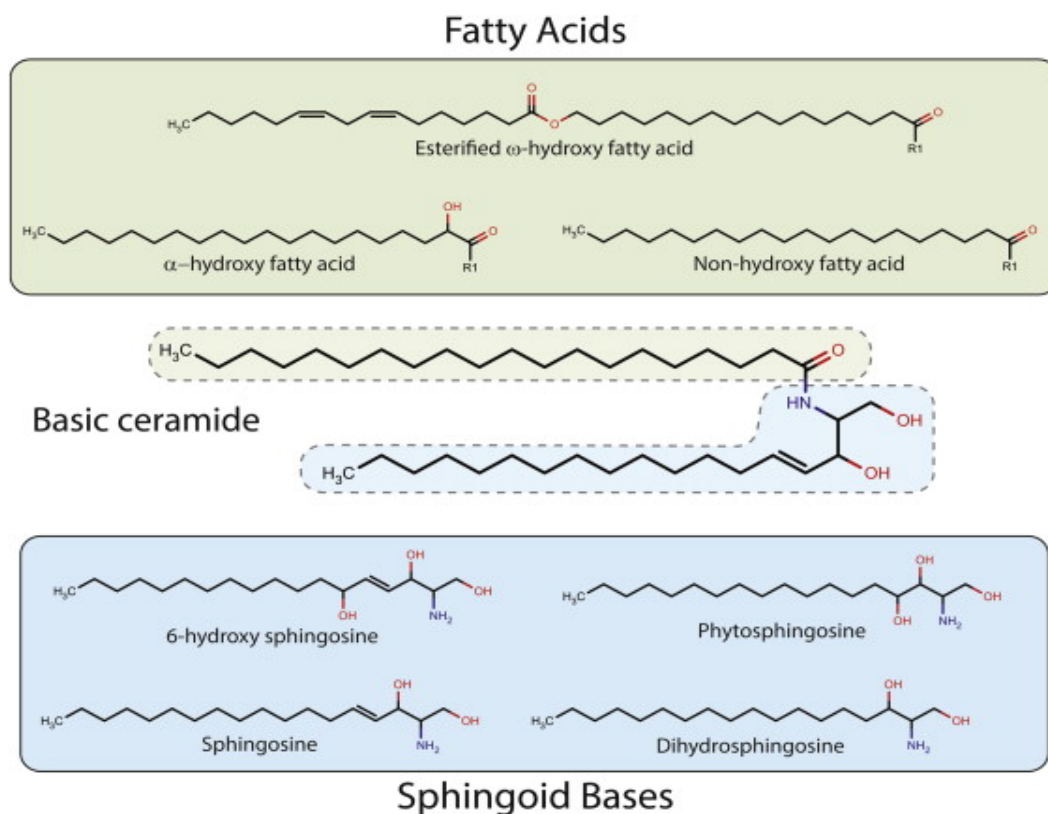


Figura 8. Le differenti classi di ceramidi derivano tutte da tre diverse classi di acidi grassi e quattro tipologie di basi sfingoidi (Meckfessel and Brandt, 2014).

Sphingoid \ Fatty acid	6-hydroxy sphingosine [H]	Phytosphingosine [P]	Sphingosine [S]	Dihydrosphingosine [D]
Esterified ω -hydroxy fatty acid [EO]	CER[EOH]	CER[EOP]	CER[EOS]	CER[EODS] (Not detected in SC)
α -hydroxy fatty acid [A]	CER[AH]	CER[AP]	CER[AS]	CER[ADS]
Nonhydroxy fatty acid [N]	CER[NH]	CER[NP]	CER[NS]	CER[NDS]

Figura 9. Le classi di ceramidi riconosciute nello strato corneo umano e canino possono essere divise in 11 gruppi secondo la loro strutture sfingoide e in base agli acidi grassi presenti. Le classi di ceramidi riconosciute esclusivamente nello strato corneo sono circondate da un rettangolo rosso. Il gruppo CER[ADS], riconosciuto esclusivamente nello strato corneo e nei peli dell'uomo, è circondato da un rettangolo verde. CER[EODS] non è stato rilevato nello strato corneo dei mammiferi (Nishifuji and Yoon, 2013).

Tra le sottoclassi delle ceramidi, le ω -idrossiceramidi esterificate (CER[EOS], CER[EOP] e CER[EOH]), grazie alle catene degli acidi grassi estremamente lunghe poiché esterificate con acido linoleico, svolgono un ruolo molto importante nella funzione di barriera epidermica, anche se in rapporto alla composizione totale delle ceramidi, rappresentano però una frazione relativamente bassa (Masukawa et al., 2009). Le ω -idrossiceramidi non esterificate (CER[OS], CER[OP] e CER[OH]), che sono prodotti di degrado delle ω -idrossiceramidi esterificate, si legano covalentemente alla superficie esterna dell'envelope corneo, in particolare ai residui aminoacidici dell'involucrina, formando l'envelope lipidico. Nella specie umana, le principali ceramidi che si legano alle proteine dell'envelope sono CER[OS] e CER[OH], nel cane invece, sono CER[OS] e CER[OP] (Madison, 2003; Popa et al., 2011b).

Le ceramidi vengono idrolizzate per generare sfingosina, che viene poi fosforilata in sfingosina-1-fosfato (S1P) dall'enzima sfingosina-chinasi. La sfingosina-1-fosfato è inattivata irreversibilmente dalla S1P-liasi (SGPL1) (Baumer, 2011). Quindi i livelli di ceramide nello strato corneo sono regolati da un equilibrio tra enzimi di sintesi (ad esempio beta-glucocerebrosidasi e sfingomielinasi) e ceramidasi (che sono responsabili della loro degradazione). Le ceramidasi possono essere endogene o esogene (ad esempio batteriche) (Marsella et al., 2011).

2.3.2 Colesterolo

Il colesterolo, la seconda classe principale di lipidi nello strato corneo, è sintetizzato nei cheratinociti, e, almeno una parte, metabolizzato in colesterolo solfato. Durante la cheratinizzazione, negli spazi intercellulari dello strato corneo, è secreta la solfatasi steroidea, che degrada il colesterolo solfato in colesterolo, utilizzato per formare le lamelle lipidiche (Proksch et al., 2008). Il colesterolo aiuta a regolare il contenuto liquido della barriera lipidica, permettendo alle ceramidi e agli acidi grassi liberi di assumere una configurazione stretta e altamente ordinata (Reiter et al., 2009). Il colesterolo solfato gioca invece un ruolo come inibitore delle proteasi coinvolte nel processo desquamativo cutaneo (Sato et al., 1998). Una corretta interazione tra classi di lipidi e vie metaboliche è quindi importante per fornire integrità strutturale e funzionale alle lamelle lipidiche, e per garantire la permeabilità della barriera cutanea

(Nishifuji and Yoon, 2013). La sintesi del colesterolo a livello epidermico aumenta durante i processi di riparazione della barriera cutanea (Proksch et al., 2008).

2.3.3 Acidi grassi

Nell'epidermide inoltre troviamo acidi grassi liberi e legati ai trigliceridi, fosfolipidi, glucosilceramidi e ceramidi. La lunghezza della catena di acidi grassi liberi varia principalmente da C12 a C24. Alcuni acidi grassi saturi e monoinsaturi sono sintetizzati nell'epidermide, mentre altri devono essere introdotti tramite l'alimentazione (Proksch et al., 2008). Una carenza di acidi grassi essenziali, che può verificarsi a seguito di diete incomplete, patologie che portano ad un malassorbimento, o indotta sperimentalmente nel ratto e nel topo, è caratterizzata da profondi cambiamenti dell'epidermide. La cute assume un aspetto eritematoso e l'epidermide risulta squamosa e ruvida, con gravi disturbi nella funzionalità della barriera. Inoltre, possono verificarsi gravi infezioni batteriche, ritardi nella cicatrizzazione ed alopecia (Proksch et al., 1992).

L'FATP4 (*Fatty Acid Transport Protein*) è un trasportatore lipidico che gioca un ruolo cruciale nell'introduzione degli acidi grassi nei cheratinociti. I topi con mutazioni al gene che codifica per l'FATP4 mostrano un'alterazione nella funzionalità della barriera epidermica e mortalità neonatale (Herrmann et al., 2003). Dai fosfolipidi, per azione della fosfolipasi A₂, vengono liberati gli acidi grassi polinsaturi, metabolizzati successivamente dalle ciclossigenasi e lipossigenasi in prostaglandine e leucotrieni, coinvolti nell'omeostasi dell'epidermide e nella patogenesi dell'infiammazione cutanea (Miller et al., 2013).

In dermatologia è molto frequente l'uso dei glucocorticoidi. Sia nei trattamenti di lunga durata (Lee et al., 1997), sia in quelli di breve durata (Kao and Joachim, 2003); i glucocorticoidi portano ad una minor sintesi e secrezione dei corpi lamellari, un minor quantitativo di lipidi nello strato corneo, e ad una riduzione dell'integrità dello strato corneo che si traduce nell'aumento della perdita di acqua transepidermica. L'apporto topico di ceramidi, colesterolo e acidi grassi in egual misura facilita la riparazione dello strato lipidico, permettendo un ritorno più veloce alle condizioni fisiologiche e rappresenta una potenziale modalità terapeutica per ridurre gli effetti

avversi delle terapie con i glucocorticoidi (Jungersted et al., 2008; Kao and Joachim, 2003).

L'Interleuchina 1 (IL-1), il fattore di necrosi tumorale (TNF) e l'interleuchina 6 (IL-6) sono potenti mitogeni e stimolatori della sintesi lipidica. A seguito di un danno acuto nella barriera cutanea si verifica un aumento dell'espressione epidermica del TNF, IL-1 e IL-6 (Wang et al., 2004). Topi geneticamente privi dei recettori per queste molecole (IL-1, TNF e IL-6) mostrano un ritardo nella riparazione della barriera cutanea (Jensen et al., 1999; Wang et al., 2004). L'aumento repentino di TNF, IL-1 e IL-6 dopo l'interruzione della barriera sembra essere quindi cruciale per la riparazione della barriera cutanea. Tuttavia, se la rottura della barriera dovesse essere prolungata, si verifica un aumento cronico della produzione di citochine, che potrebbe in questo caso avere invece un effetto negativo che stimola l'infiammazione e ne aggrava il danno, come è noto verificarsi in diverse malattie quali la dermatite atopica (Proksch et al., 2008).

2.4 ASSEMBLAGGIO DELL'ENVELOPE CORNEO

L'assemblaggio dell'envelope corneo procede essenzialmente attraverso 3 stadi principali a cominciare dagli ultimi livelli dello strato spinoso: iniziazione, formazione dell'involucro lipidico e consolidamento (fig. 10) (Kalinin et al., 2002).

1) Iniziazione

Come conseguenza dell'aumento della concentrazione del Ca^{2+} intracellulare nelle cellule soprabasali, involucrina e periplachina formano dei complessi stabili (Kalinin et al., 2004). Contemporaneamente, viene espressa e attivata la TGasi1. Questo enzima, localizzato nella membrana grazie ad ancore lipidiche, risponde agli aumentati livelli di Ca^{2+} unendo le involucrina e l'involucrina attraverso legami crociati N- ϵ -(γ -glutammina)lisina. Lo stesso enzima media anche l'unione di altre proteine associate alla membrana e ai desmosomi. Gradualmente, l'aggregazione involucrina-involucrina-periplachina forma uno strato depositato appena sotto la superficie interna della membrana plasmatica (Kalinin et al., 2002).

2) Formazione dell'involucro lipidico

Nello strato granuloso, i cheratinociti producono ed accumulano i corpi lamellari. Come detto in precedenza, in queste vescicole secretorie vengono accumulate ω -idrossiceramidi con catene aciliche particolarmente lunghe ($> \text{C}30$). La secrezione dei corpi lamellari si attua all'interfaccia tra lo strato granuloso e quello corneo. Questo processo arricchisce la membrana plasmatica di ω -idrossiceramidi le cui catene aciliche sono lunghe abbastanza da attraversare il doppio strato lipidico in modo da esporre il loro gruppo ω -OH nel citosol. La TGasi 1 ancorata alla membrana plasmatica può esterificare covalentemente queste ceramidi con residui di glutammina delle proteine dell'involucro corneo. Sembra poi che questi lipidi ad uno stadio successivo intervengano nell'organizzazione spaziale e strutturale degli altri lipidi extracellulari (Kalinin et al., 2002; Marekov and Steinert, 1998).

3) Consolidamento

Nelle fasi finali del suo processo di formazione, il CE viene rafforzato mediante l'incorporazione del suo principale costituente proteico, la loricrina. La loricrina è una proteina scarsamente solubile e, a questo stadio di differenziamento del

cheratinocita, si trova nel citosol sotto forma di granuli insolubili. Si ritiene che lo spostamento della loricrina verso la periferia della cellula possa avvenire tramite una sua parziale solubilizzazione mediante il legame covalente della catena di loricrina con molecole altamente solubili come le SPR. Gli oligomeri così formati sono traslocati in periferia dove si ritiene che la TGasi 1 li associ con lo scheletro proteico preesistente. Sempre durante la fase di consolidamento del CE vengono aggiunte all'impalcatura proteica le altre componenti del CE: la cistatina α , l'elafina e tutte le altre proteine dello stato differenziativo terminale del cheratinocita. Inoltre i filamenti intermedi vengono legati covalentemente al CE tramite le desmoplachine in corrispondenza delle preesistenti giunzioni aderenti e desmosomiali. Alla fine di questa lunga serie di eventi, il corneocita maturo si trasforma nella lamella cornea in cui grandi fasci di filamenti intermedi sono covalentemente saldati al CE; questa struttura resistente ma flessibile circondata da una matrice lipidica altamente organizzata è alla base delle proprietà meccaniche e di impermeabilità necessarie per la sopravvivenza dei mammiferi nell'ambiente terrestre (Jarnik et al., 1998; Kalinin et al., 2002).

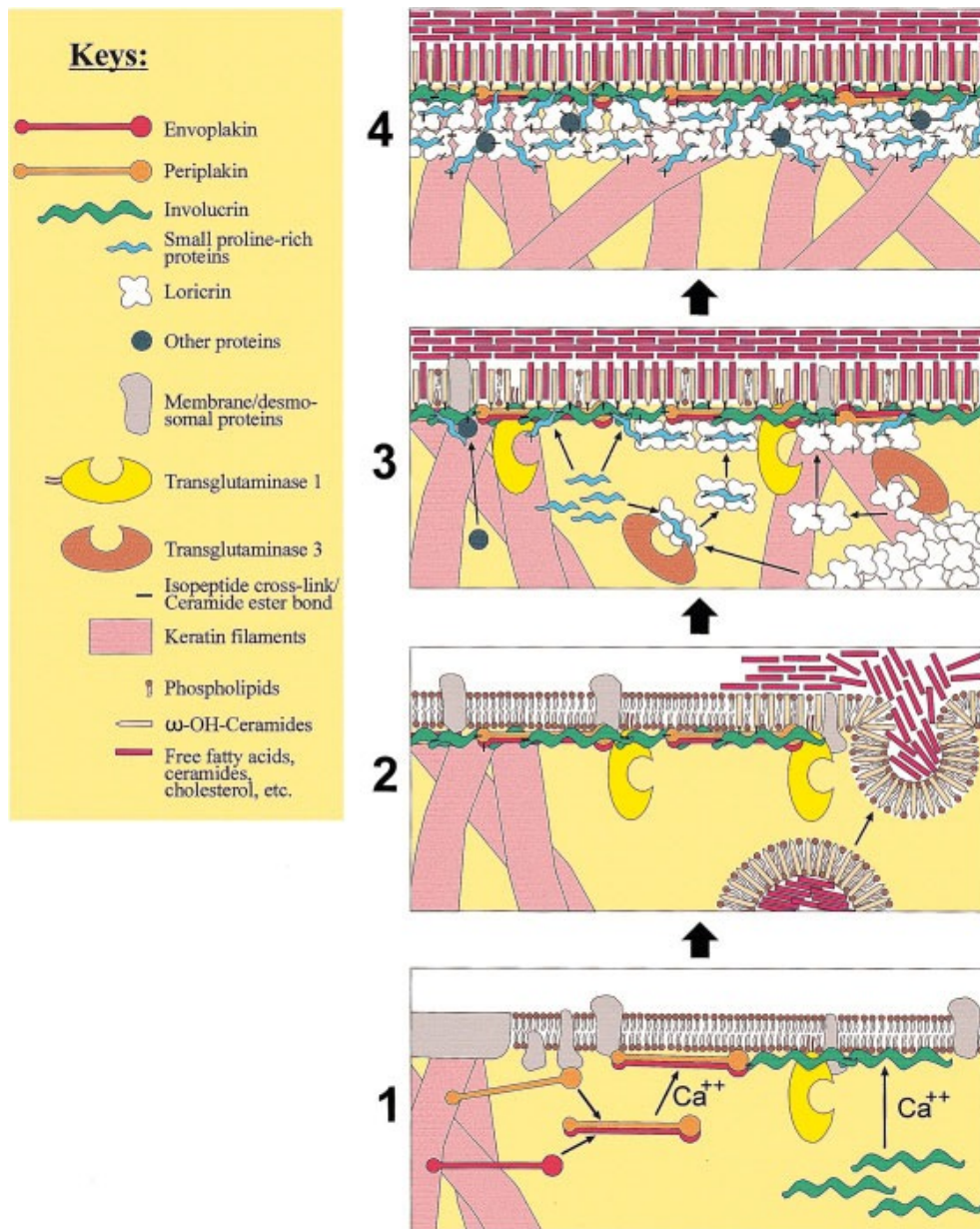


Figura 10. *Modello dell'assemblaggio dell'involucro corneo.* Il primo passaggio è l'iniziazione, che ha luogo nello strato spinoso, e coinvolge la sintesi di proteine strutturali dell'involucro corneo e l'estrusione di specifici lipidi nello spazio intercellulare (1). La seconda fase è quella di consolidamento, che avviene nello strato granuloso e comporta il legame covalente tra lipidi e proteine dell'involucro corneo (2). Successivamente, nella terza fase, avviene il legame covalente tra loricrina e SPRs determinato dall'attività della TG3 e della TG1 (3). Infine, l'attività della TG1 permette il legame tra loricrina e altre proteine dell'involucro (4) (Kalinin et al., 2002).

3 DERMATITE ATOPICA NEL CANE

La dermatite atopica è una malattia comune nel cane: l'incidenza nella popolazione canina varia da 10 a 20 per cento (Meury et al., 2011). La predisposizione a sviluppare la malattia è ereditaria e i soggetti di razza pura sembrano più colpiti, anche a causa dell'alta consanguineità. Colpisce entrambi i sessi e si manifesta in cani principalmente tra 6 e 36 mesi di età (Noli and Toma, 2011).

L'incidenza della malattia è cresciuta notevolmente negli ultimi trent'anni (Kang et al., 2014), sia negli esseri umani sia nei cani. In medicina umana, tra le ipotesi più accreditate come possibile spiegazione per la crescente presenza di malattie allergiche nei paesi ad alto reddito, è stata proposta la "teoria dell'igiene". Questa teoria presuppone che una ridotta esposizione nei primi mesi di vita ad agenti infettivi come batteri e parassiti, a causa di una eccessiva frequenza dei bagni e dell'uso frequente di detergenti antibatterici, possa influenzare lo sviluppo del sistema immunitario, portando ad un aumento della suscettibilità alle allergie e ai disturbi autoimmunitari (Pelucchi et al., 2013).

Nei cani, sembrano giocare un ruolo importante i cambiamenti climatici, in particolar modo per quanto riguarda la presenza di pollini e muffe nell'ambiente (Beggs, 2004), i diversi stili di vita degli animali che, per esempio, sempre più spesso vivono in casa e sono a più stretto contatto con gli acari della polvere (Marsella and Samuelson, 2009) o il fumo di sigaretta (Ka et al., 2014); e alcuni trattamenti sanitari come le vaccinazioni e i trattamenti antiparassitari (Meury et al., 2011). Inoltre la maggior consapevolezza di questa malattia, da parte dei veterinari, fa sì che sia diagnosticata più frequentemente rispetto al passato (Miller et al., 2013).

3.1 EZIOPATOGENESI

Sebbene la sua patogenesi non sia stata completamente delucidata, la dermatite atopica del cane presenta molti aspetti in comune con la malattia nell'uomo, a tal punto che la specie canina può essere considerata un valido modello sperimentale per gli studi eziopatogenetici della malattia umana (Marsella and Girolomoni, 2009; Noli and Toma, 2011).

La dermatite atopica è stata considerata storicamente come una reazione d'ipersensibilità immediata di tipo 1, mediata da IgE, che inducono la degranolazione dei mastociti, causando prurito. Attualmente sembra più corretto definire la dermatite atopica come una malattia multifattoriale, che contempla anomalie immunitarie (ipersensibilità di tipo 1 e 4), anatomiche (barriera cutanea alterata), genetiche (predisposizione per alcuni tipi di *Dog Leucocyte Antigen – DLA*) e fattori ambientali (predisposizione per cani che vivono indoor e in ambienti urbani), inclusi i microorganismi (batteri e malassezie) (Noli and Toma, 2011).

La ricerca di nuove definizioni nasce dal fatto che nel corso degli anni si è scoperto che ci sono cani (e uomini) affetti da dermatite atopica, per i quali non è possibile identificare IgE allergene-specifiche tramite i test sierologici ed intradermici diretti contro i principali allergeni ambientali, come, per esempio, è stato evidenziato dallo studio retrospettivo di Prelaud et al. nel 2006, nel quale il 26% dei soggetti atopici (21 cani su 82) non sembrano presentare alterazioni significative nel livello delle IgE allergene-specifiche (Prelaud and Cochet-Faivre, 2007).

Nella medicina umana, per descrivere questo sottogruppo di pazienti (circa 20%) in cui sono presenti i classici segni clinici di dermatite atopica, ma non possono essere dimostrate IgE allergene-specifiche, né circolanti né a livello cutaneo, sono stati utilizzati i termini dermatite *atopic-like*, AD intrinseca, o AD non allergica (Marsella et al., 2012; Tokura, 2010). In alcuni di questi pazienti umani, si ipotizza che l'assenza della rilevazione di IgE allergene-specifiche sia dovuta allo stadio iniziale della dermatite atopica; fase in cui non si è ancora verificata la sensibilizzazione allergica. Un'altra possibilità che non si può escludere è che queste persone possano essere reattive verso un gruppo di allergeni minori che rimangono non identificati. In altri individui, tuttavia, sembra che la dermatite atopica possa avvenire attraverso

percorsi alternativi che non sono IgE-dipendenti (Tokura, 2010). Sembra che queste considerazioni siano valide anche per la popolazione canina, anche se mancano ancora studi che confermino questa ipotesi (Marsella et al., 2012).

È altrettanto importante sottolineare che IgE allergene-specifiche vengono rilevate anche nei cani che non presentano manifestazioni cliniche della dermatite atopica; non è possibile quindi utilizzare la misurazione delle IgE per discriminare tra i cani atopici, cani clinicamente normali che potranno sviluppare la malattia, e cani con malattie endoparassitarie (Deboer and Hill, 1999; Hill et al., 1995).

Complessivamente, queste considerazioni hanno messo sotto una nuova luce il ruolo delle IgE nella patogenesi della dermatite atopica, non ritenendole più fondamentali nell'induzione dei sintomi, ed evidenziano il fatto che la definizione iniziale della dermatite atopica, come una malattia allergica IgE-mediata non spiega del tutto la patogenesi di questa malattia complessa (Marsella et al., 2012).

Così, nel 2006, i membri della Task Force internazionale sulla dermatite atopica canina hanno pubblicato, oltre ad una nuova definizione di questa malattia, descritta come “malattia pruriginosa della cute, di natura allergica, a predisposizione ereditaria, che si presenta con caratteristiche cliniche tipiche, associata alla presenza di alti livelli di IgE generalmente nei confronti di antigeni ambientali”, la definizione della dermatite *canine atopic-like*, descritta come “malattia infiammatoria e pruriginosa della cute, con caratteristiche cliniche identiche a quelle viste nella dermatite atopica canina, in cui però non può essere documentata la risposta mediata dalle IgE verso allergeni ambientali o di altra natura” (Halliwell, 2006).

Anche l'importanza dell'istamina come mediatore dell'infiammazione e del prurito nei cani con dermatite atopica è controversa (Miller et al., 2013). Sebbene nella visione tradizionale della dermatite atopica sia vista come un mediatore chiave, uno studio in cui sono state misurate le concentrazioni sierologiche dell'istamina ha scoperto che le concentrazioni nei cani sani e nei cani con dermatite atopica sono simili (Nimmo Wilkie et al., 1990). A livello cutaneo le concentrazioni di istamina risultano invece maggiori nei cani con dermatite atopica rispetto ai soggetti sani, ma questa differenza non si riflette nei valori di istamina plasmatici (Nimmo Wilkie et

al., 1990). Il rilascio di istamina in un campione di mastociti isolati dalla cute di cani con dermatite atopica, cani sensibilizzati agli ascaridi e cani sani non è risultato significativamente differente tra i vari gruppi (Queralt et al., 1998). In un altro studio, cani sottoposti ad iniezioni intradermiche di istamina non hanno dimostrato un significativo aumento del prurito (Carr et al., 2009). Inoltre, la scarsa efficacia dei farmaci antistaminici nel trattamento del prurito e dell'inflammatione nei cani con dermatite atopica (Olivry et al., 2010b), rispetto all'uomo, rappresenta un'ulteriore conferma che l'istamina in questa malattia detiene probabilmente solo un ruolo marginale.

Le proteine ambientali a cui l'organismo reagisce in modo eccessivo o anomalo sono chiamate allergeni e includono acari, pollini, muffe, polveri, forfora, insetti e, in alcuni casi, prodotti chimici (Marsella et al., 2012). È possibile, inoltre, che allergeni di natura alimentare possano fungere da fattori scatenanti o aggravanti il quadro clinico (Miller et al., 2013); tra i cani atopici è frequente infatti rinvenire un aumento delle IgE verso alcuni tipi di alimenti (Halliwell et al., 2004), anche se spesso vi sono animali che possiedono elevati livelli di IgE nei confronti di determinati alimenti, senza avere alcuna sintomatologia (Bethlehem et al., 2012; Mueller and Tsohalis, 1998). Nel recente studio condotto da Kang et al. (2014) gli allergeni ambientali che più comunemente danno positività ai test sierologici sono gli acari della polvere e i pollini, mentre tra gli allergeni alimentari troviamo le proteine del pollo e del tacchino, la soia e il lievito di birra; anche se variazioni sono legate alla regione geografica, al livello di igiene o di inquinamento ambientale e agli ambienti di residenza dell'animale (Kang et al., 2014).

Tra i vari allergeni ambientali, un ruolo importante sembrano giocarlo anche alcune famiglie di acari che si trovano negli alimenti. In un recente studio (Hibberson and Vogelnest, 2014), l'analisi di alimenti commerciali secchi di varie marche, la cui confezione è stata aperta solo al momento della prova, ha riportato la presenza di alcune famiglie di acari con particolari preferenze verso i substrati proteici che, esposti a condizioni ambientali adeguate di calore e umidità, aumentano rapidamente il loro numero. La loro presenza contribuisce allo sviluppo della dermatite atopica nei cani, sia fungendo da allergeni loro stessi, sia cross-reagendo con gli acari più

comuni della polvere. Nei soggetti atopici sarebbe quindi particolarmente indicato porre attenzione alla conservazione degli alimenti secchi per cani, consigliando l'uso di contenitori sigillati al fine di garantire bassa umidità, e se possibile anche basse temperature (Hibberson and Vogelnest, 2014).

Anche se le IgE sono coinvolte nella patogenesi della maggior parte dei casi di dermatite atopica canina, lo sviluppo della malattia è probabile che sia legato ad una serie di altri fattori (Deboer, 2004).

I linfociti T presenti a livello di cute svolgono un ruolo critico nella patologia, ed uno squilibrio nelle diverse popolazioni di cellule T caratterizza i vari stadi della malattia (Marsella et al., 2012). L'infiammazione che si scatena in seguito al contatto con l'allergene nei soggetti atopici è caratterizzata da una prima fase acuta nella cute priva di lesioni dove predominano i linfociti Th2 [mediata dalle interleuchine IL-4, IL-5 e IL-13] (Jassies-van der Lee et al., 2014). IL-4 e IL-13 sono tra i principali fattori che regolano la produzione di IgE (Marsella et al., 2011). Nella cute atopica umana, la IL-13 sembra inoltre contribuire al deterioramento della barriera cutanea diminuendo l'espressione della filaggrina (Howell et al., 2007); anche se ad oggi questo meccanismo non è ancora stato riscontrato con certezza nella dermatite atopica canina (Jassies-van der Lee et al., 2014).

Alla fase Th2 segue una fase dominata dai Th1 [mediata da IL-2, IL-12 e interferone- γ (IFN- γ)] (Jassies-van der Lee et al., 2014). L'IFN- γ (citochina Th1) aumenta l'espressione dei FAS (*Apoptosis Stimulating Fragment*) sui cheratinociti, rendendoli più suscettibili all'apoptosi (Trautmann et al., 2000).

Nelle lesioni cutanee si può dunque osservare una risposta mista Th1-Th2, dove le citochine Th2 svolgono un ruolo più importante nella fase acuta (da 12 a 24 ore dopo l'esposizione all'allergene), mentre le citochine Th1 sono più rilevanti nella fase cronica (da 48 a 96 ore dopo l'esposizione all'allergene) (Rosanna Marsella et al., 2006a).

Nella cute dei cani atopici è presente inoltre una minor espressione della citochina immunosoppressiva TGF- β (*transforming growth factor- β*) rispetto ai soggetti normali (Nuttall et al., 2002). La citochina TGF- β , prodotta dalle cellule presentanti

l'antigene, dalle cellule T e dai cheratinociti, si ritiene essere importante per la tolleranza verso gli allergeni ambientali a livello periferico e mucosale (Mason and Powri, 1998). La minor espressione di questa citochina potrebbe quindi spiegare, in parte, la maggior reattività dei pazienti atopici verso stimoli che normalmente non provocano alcuna risposta (Nuttall et al., 2002).

La sovraespressione di alcune citochine Th2, insieme ad altri fattori come la diminuzione dei peptidi antimicrobici, sembra inoltre spiegare perché la cute dei soggetti atopici è più soggetta allo sviluppo di infezioni batteriche (soprattutto della famiglia *Staphylococcus spp.*) e micotiche. L'aumento di IL-4, per esempio, induce la produzione di fibronectina, proteina che contribuisce all'adesione di *Staphylococcus spp.* ai cheratinociti (Simou et al., 2005). La colonizzazione da parte di *Staphylococcus spp.* provoca ulteriori danni alla pelle atopica in quanto questi batteri producono ceramidasi e proteasi, che diminuiscono ulteriormente i livelli di ceramidi e proteine nello strato corneo, creando un ciclo di distruzione ed infiammazione della barriera cutanea che si auto-perpetua (Hatano et al., 2005). Batteri e lieviti sono in grado di peggiorare la sintomatologia clinica, non solo tramite la colonizzazione e infezione della cute, ma anche inducendo risposte d'ipersensibilità specifiche o attivazione non specifica dei linfociti T tramite superantigeni (Miller et al., 2013).

Negli ultimi anni si è infine scoperto che nello strato corneo dei pazienti atopici sembrano esserci numerosi difetti funzionali e morfologici. Per esempio, è stato riscontrato che i cheratinociti dei cani atopici sono maggiormente predisposti alla produzione di mediatori della flogosi, e sono capaci di produrre fino a trenta diverse molecole pro infiammatorie, anche in seguito a insulti di minima entità. La soglia di tolleranza immunologica nei pazienti atopici è quindi molto più bassa di quella dei pazienti normali. I cheratinociti di questi soggetti produrrebbero inoltre una minor quantità di defensine, una famiglia di proteine antimicrobiche deputate al controllo della flora microbica superficiale. Questo contribuirebbe a spiegare perché i pazienti atopici siano così predisposti allo sviluppo di infezioni secondarie (Noli and Toma, 2011). L'epidermide dei cani atopici differisce anche da un punto di vista morfologico; tali anomalie verranno discusse nei prossimi capitoli.

Alla luce di queste nuove informazioni, il ruolo dell'epidermide nella patogenesi della malattia è diventato primario rispetto a quello del sistema immunitario: ciò si riflette anche nell'approccio terapeutico alla dermatite atopica, che è cambiato notevolmente nel corso degli ultimi anni, grazie allo studio di molecole capaci di restaurare la barriera cutanea (Noli and Toma, 2011).

3.2 SINTOMATOLOGIA CLINICA

In origine questa malattia veniva definita come “dermatite allergica da inalanti”. Sebbene in alcuni cani le lesioni cutanee tipiche di questa malattia possano essere accompagnate da sintomi respiratori, questo viene segnalato insolitamente. L’inalazione degli allergeni contribuisce alla comparsa della dermatite atopica nei cani, ma non sembra essere la via principale di esposizione all’allergene (R Marsella et al., 2006). Studi più recenti (R Marsella et al., 2006; Olivry et al., 2010c, 1996) hanno dimostrato che la via più importante tramite la quale vengono presentati gli allergeni ai soggetti atopici è quella percutanea. Questo potrebbe spiegare la distribuzione delle lesioni clinicamente osservabili nei cani colpiti. La localizzazione classica delle lesioni vede coinvolte aree periorbitali, labbra, padiglioni auricolari, faccia ventrale del collo, regione ascellare, piega cutanea dell’inguine, superfici flessorie del gomito e faccia dorsale degli arti, oltre che spazi interdigitali dorsali e ventrali (fig. 11-12-13-14) (Olivry et al., 1996).

I sintomi possono essere stagionali o non stagionali, a seconda principalmente degli allergeni coinvolti come fattori scatenanti e dall’ambiente di vita dell’animale (Olivry et al., 2010a).

Il sintomo principale e primario della malattia è il prurito, che può essere associato ad eritema ma può essere anche presente come unico segno, senza nessuna altra lesione (Noli and Toma, 2011).

A causa del leccamento o del grattamento di queste aree si possono poi riscontrare diverse lesioni secondarie. Nelle aree affette la cute può diventare iperplastica, iperpigmentata, lichenificata, e presentare un aumento della desquamazione. Nei cani a pelo chiaro, a causa di alcuni enzimi contenuti nella saliva, si può riscontrare una colorazione rossastra del pelo (Grif and Deboer, 2001; Terada et al., 2011).

Infezioni secondarie, prevalentemente sostenute da batteri (*Staphylococcus spp.*) o da lieviti (*Malassezia spp.*) sono molto comuni nei cani con dermatite atopica a causa dei traumi auto-indotti nella cute dal grattamento, dell’infiammazione cronica e delle alterazioni della barriera cutanea che saranno discusse nel prossimo capitolo. Le lesioni cutanee più frequentemente associate a piodermite sono papule, pustole,

collaretti epidermici, croste, alopecia multifocale e seborrea oleosa (Grif and Deboer, 2001).

I cani allergici sono inoltre predisposti allo sviluppo di otite ricorrente (Miller et al., 2013).

Negli esseri umani, l'atopia si manifesta con una "triade" di segni clinici costituita da rinite allergica stagionale, asma, e dermatite atopica, mentre nei cani, la rinite allergica stagionale e l'asma sono raramente diagnosticate (Marsella et al., 2012). Altre patologie che si possono riscontrare nei cani atopici, seppur con una bassa frequenza, sono a carico dell'apparato gastroenterico quali ad esempio diarrea e coliti; e sintomi oculari come congiuntivite e cheratocongiuntivite secca (Paterson, 2008).



Figura 11. *Eritema, papule ed escoriazioni* visibili sulle ascelle, nella regione addominale, inguinale e nella parte mediale delle cosce, in un cane affetto da dermatite atopica.



Figura 12. Alopecia, iperpigmentazione e lichenificazione in un cane affetto da sovraccrescita di *Malassezia spp.* secondaria a dermatite atopica.



Figura 13. Eritema ed ulcere del padiglione auricolare in un cane affetto da otite purulenta secondaria a dermatite atopica.



Figura 14. *Pododermatite* in due cani affetti da dermatite atopica.

3.3 DIAGNOSI

I segni clinici della dermatite atopica nell'uomo e nel cane sono variabili, e non esiste una caratteristica unica, fisica o nella storia dell'animale che, se presente, sia patognomonica della dermatite atopica. La diagnosi iniziale di dermatite atopica viene fatta clinicamente tramite il rispetto di alcuni criteri che sono fortemente associati con la malattia (Deboer and Hillier, 2001a). Nel corso degli anni (Willemsse nel 1986, Prélud nel 1998) sono stati proposti diversi sistemi nel tentativo di definire dei criteri clinici uniformi per la diagnosi della dermatite atopica canina, ma nessuno di questi sistemi è risultato perfetto (Olivry, 2010). Nel 2009, Favrot ha proposto un nuovo set di criteri, con una maggior sensibilità e specificità rispetto ai precedenti:

- insorgenza dei sintomi clinici prima dei 3 anni di età;
- cani che vivono per lo più in casa;
- risposta del prurito ai glucocorticoidi;
- prurito iniziale in assenza di lesioni;
- interessamento della porzione distale degli arti anteriori;
- interessamento dei padiglioni auricolari;
- i margini delle orecchie non sono coinvolti;
- assenza di interessamento dell'area dorso-lombare.

L'associazione della presenza di cinque criteri permette, con una sensibilità dell'85% ed una specificità del 79%, di differenziare i cani con la dermatite atopica dai cani con prurito di altra natura. Si deve comunque sempre considerare che questi criteri non sono assoluti e che non sempre i sintomi clinici e le lesioni sono presenti in tutte le aree corporee classiche (Favrot et al., 2010).

Una volta che la dermatite atopica è stata considerata come una possibile diagnosi, si dovrà seguire un corretto iter di esclusione per confermarla o riconsiderarla (Deboer and Hillier, 2001a).

E' importante quindi prendere in considerazione ed escludere l'infestazione e la dermatite allergica da pulci, l'allergia alimentare e la presenza di ectoparassiti (*Sarcoptes spp.*, *Demodex spp.*, *Cheyletiella spp.*). La dermatite allergica da pulci è una malattia altamente pruriginosa e tipicamente localizzata nella regione dorso-

lombare e alla base della coda. È quindi sempre consigliabile attuare un trattamento e un controllo ambientale delle pulci. Per escludere la presenza di *Sarcoptes spp.*, *Demodex spp.*, *Cheyletiella spp.* e le infezioni da dermatofiti, dovrebbero essere eseguiti raschiati cutanei e colture, seguite da trattamenti mirati in caso di positività. Una volta escluse le forme parassitarie e trattate le infezioni micotiche o batteriche, se persiste il prurito, si procede all'esclusione dell'allergia alimentare mediante la somministrazione di una dieta ipoallergenica, o dieta di eliminazione, per 8-10 settimane. Se si ottiene una riduzione del prurito, è poi necessario confermare la diagnosi di allergia alimentare provocando la comparsa dei sintomi mediante il test di provocazione, ovvero la somministrazione della dieta precedente. Se la dieta non ha condotto a nessun miglioramento clinico, o la provocazione non ha effetti, si può emettere diagnosi di dermatite atopica (Miller et al., 2013; Noli and Toma, 2011).

Come ultimo passo, una volta diagnosticata clinicamente la dermatite atopica, possono essere svolte le prove allergologiche per fornire ulteriori elementi di prova a dimostrazione della diagnosi. È importante tenere presente che i test allergologici, a causa dei risultati spesso falsamente positivi o negativi, non possono essere adeguatamente utilizzati come test di screening. Numerosi cani clinicamente sani possono infatti presentare reazioni positive al test e un numero apprezzabile di cani con sintomi clinici compatibili con la dermatite atopica risulta invece essere negativo a tutti i tipi di test allergici. Se ne raccomanda quindi l'esecuzione solo dopo che è stata ottenuta una diagnosi e si vogliono identificare gli allergeni responsabili a scopo terapeutico. In base ai risultati vengono infatti selezionati gli allergeni che devono essere incorporati nelle formulazioni per l'immunoterapia, di cui si parlerà in seguito; in alcuni casi inoltre, la conoscenza degli allergeni responsabili della patologia può permettere di porre maggiore attenzione ai fattori ambientali che contribuiscono all'esposizione allergenica (Deboer and Hillier, 2001a; Miller et al., 2013).

I test allergologici si dividono in due gruppi:

- **Test d'intradermoreazione**

Il test d'intradermoreazione, o *prick test*, si effettua iniettando una piccola quantità di estratto allergenico, adeguatamente diluito, nello spazio intradermico cutaneo, dove risiedono i mastociti sensibilizzati grazie alla presenza di IgE allergene-specifiche sulla loro superficie. L'allergene, legandosi alle IgE, induce degranolazione mastocitaria e formazione del pomfo nel punto d'inoculo, che, in caso di prova positiva, può essere visualizzato in pochi minuti (fig. 15) (Hillier and Deboer, 2001).



Figura 15. Test d'intradermoreazione effettuato sul torace di un cane atopico. Numerose positività, di diversa entità, sono presenti e corrispondono alla formazione di pomfi eritematosi (Noli and Toma, 2011).

Il test d'intradermoreazione è quindi molto sensibile, poiché ricalca la patogenesi della malattia, ma tuttavia, comporta diversi svantaggi:

- prima di eseguire l'esame occorre sospendere la somministrazione di antiinfiammatori e antistaminici per evitare di ottenere risultati falsamente negativi;
- le femmine in calore possono avere risultati falsamente negativi a causa dell'interferenza con gli steroidi sessuali;
- la prova non può essere condotta su cani con dermatite generalizzata;

- la liberazione di catecolamine, che avviene negli animali sotto stress (come spesso succede negli animali portati a visita) può inibire la formazione di pomfi;
- alcuni farmaci anestetici interferiscono con il test, ad esempio, l'acepromazina per il suo effetto antistaminico e gli oppioidi per la capacità di indurre degranulazione mastocitaria;
- una scorretta preparazione, concentrazione, conservazione e tecnica di iniezione possono indurre risultati falsamente negativi o positivi;
- inoltre il test necessita di tosatura di una certa area del pelo, a volte sedazione, e di una certa esperienza nell'esecuzione e nell'interpretazione dei risultati (Hillier and Deboer, 2001).

- **Test sierologici**

I test sierologici rivelano le IgE presenti nel siero prima che queste siano fissate ai mastociti cutanei, per questo motivo il test può essere meno specifico e sensibile, ma presenta alcuni importanti vantaggi:

- assenza di rischio per il paziente (non necessita di sedazione, annulla il rischio di reazioni anafilattiche);
- non necessita di tosatura;
- si può effettuare in pazienti in calore e con dermatite generalizzata;
- i risultati sono interpretabili in maniera oggettiva;
- secondo gli studi esaminati, che purtroppo risultano però non del tutto esaustivi, sembra esserci una bassa probabilità che le terapie in corso, o pregresse, influenzino i risultati dei test sierologici (Miller et al., 2013; Noli and Toma, 2011).

Il siero dell'animale viene messo a contatto con gli estratti dell'allergene, gli anticorpi che non si legano vengono rimossi mediante soluzioni di lavaggio, mentre le IgE che si legano all'antigene sono rilevate grazie a dei reagenti specifici, e quantificate poi con metodi colorimetrici (fig. 16), fluorimetrici o radiometrici (fig.17), a seconda della tecnica usata (Deboer and Hillier, 2001b; Miller et al., 2013).

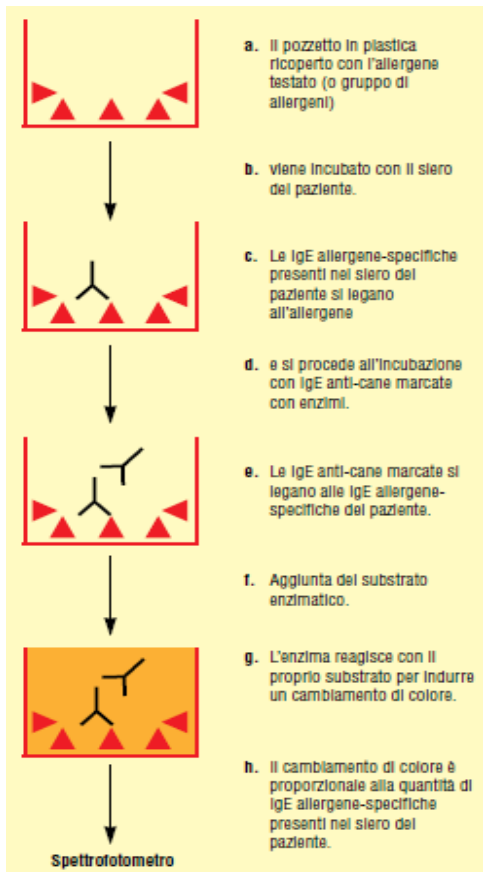


Figura 16. Test immunoenzimatico per la ricerca di IgE allergene-specifiche (Codner and Griffin, 1999).

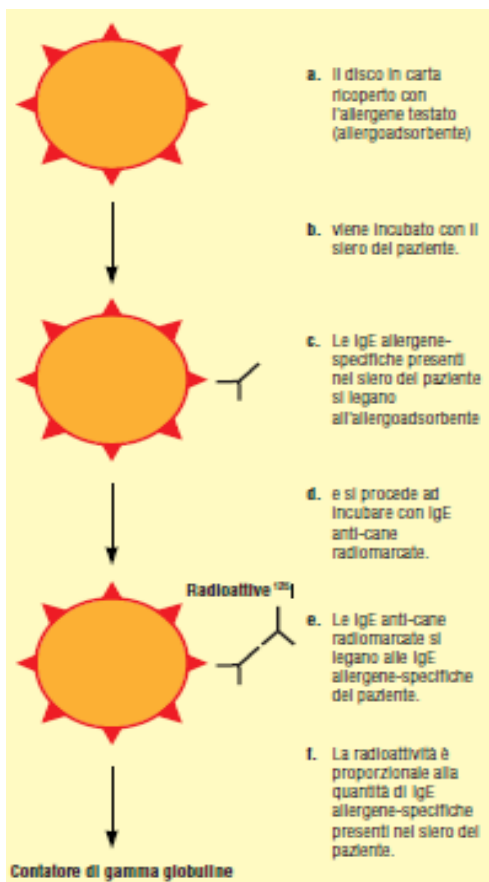


Figura 17. Test di radio-allergo-adsorbimento per le IgE allergene-specifiche (Codner and Griffin, 1999).

3.4 INDICI PER LA DETERMINAZIONE DELLA GRAVITÀ DELLA MALATTIA

Per la determinazione della gravità della malattia sono stati validati degli indici utili nella valutazione dell'estensione e della progressione delle lesioni, e dell'intensità del prurito, anche nei pazienti in terapia.

- **GRAVITÀ DELLE LESIONI**

Un metodo comunemente utilizzato per quantificare clinicamente i danni riportati nei cani con la dermatite atopica è l'Indice di Gravità ed Estensione della Dermatite Atopica Canina (CADESI). La prima versione del (CADESI) è stata proposta nel 1997 (Olivry et al., 1997). Il metodo si basava sulla valutazione dell'eritema, delle escoriazioni e della lichenificazione in 23 diverse aree del corpo, con una scala di gravità costituita da quattro gradi: da 0 (normale) a 4 (molto grave). Nel 2002 (Olivry et al., 2002a; Olivry et al., 2002b), per la seconda versione del CADESI, il numero di aree del corpo esaminate è stato portato a 40, mantenendo uguali le lesioni da valutare ed i gradi. Nel tentativo di generare una scala della malattia che fosse testata per validità e affidabilità, nel 2007 (Olivry et al., 2007) un comitato dell'allora *International Task Force on Canine Atopic Dermatitis* ha proposto una terza versione del CADESI. Nell'indice CADESI-03 le regioni del corpo da analizzare sono diventate 62, è stata aggiunta l'alopecia autoindotta come quarta lesione per fornire una indicazione indiretta del grado di prurito, ed è stata ampliata la scala di gravità delle lesioni da quattro a sei gradi, così ripartiti: normale (punteggio 0), lesioni lievi (punteggio 1), lesioni moderate (punteggio 2-3) e lesioni gravi (punteggio 4-5). Grazie ai contenuti, ai criteri, all'affidabilità inter- ed intra-personale e alla sensibilità ai cambiamenti, l'indice CADESI-03 è stato validato per la valutazione della gravità della malattia nel tempo, ed è stato, per lungo tempo, l'unica scala considerata valida (Olivry et al., 2007).

Dopo 5 anni di utilizzo è apparso però chiaro che il numero di siti e lesioni da valutare era troppo elevato, e questa versione occupava troppo tempo per l'esecuzione. La scala CADESI-03 necessitava quindi di essere rivista al fine di migliorarne la praticità e ridurre il tempo necessario per l'esecuzione. Per questo nel 2014 (Olivry et al., 2014) è stata creata una nuova versione, il CADESI-4,

semplificato rispetto alla sua versione precedente per il numero di siti del corpo da osservare (20 al posto di 62, che corrispondono ai siti più colpiti in genere nei cani atopici) (fig. 18), e per le lesioni da analizzare (eritema, lichenificazione e alopecia/escoriazioni) valutate con un punteggio da 0 a 3 in ogni sito. Il CADESI-4 è stato dimostrato avere una soddisfacente validità, affidabilità e sensibilità ai cambiamenti. In media, il tempo di esecuzione del CADESI-4 è un terzo rispetto a quello del CADESI-03. Sono inoltre stati inseriti dei parametri di riferimento per valutare lo stato della malattia in base alla somma dei punteggi, che corrispondono a lieve (minore o uguale a 10), moderato (fino a 35), grave (oltre a 35) (Olivry et al., 2014).

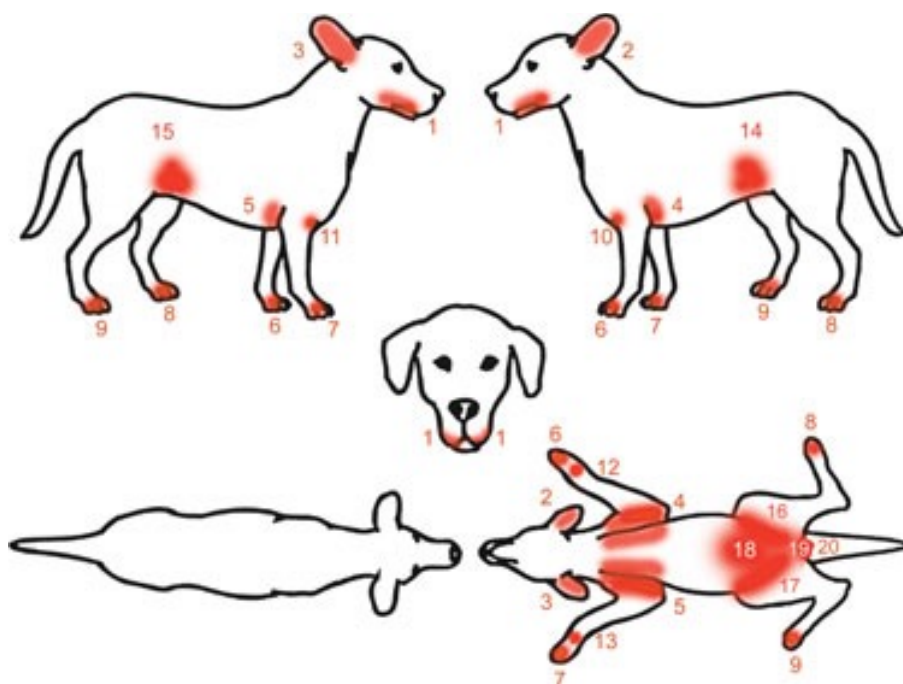


Figura 18. Siti del corpo valutati nell' *Indice di Gravità ed Estensione della Dermatite Atopica Canina (CADESI)-4* (Olivry et al., 2014).

• **INTENSITÀ DEL PRURITO**

Sono state studiate diverse scale per cercare di quantificare, nella maniera meno soggettiva possibile, l'intensità del prurito valutando aspetti comportamentali, frequenza e gravità degli episodi di grattamento.

Il più recente indice per la valutazione dell'intensità del prurito è il PICAD (*Pruritus Index for Canine Atopic Dermatitis*) (Carlotti et al., 2009). Nella scala PICAD, il prurito è classificato in funzione della sua intensità e frequenza su otto diverse aree del corpo (orecchie, testa, tronco/ascelle, addome, estremità anteriori, estremità posteriori, arti anteriori e posteriori, zona ano-genitale).

L'intensità e la frequenza sono così valutate (Carlotti et al., 2009):

- Frequenza degli episodi di grattamento:

0	Nessuno	No prurito.
1	Occasionali	Una volta, o meno di una volta, al giorno.
2	Abbastanza frequenti	Da alcune a diverse volte al giorno, ma in alcuni periodi l'animale proprio non si gratta.
3	Frequenti	L'animale viene visto grattarsi con una certa continuità.
4	Quasi permanenti	L'animale viene visto grattarsi continuamente (trascorre più tempo a grattarsi che a non farlo).

- Intensità del prurito:

0	Nessuna	No prurito.
1	Bassa	L'animale mostra scarsa attenzione quando si gratta e/o lecca per periodi molto brevi (pochi secondi).
2	Moderata	L'animale è concentrato quando si gratta e/o lecca per brevi periodi (diversi secondi).
3	Importante	L'animale appare molto nervoso quando si gratta e/o lecca per lunghi periodi (da 1 a pochi minuti).
4	Grave	L'animale potrebbe essere aggressivo quando si gratta e/o lecca per lunghi periodi (diversi minuti), e non riesce a fermarsi quando gli viene chiesto.

Un altro sistema, ormai poco utilizzato, è la scala analogica visuale (PVAS *Pruritus Visual Analog Scale*) costituita da una scala lineare di 11 punti che serve a misurare il grado di prurito (fig. 19), con un punteggio crescente da 0 a 10 che corrisponde ad una maggiore gravità delle manifestazioni pruriginose (Olivry et al., 2007).

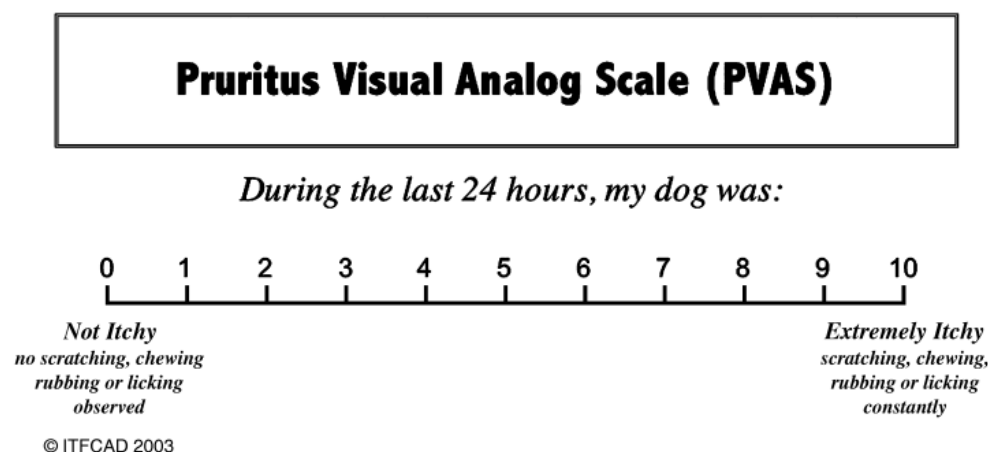


Figura 19. *Scala PVAS (Pruritus Visual Analog Scale)* (Olivry et al., 2007).

In seguito alla PVAS, è stata sviluppata, nello studio di Hill et al. (2007), una scala per misurare la gravità del prurito nei cani sulla base dei risultati ottenuti comparando 4 precedenti scale di valutazione del prurito sottoposte al proprietario dell'animale: una scala numerica da 0 a 5; una con sei categorie di sintomi comportamentali scatenati dal prurito; un'altra con sei descrittori di gravità, ed, infine, la scala analogica visuale di gravità. La combinazione più gradita ai proprietari è stata quella che teneva contemporaneamente in considerazione il punteggio di gravità delle lesioni pruriginose, i disturbi comportamentali indotti dal prurito stesso e la scala analogica visuale di misurazione del prurito (fig. 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.

Extremely severe itching/almost continuous
Itching doesn't stop whatever is happening, even in the consulting room (needs to be physically restrained from itching)

Severe itching/prolonged episodes
Itching might occur at night (if observed) and also when eating, playing, exercising or being distracted

Moderate itching/regular episodes
Itching might occur at night (if observed), but not when eating, playing, exercising or being distracted

Mild itching/a bit more frequent
Wouldn't itch when sleeping, eating, playing, exercising or being distracted

Very mild itching/only occasional episodes
The dog is slightly more itchy than it was before the skin problem started

Normal dog – I don't think itching is a problem

Figura 20. *Scala di valutazione del prurito*, costituita da una combinazione di parametri dermatologici, comportamentali e visuali, tesa a diminuire la soggettività della valutazione da parte del proprietario (Hill et al., 2007).

3.5 TERAPIA

A causa dell'eziologia multifattoriale e delle variazioni soggettive della malattia, non esiste un protocollo unico utilizzabile per tutti i pazienti affetti da dermatite atopica. Le misure terapeutiche sono destinate ad alleviare il prurito, trattare le infezioni complicanti, e prevenire le esacerbazioni della malattia, restituendo al paziente una qualità di vita dignitosa. Un approccio terapeutico adeguato dovrà quindi tener presente di diversi fattori (Noli and Toma, 2011).

- **Riduzione dell'esposizione agli allergeni e ai fattori scatenanti**

Tra i principali allergeni e fattori scatenanti la dermatite atopica troviamo acari, polvere, muffe, pollini, pulci, allergeni di natura ambientale etc. L'eliminazione risulta spesso impossibile ma alcuni accorgimenti permettono talvolta di ridurre il loro impatto nella vita dell'animale (Miller et al., 2013).

Le glicoproteine degli acari della polvere *Dermatophagoides spp.* sono risultate in tutto il mondo gli allergeni più comuni nei cani con dermatite atopica (Hill and Deboer, 2001). La riduzione degli acari e dei loro allergeni nella casa di un paziente con ipersensibilità può essere molto utile nella teoria, ma risulta molto difficile nella pratica. Alcune misure che si possono prendere a tal scopo sono l'eliminazione dei tappeti dall'ambiente di vita del cane, l'uso di coprimaterassi impermeabili, l'uso di acaricidi sulle superfici quali il benzoato di benzile (Swinnen and Vroom, 2004), ed una frequente e accurata aspirazione e lavaggio dell'ambiente (Arlan and Platts-Mills, 2001).

La dieta di eliminazione è consigliata in tutti i cani con prurito non stagionale, per determinare se in questi pazienti gli allergeni alimentari contribuiscono ai segni clinici. Anche se è già stata verificata la presenza di ipersensibilità verso alcune componenti alimentari durante l'iter diagnostico, è consigliato rivalutare questo aspetto nel corso della malattia, soprattutto se la terapia antiinfiammatoria non è più efficace o non lo è a lungo. Infatti, i cani atopici spesso nel tempo acquisiscono nuove ipersensibilità, e lo sviluppo di un' allergia alimentare potrebbe funzionare da causa favorente la riacutizzazione della malattia (Hillier and Deboer, 2001).

Per il cane affetto da dermatite atopica è inoltre molto importante attuare un preciso e attento protocollo di lotta contro i parassiti cutanei, in particolare le pulci, che permetta il controllo sia delle forme adulte sia di quelle immature (Miller et al., 2013).

Qualsiasi sia il tipo di allergene coinvolto, i bagni frequenti con formulazioni non irritanti ed acqua tiepida, riescono a eliminare buona parte degli allergeni e dei microbi attaccati alla cute del paziente (Noli and Toma, 2011). L'uso frequente degli shampoo, in particolar modo le formulazioni disinfettanti o antiseborroiche, può avere però un effetto irritante, per questo motivo è consigliata l'associazione con formulazioni dalle proprietà lenitive per la pelle (Olivry et al., 2010a).

- **Trattamento e prevenzione delle infezioni cutanee**

Le infezioni cutanee e dell'orecchio sono le ragioni più comuni per cui lesioni e prurito subiscono un rapido peggioramento nei cani con dermatite atopica. Se viene identificata la presenza di infezione batterica o sovraccrescita di lieviti tramite la combinazione di segni clinici, esame citologico e/o culturale, è indicata la terapia antimicrobica, attuata in genere utilizzando prodotti topici, con l'aggiunta, nei casi più gravi, di farmaci per via orale (Miller et al., 2013). Per le infezioni della pelle è consigliato inoltre anche l'uso di shampoo o soluzioni medicate contenenti molecole antibatteriche (ad esempio clorexidina, lattato di etile, triclosan) e/o antifungine (ad esempio miconazolo e ketoconazolo) (Olivry et al., 2010a).

Per le infezioni cutanee localizzate si utilizzano pomate, creme, gel o salviettine contenenti antisettici (ad esempio clorexidina), antibiotici (mupirocina, acido fusidico, clindamicina o altri) o farmaci antifungini (ad esempio miconazolo, clotrimazolo, ketoconazolo, terbinafina). Se l'infezione è grave o presente in forma diffusa, è necessario l'uso di antibiotici o farmaci antifungini sistemici (Olivry et al., 2010a).

- **Desensibilizzazione nei confronti degli allergeni responsabili della malattia**

L'ASIT (*Allergen-specific immunotherapy*) consiste nel somministrare quantità gradualmente crescenti dell'estratto allergenico a cui il soggetto è risultato essere positivo ai test allergologici, al fine di migliorare i sintomi associati all'esposizione con l'allergene causale. Grazie alla sua modalità d'azione, l'immunoterapia è l'unico intervento che permette di prevenire lo sviluppo dei sintomi e di alterare il decorso della malattia a lungo termine. È particolarmente indicata nei soggetti il cui prurito è presente tutto l'anno, al fine di evitare trattamenti cortisonici continuativi o per lunghi periodi (Frew et al., 2009).

Non sempre però questa terapia permette di ottenere un miglioramento della qualità della vita o una riduzione nell'uso dei corticosteroidi; secondo recenti dati i pazienti ottengono dei miglioramenti apprezzabili nel 60-80 per cento dei casi, e non prima di sei/dodici mesi di terapia (Loewenstein and Mueller, 2009).

A causa del ritardo nella comparsa dei benefici, l'immunoterapia deve essere continuata per almeno 1 anno prima di poterne valutare correttamente l'efficacia e, per mantenere una buona qualità della vita, può essere necessario l'uso temporaneo di farmaci anti-infiammatori. Non ci sono attualmente segnalazioni che riportino interferenze tra l'immunoterapia e la concomitante somministrazione di farmaci anti-infiammatori topici o sistemici (Olivry et al., 2010a).

- **Controllo del prurito e dell'infiammazione**

Il controllo del prurito e dell'infiammazione viene attuato tramite l'uso di steroidi, inibitori della calcineurina e antistaminici, nonostante i dati sulla loro efficacia siano però contrastanti, probabilmente a causa del ruolo marginale dell'istamina nell'induzione dei segni clinici (Noli and Toma, 2011). Alcuni antistaminici possono inoltre indurre sedazione come effetto secondario, e questo può essere positivo in quei cani che presentano disturbi del sonno associati al prurito (Olivry and Bizikova, 2013).

I cortisonici si legano ai recettori citosolici dei glucocorticoidi, regolando l'espressione genica della cellula e la trascrizione proteica, ed esercitando una grande

varietà di effetti sistemici tra cui l'azione anti-infiammatoria necessaria per ridurre il prurito (Dip et al., 2013).

L'uso di cortisonici topici è consigliato nelle lesioni localizzate e per trattamenti di breve durata. L'utilizzo a lungo termine può portare alla comparsa di effetti collaterali come l'assottigliamento della cute, la formazione di comedoni e cisti follicolari superficiali. Se i sintomi sono troppo gravi o estesi da essere controllati con formulazioni topiche, è necessario l'uso di glucocorticoidi orali fino alla completa remissione dei sintomi. Se i segni clinici non migliorano rapidamente, il cane deve essere mantenuto per un lungo periodo al più basso dosaggio e alla più bassa frequenza di somministrazione degli steroidi che permetta il controllo dei sintomi clinici (Olivry and Bizikova, 2013).

L'uso di glucocorticoidi orali è controindicato in presenza di concomitanti infezioni batteriche della pelle. Gli effetti negativi dei glucocorticoidi (come poliuria, polidipsia, polifagia, *calcinosis cutis*, predisposizione allo sviluppo di infezioni urinarie e talvolta alla demodicosi) sono proporzionali al dosaggio e alla durata della somministrazione (Dip et al., 2013). Per ridurre il dosaggio, e quindi gli effetti avversi, è consigliabile l'associazione con farmaci che permettano di risparmiare nell'uso degli steroidi, quali ad esempio l'antistaminico trimeprazina (Olivry et al., 2010a) o il supplemento di acidi grassi (Sævik et al., 2004).

La ciclosporina e il tacrolimus (la prima per uso sistemico, il secondo per uso topico) sono molecole che bloccano l'attività della calcineurina, inibendo l'attivazione, indotta dalle citochine, delle cellule che avviano la risposta immunitaria cutanea e mediano le reazioni allergiche (Dip et al., 2013). Dopo aver iniziato la somministrazione di ciclosporina, la comparsa di un soddisfacente effetto benefico non può essere valutata prima di quattro-sei settimane. Durante le prime 2 settimane di somministrazione della ciclosporina, la somministrazione di un breve ciclo di glucocorticoidi orali può aumentare la velocità di miglioramento clinico (Steffan et al., 2006).

Negli Stati Uniti e nell'Unione europea è stata recentemente approvata una nuova molecola per il controllo e il trattamento del prurito associato alla dermatite allergica:

l'Oclacitinib, un inibitore delle Janus-chinasi, selezionato per la sua rapidità d'azione e la sua attività contro le citochine JAK1-dipendenti. Le Janus chinasi sono coinvolte nella trasduzione del segnale di molte citochine pro-infiammatorie, pro-allergiche e pruritogeniche, come l'interleuchina (IL) -31, una citochina sovraespressa nell'infiammazione cutanea dei cani atopici. È stato dimostrato che l'Oclacitinib inibisce la funzione di IL-31, e riduce anche significativamente il prurito indotto nei cani da IL-31 (Cosgrove et al., 2013; Gonzales et al., 2013). L'attività dell'oclacitinib non è limitata agli effetti contro il prurito, poiché possiede anche pronunciate proprietà anti-infiammatorie, grazie alla capacità di inibire la funzione di citochine pro-infiammatorie e pro-allergiche, quali IL-2, IL-4 e IL-6 (Cosgrove et al., 2013).

Un nuovo approccio per il controllo dell'infiammazione prevede la somministrazione, sottocutanea o per via topica, dell'interferone- ω ricombinante felino (rFeIFN- ω). Gli interferoni sono citochine che possono essere indotte da batteri e virus, e svolgono un ruolo importante nel sistema immunitario. Essi possiedono proprietà antivirali, antiproliferative ed immunomodulatrici. Nei cani atopici, l'IL-4 (una citochina prodotta dalle cellule Th2) viene espressa in quantità superiori rispetto agli individui sani, mentre l'espressione dell'IFN- γ (prodotto dalle cellule Th1) è soppressa. L'elevato rapporto IL-4 / IFN- γ , indicativo di una risposta immunitaria Th2 dominante, comporta la liberazione di elevate quantità di IgE allergene-specifiche nei pazienti atopici. L'uso dei rFeIFN- ω sembra in grado di regolare lo squilibrio tra i livelli delle citochine Th1 e Th2 (Litzlbauer et al., 2014).

- **Ripristino della barriera cutanea**

Grazie alle recenti acquisizioni si è compreso che anche il ripristino della barriera cutanea sembra essere un elemento fondamentale nel trattamento della dermatite atopica. Nei capitoli successivi verranno trattate le molecole utilizzate a questo scopo, anche se, vista la loro recente introduzione nella pratica clinica, gli studi che ne valutano l'efficacia risultano a volte incompleti (Olivry and Bizikova, 2013). Questi aspetti verranno trattati estesamente nel capitolo 5.

4 ALTERAZIONI MORFOLOGICHE E FUNZIONALI DELLA BARRIERA CUTANEA

Sebbene la patogenesi della dermatite atopica non sia ancora stata ben delucidata, appare ormai chiaro che nei soggetti affetti da questa patologia è presente una barriera cutanea alterata. Se queste alterazioni siano causate da un difetto immunitario primario che provoca l'infiammazione della cute (ipotesi *inside-outside*), o se lo stato infiammatorio che caratterizza la dermatite atopica sia il risultato di un difetto primario nella barriera cutanea (ipotesi *outside-inside*), non è ancora stato chiarito (Elias et al., 2008). La chiave per risolvere questo dibattito potrebbe risiedere nel fatto che lo studio delle lesioni, a stadi di sviluppo della malattia differenti, rileva degli aspetti diversi e delle sovrapposizioni. Ad esempio, in alcuni individui le lesioni sembrano comparire inizialmente per un difetto primario della barriera cutanea, mentre in altri non è così. Ma alla fine, una volta che si è verificata la sensibilizzazione allergica e l'infiammazione si è sviluppata, si verifica sempre una diminuzione della funzione di barriera cutanea, che porta a un ciclo (che si auto-perpetua) di sensibilizzazione, infiammazione e lesioni alla cute. Nel futuro, l'individuazione di difetti genetici riguardanti le diverse componenti della barriera cutanea dei cani con dermatite atopica potrebbe fornire indicazioni per una migliore comprensione delle alterazioni della funzione di barriera (Marsella et al., 2012).

4.1 METODI PER LA VALUTAZIONE DELL'INTEGRITÀ DELLA BARRIERA CUTANEA

Nella pratica clinica si utilizzano alcuni metodi utili per valutare la funzionalità e l'integrità della barriera cutanea, anche in corso di terapie.

- **PERDITA DELL'ACQUA TRANS-EPIDERMICA (TEWL)**

L'integrità della barriera cutanea può essere valutata oggettivamente, in modo non invasivo, tramite la misurazione della perdita di acqua trans-epidermica (*transepidermal water loss*, TEWL) (Marsella et al., 2011). L'acqua, insieme alle proteine e ai lipidi, conferisce allo strato corneo caratteristiche di morbidezza, flessibilità ed elasticità, necessarie per impartirgli la possibilità di adattarsi ai movimenti dei muscoli e delle articolazioni. Lo stato d'idratazione è regolato da sostanze, presenti nei corneociti, capaci di legare l'acqua (come i NMF), e dalla qualità e quantità dei lipidi e delle proteine presenti. Nell'uomo infatti il 35-38% dell'acqua contenuta nello strato corneo è legato alle proteine dell'envelope dei corneociti e ai lipidi intercellulari, la restante parte si trova in forma libera (Bouwstra et al., 2003). A livello dello strato corneo, l'acqua evapora con un meccanismo definito "*Trans Epidermal Water Loss*" o "*Perspiratio Insensibilis*", che consiste nell'evaporazione costante ed impercettibile di acqua a livello dello strato più esterno dell'epidermide (Kasting and Barai, 2003); se però viene meno la normale struttura della barriera cutanea, diminuisce la capacità dello strato corneo di trattenere l'acqua e il TEWL aumenta (Shimada et al., 2007).

Ci sono due modi di misurare il TEWL: con un evaporimetro a camera aperta o a camera chiusa. I dispositivi a camera aperta (fig. 19) sono costituiti da una sonda che comprende una camera di diffusione cilindrica aperta, con due sensori (uno per l'umidità e uno per la temperatura) che rilevano il gradiente di vapore acqueo che li attraversa. Durante le registrazioni con questo dispositivo la sonda deve essere tenuta in posizione perpendicolare in modo che il vapore acqueo possa scorrere senza ostacoli su entrambi i sensori, e in alcune regioni del corpo dell'animale questo costituisce spesso una limitazione importante del sistema. Inoltre, i tempi di registrazione sono relativamente lunghi rispetto ai sistemi a camera chiusa, e le correnti d'aria, indotte dall'ambiente o dal corpo dell'animale in prossimità del

cilindro aperto, possono influire sulla lettura. Per ovviare ai limiti dei dispositivi a camera aperta sono stati creati dei sistemi a camera chiusa che, a differenza di quelli aperti, non sono influenzati dai flussi d'aria nelle vicinanze della sonda, i tempi di misurazione sono inferiori, e il TEWL può essere misurato con qualsiasi orientamento. Anche se l'evaporimetro a camera chiusa è più facile da usare rispetto ai dispositivi a camera aperta, la sua tendenza a diventare saturo in condizioni di elevata perdita di acqua costituisce uno svantaggio nella determinazione del TEWL (Cohen et al., 2009; Marsella et al., 2011).



Figura 21. *Evaporimetro a camera aperta* (Hightower et al., 2010)

Entrambi i sistemi presentano quindi dei vantaggi e degli svantaggi ma i valori che si ottengono con i due metodi risultano comunque sovrapponibili (Shah et al., 2005).

Negli esseri umani, tra differenti siti anatomici, sono state riscontrate variazioni del TEWL; questo valore sembra inoltre essere influenzato da diversi fattori, tra cui il più importante è costituito dall'età del paziente (Nikolovski et al., 2008).

Studi condotti in medicina umana (Boralevi et al., 2008; Lee et al., 2006; Werner and Lindberg, 1985), rivelano che il TEWL è più alto nei soggetti affetti da dermatite atopica rispetto ai soggetti di controllo, anche nelle aree clinicamente non affette da lesioni (Werner and Lindberg, 1985); questo non si evidenzia nei soggetti affetti da sintomi respiratori di natura atopica che però non manifestano la dermatite. Il grado di incremento del TEWL può essere messo in correlazione con la gravità della dermatite atopica (Gupta et al., 2008).

Come nell'uomo, anche nel cane la misurazione del TEWL riflette lo stato di integrità e funzionalità della barriera cutanea (Shimada et al., 2008). Nello studio di Hightower et al. (2010) è stato misurato il TEWL in un campione di 24 cani atopici e 21 cani normali standardizzati per razza, età e luogo di convivenza. Sono stati riscontrati valori più alti del TEWL nei cani affetti da dermatite atopica rispetto ai soggetti di controllo sani, anche prima del contatto con l'allergene (nella cute clinicamente non affetta), soprattutto nei siti predisposti allo sviluppo delle lesioni e negli animali più giovani (fig. 20). Questi risultati andrebbero a confermare l'ipotesi che nella barriera cutanea sono presenti delle alterazioni di natura primaria, che riducendo l'integrità della cute la rendono più permeabile. L'ulteriore aumento dei valori di perdita di acqua transepidermica che si verifica in seguito alla fase di sensibilizzazione con l'allergene riflette un peggioramento delle condizioni della barriera cutanea ed è dovuto probabilmente all'infiammazione che si genera al contatto con l'allergene (Hightower et al., 2010).

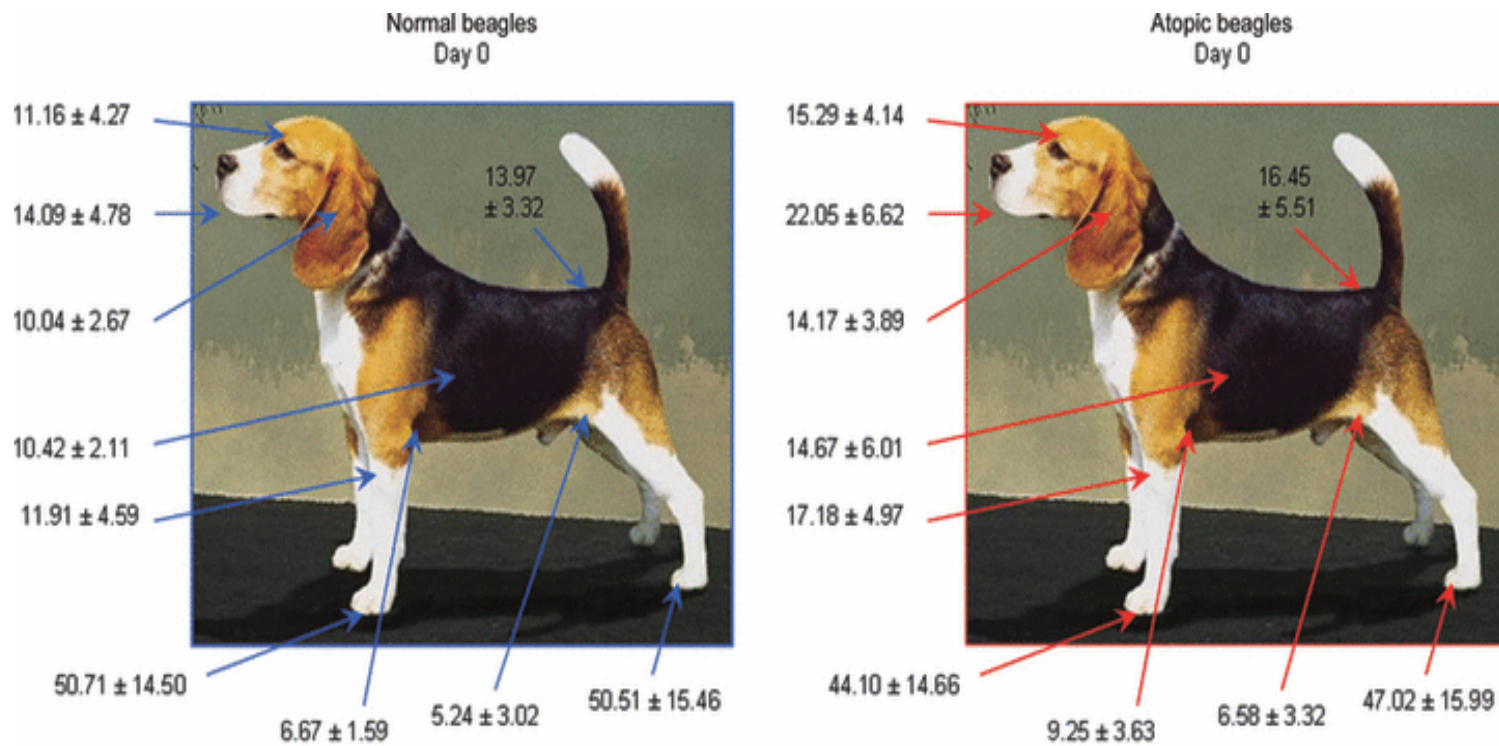


Figura 22. Media (\pm deviazione standard) dei valori di perdita di acqua transepidermica (TEWL) ($\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$) in cani di razza beagle, normali e atopici, prima dell'esposizione agli allergeni, in differenti regioni corporee (Hightower et al., 2010).

Tra i valori del TEWL e l'indice CADESI-03 è stata riscontrata una correlazione, ad ulteriore conferma della validità del TEWL come metodo per valutare la gravità della malattia o per valutare i risultati degli interventi volti a migliorare la barriera cutanea nei cani (Zajac et al., 2014). Inoltre, a differenza dell'indice CADESI, la misurazione del TEWL permette di valutare la gravità delle alterazioni anche nella cute clinicamente normale, alterazioni che altrimenti passerebbero inosservate (Marsella et al., 2011).

Tuttavia la validità e l'affidabilità delle misurazioni del TEWL nel cane rimane per alcuni autori controversa: la variabilità del TEWL nei cani è maggiore rispetto a quanto riportato in medicina umana e questo potrebbe essere attribuito alla presenza dei peli e del movimento del soggetto durante la misurazione (Marsella et al., 2011). Inoltre per Lau-Gillard e colleghi, ci sarebbe una variazione troppo alta tra un sito e un altro, tra un giorno e l'altro e tra cane e cane, per raccomandarne l'uso, sia con metodiche a camera aperta che a camera chiusa (Lau-Gillard et al., 2009).

- **CAPACITANZA ELETTRICA**

La capacitance elettrica della cute è un altro parametro utilizzato per valutare la funzionalità della barriera cutanea. Essa misura indirettamente l'idratazione dello strato corneo e fornisce una stima della capacità cutanea di trattenere l'umidità. La capacitance elettrica si misura con uno strumento chiamato "Corneometro" che sfrutta il principio fisico per cui la zona superficiale della cute (strato corneo) offre una resistenza elettrica al passaggio della corrente tanto più bassa quanto più la cute è idratata, ed è espressa in unità arbitrarie (UA) o unità corneometriche (Oh and Oh, 2009).

Sebbene anche questo parametro sia fortemente influenzato da fattori propri dell'individuo quali età e sesso (Nicander et al., 1997; Young et al., 2002), e relativi alla stagione e all'ambiente in cui il soggetto vive (Nicander and Ollmar, 2000), valori più alti di capacitance indicano una migliore idratazione cutanea (Fluhr et al., 2002). Nei cani atopici, la capacitance elettrica, sembra essere diminuita solo in presenza di lesioni cutanee (Chesney, 1995).

4.2 ALTERAZIONI DELLE PROTEINE DELLO STRATO CORNEO

4.2.1 Alterazioni nelle proteine strutturali

In medicina umana è stato riscontrato già da tempo che la cute di alcuni pazienti atopici presenta una minor espressione della filaggrina, sia nei soggetti che presentano lesioni cutanee, sia in quelli clinicamente non affetti (Marsella et al., 2011). Di più recente segnalazione è invece la scoperta di mutazioni nel gene che codifica per la filaggrina (FLG), ritenute responsabili della perdita della fisiologica funzione di questa proteina (Irvine and Mclean, 2006). Le mutazioni di FLG sembrano essere un fattore di rischio importante per la comparsa della dermatite atopica, e, di tutti i geni precedentemente indagati, il gene FLG è attualmente considerato il candidato più importante per lo sviluppo di questa malattia. Le alterazioni della barriera che ne derivano sembrano infatti predisporre il soggetto ad una maggior sensibilizzazione allergica e all'insorgenza precoce della malattia (Weidinger et al., 2007). Da quando i primi studi in medicina umana portarono alla luce le due mutazioni R501X e 2282del4 nel gene codificante per la filaggrina, sono state scoperte anche altre mutazioni che affliggono la popolazione, specialmente nei pazienti con la forma estrinseca (caratterizzata da livelli elevati di IgE), inducendo a pensare che una primaria alterazione nella struttura della filaggrina faciliti la penetrazione e sensibilizzazione all'allergene (Marsella et al., 2009). Nei soggetti eterozigoti verso queste mutazioni, l'espressione della filaggrina è diminuita, mentre negli omozigoti è completamente abolita (Palmer et al., 2006).

È tuttavia importante notare che una minor espressione della filaggrina non implica necessariamente una mutazione genetica, poiché, è stato visto nell'uomo, che la filaggrina può essere ridotta anche per effetto delle citochine, in particolare IL-4 e IL-13, prodotte dai linfociti Th2 in seguito al contatto con l'allergene, notevolmente sovraesprese nella cute dei soggetti atopici. Infatti, una diminuita espressione della filaggrina è clinicamente rilevante anche nei soggetti atopici privi delle mutazioni FLG. È stato stimato che solo il 18-48% di tutti i pazienti umani affetti da dermatite atopica hanno mutazioni nel gene FLG, e rappresentano generalmente i casi più gravi e con insorgenza più precoce, mentre il 40% degli individui che presentano modificazioni nel gene FLG non hanno mai avuto segni di eczema. Questo permette

di spiegare come mai l'espressione della filaggrina è diminuita nei soggetti privi di alterazioni genetiche, ma anche perché diminuisce ulteriormente nei soggetti con mutazione FLG dopo il contatto con l'allergene (Howell et al., 2007). Il legame tra mutazioni di FLG e AD non è quindi semplice e diretto, e la dermatite atopica è il risultato di una complessa interazione tra fattori genetici ed ambientali (Henderson et al., 2008).

Anche nel cane è stata segnalata una riduzione delle proteine importanti nel processo di corneificazione/differenziazione epidermica nei pazienti con dermatite atopica (Chervet et al., 2010; Kezic et al., 2008; Marsella et al., 2009; Roque et al., 2011; Santoro et al., 2013; Theerawatanasirikul et al., 2012). Tra queste la filaggrina è senza dubbio la proteina verso la quale c'è maggior interesse da parte dei ricercatori.

La colorazione immunohistochimica della cute di cani sani, con un antisiero policlonale contro la filaggrina umana, ha mostrato che, come nell'uomo e nelle altre specie, anche nel cane la filaggrina è espressa nei granuli cheratoialini presenti nel citoplasma delle cellule dello strato granuloso (Bardagi et al., 2007).

Interpretare i risultati che si possono ottenere negli studi condotti sui cani con uno sviluppo naturale della malattia può risultare poco attendibile a causa delle grandi variazioni che esistono nella barriera cutanea di razze differenti, per l'influenza delle condizioni ambientali come temperatura e umidità, della dieta alimentare, dello stadio della malattia e della terapia topica (tipologia e frequenza). Per questo è stato identificato un modello di studio sperimentale per la dermatite atopica canina, in cui le lesioni possono essere indotte e monitorate direttamente, e dove le condizioni ambientali e alimentari sono rigorosamente controllate (Rosanna Marsella et al., 2006b). Tenendo conto di queste considerazioni sono stati condotti degli studi utilizzando cani di razza beagle nei quali lo sviluppo di prurito e lesioni cutanee era conseguente all'esposizione forzata ad un allergene di riferimento (acari della polvere, HDM - *house dust mites*). I vantaggi di questo modello di indagine sono molteplici: oltre ad essere in grado di controllare i fattori esterni che possono influenzare la funzione di barriera, rende possibile la raccolta di biopsie multiple che non possono essere prelevate nei cani atopici di proprietà privata, e controllare l'andamento delle alterazioni della cute. Le alterazioni nella funzionalità della

barriera cutanea possono essere così valutate prima e dopo il contatto con l'allergene per determinare se siano cambiamenti primari o secondari all'infiammazione indotta dall'allergene (Marsella et al., 2009).

Utilizzando questo modello sperimentale, lo studio di preparati bioptici di cani atopici ha riportato una colorazione immunoistochimica più debole e finemente granulata rispetto ai campioni prelevati dai soggetti di controllo sani, ancor prima del contatto con l'allergene, a conferma del fatto che l'espressione di questa proteina è alterata ancor prima che l'animale reagisca contro l'allergene. In seguito al contatto con l'allergene entrambi i gruppi hanno mostrato un decremento nella colorazione (fig. 21-22), interpretabile, nel gruppo degli animali atopici, come conseguenza dell'infiammazione che si sviluppa a livello cutaneo nella fase di sensibilizzazione, mentre nel gruppo di controllo sano il decremento della colorazione non si è rivelato comunque una sorpresa per gli autori considerando l'attività proteolitica nota negli acari della polvere. Questi inoltre sono in grado di modulare l'espressione di proteine come la filaggrina alterando la concentrazione del Ca^{2+} intracellulare, che a sua volta ha un effetto sul processo di cheratinizzazione. Il decremento della colorazione a livello statistico è risultato significativo però solo nei cani sani, probabilmente perché partendo da una colorazione maggiore, la differenza ottenuta con l'esposizione all'allergene è risultata più ampia e quindi più facile da apprezzare (Marsella et al., 2009).

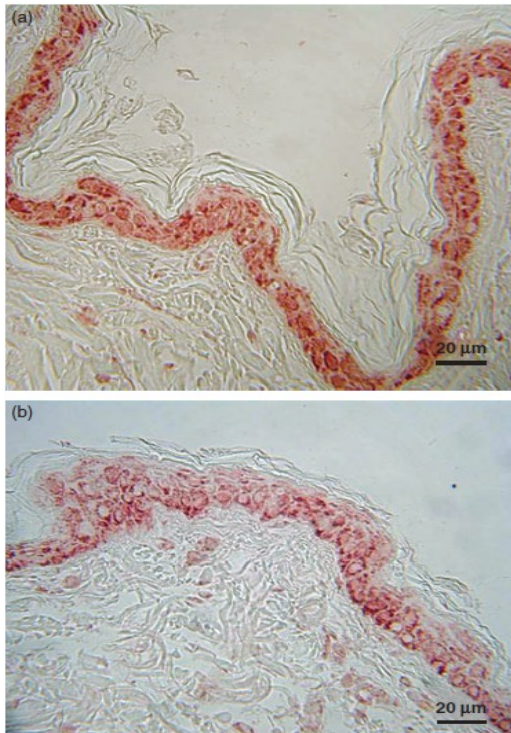


Figura 23. Colorazione immunohistochimica dell'epidermide di soggetti normali (a) prima e (b) dopo il contatto con l'allergene, utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro la filaggrina (Marsella et al., 2009).

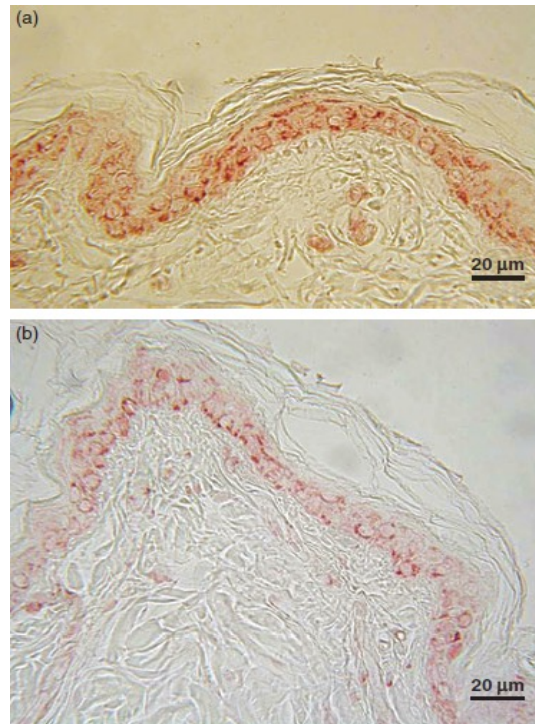


Figura 24. Colorazione immunohistochimica dell'epidermide di soggetti atopici (a) prima e (b) dopo il contatto con l'allergene, utilizzando un anticorpo policlonale diretto contro la filaggrina (Marsella et al., 2009)

Nel 2010 (Chervet et al., 2010), tramite l'immunofluorescenza indiretta, è stata segnalata l'esistenza di quattro diversi tipi di pattern nell'espressione della filaggrina. Lo studio è stato condotto utilizzando la cute di 16 cani sani e la cute di 18 cani con dermatite atopica privi di lesioni cutanee, utilizzando anticorpi specifici per il gruppo carbossi- e amino-terminale della filaggrina. Dieci cani atopici mostravano un pattern di colorazione identica a quelli sani per entrambi gli anticorpi, con una intensità di fluorescenza comparabile (categoria I, 3/18, 17%) o ridotta (categoria II, 7/18, 39%) rispetto a quella dei controlli. Al contrario, 4/18 cani (22%) mostravano la colorazione nei gruppi C-terminali, ma non nel gruppo N-terminale (categoria III). Infine, 4/18 cani (22%) hanno mostrato una colorazione normale nel gruppo N-terminale ma una colorazione non rilevabile nel gruppo C-terminale (categoria IV).

La riduzione nell' espressione della filaggrina, nei cani di categoria II, secondo l'autore sarebbe compatibile con una possibile diminuzione secondaria all'infiammazione, mentre le anomalie nei cani dalla categoria IV, e forse anche in quelli di categoria III, sarebbero indicative di mutazioni nel gene FLG che porterebbe alla generazione di una filaggrina anomala nella struttura e nella funzione (Chervet et al., 2010). Le venti e più mutazioni di FLG descritte nei pazienti umani con AD, invariabilmente introducono prematuramente un codone di terminazione, che risulta nella perdita del dominio C-terminale della proteina filaggrina (Regan et al., 2007).

Lo studio dell'mRNA della filaggrina con la RT-PCR in beagle sani e atopici prima e dopo la sensibilizzazione sperimentale agli acari della polvere ha mostrato invece un incremento dell'mRNA nei soggetti con dermatite atopica, in particolar modo dopo l'esposizione all'allergene, non associato però a un reale aumento della proteina nella cute. L'incremento dell'mRNA potrebbe essere spiegato come un meccanismo di feedback per compensare un possibile aumento della degradazione della proteina, un'alterata trascrizione della stessa, oppure l'aumento dell'attività di fattori anti-proteasi, che non permettono la scissione della profilaggrina nei monomeri di filaggrina. Queste ipotesi potrebbero spiegare come mai, in molti cani atopici, la filaggrina sia diminuita nonostante non siano state trovate alterazioni genetiche a carico del gene FLG. Dopo il contatto con l'allergene, la colorazione delle proteine con la tecnica dell'immunofluorescenza indiretta (fig. 23) mostrava un pattern di distribuzione omogeneo nello strato superiore dell'epidermide di cani normali, mentre nei cani ipersensibili la distribuzione della filaggrina appariva più irregolare ed eterogenea. In quest'ultimi, le alterazioni miglioravano dopo la risoluzione dei segni clinici indotti dall'ipersensibilità agli acari rispetto ai valori antecedenti alla provocazione. Queste osservazioni confermano che, di per sé, l'infiammazione indotta dall'allergene gioca un ruolo molto importante nella riduzione dell'espressione della filaggrina nel cane atopico, e che la risoluzione della sintomatologia clinica porta ad un miglioramento dell'espressione e della distribuzione di questa proteina (Santoro et al., 2013).

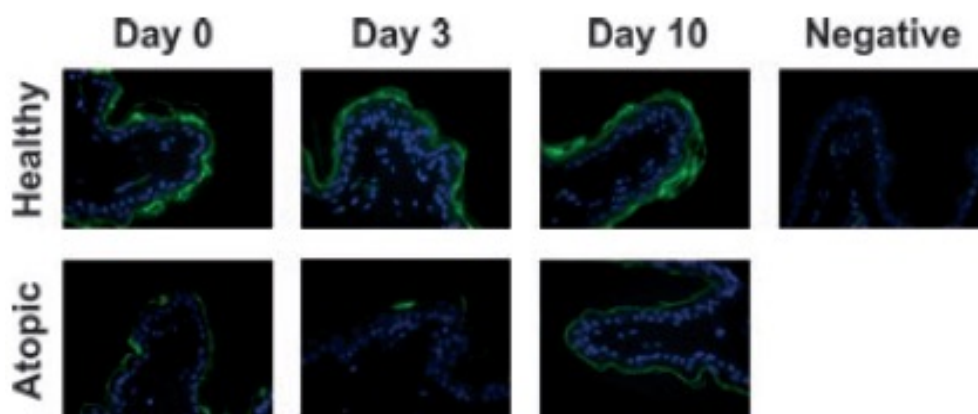


Figura 25. Colorazione della filaggrina canina tramite immunofluorescenza indiretta. La fluorescenza è rilevabile solo nello strato granuloso e nella parte inferiore dello strato corneo. Nei cani sani la distribuzione della fluorescenza appare più continua, laminare e omogenea rispetto al pattern discontinuo, visibile nei cani atopici. Le foto sono rappresentative di tutti i campioni. Giorno 0, prima dell'esposizione all'allergene; giorno 3, cute con lesioni acute; e giorno 10, risoluzione delle lesioni cutanee (Santoro et al., 2013).

Negli individui geneticamente incapaci di produrre la filaggrina, la quantità di *NMFs* è notevolmente ridotta come dimostrato da Kezic e colleghi nel 2008, e questo sembra portare a diverse conseguenze (Kezic et al., 2008). L'acido urocanico (parte degli *NMFs*), gli acidi grassi liberi e il trasportatore sodio-idrogeno NHE1 grazie alla capacità tamponante sono i principali responsabili del mantenimento del pH acido della cute. La diminuzione dei livelli di *NMFs* spiegherebbe come mai nei soggetti atopici il pH cutaneo è più alcalino rispetto ai soggetti normali. Clinicamente un aumento del valore di pH è stato correlato con un aumento della gravità della malattia (Eberlein-Konig et al., 2000). La capacità tamponante dello strato cutaneo si deve agli aminoacidi liberi idrosolubili, che costituiscono circa il 40% dei *NMFs*. Una riduzione della filaggrina, e quindi degli aminoacidi liberi compromette la capacità di mantenere il pH all'interno di un *range* fisiologico. L'aumento del pH porta ad un aumento dell'attività delle serina proteasi (SP), ad una maggior suscettibilità allo sviluppo di infezioni, ad una ridotta secrezione dei lipidi e un ridotto funzionamento degli enzimi necessari per la loro processazione; conseguenze deleterie per la funzionalità della barriera cutanea (Hachem et al., 2005; Levin et al., 2013a). Nelle condizioni normali la sovraccrescita batterica è inibita dal sistema immunitario e dal pH acido della cute; questi meccanismi difensivi sono alterati nei

soggetti atopici e ciò rende questi soggetti predisposti alla colonizzazione da parte dei batteri (Levin et al., 2013a).

In sintesi, per le conoscenze attuali, l'espressione della filaggrina appare ridotta nella cute dei cani con dermatite atopica. Sebbene non sia ancora ben chiara la relazione tra questa proteina e la malattia, come nell'uomo (Howell et al., 2007), sembra che in una frazione di cani con dermatite atopica siano presenti anomalie genetiche nel gene FLG, in particolare a livello del gruppo carbossi-terminale. Tuttavia, tali alterazioni nel cane non sono ancora state dimostrate ma sono per il momento solo ipotizzate. Inoltre, in cani con questa malattia, l'osservazione di una ulteriore, transitoria, riduzione dell'espressione della filaggrina dopo l'esposizione all'allergene, induce a pensare che ci possa essere la partecipazione anche di altri meccanismi, come l'effetto delle citochine infiammatorie prodotte in seguito allo stimolo antigenico nell'animale con ipersensibilità.

Anche l'espressione genetica delle cheratine insieme a quella dell'involucrina sono state recentemente valutate nel cane. Nella cute dei soggetti atopici, sia con lesioni visibili, che clinicamente non affetta, si è osservato un aumento nell'espressione dell'mRNA di KRT5 e KRT17, mentre KRT2, KRT14, e l'involucrina sono risultate aumentate solamente nella cute con lesioni manifeste. Questo studio ha messo in risalto quindi la presenza di una correlazione tra queste proteine e la dermatite atopica canina. Secondo l'autore dello studio, la sovraespressione di KRT5 e KRT14, insieme a quello di KRT17, un marcatore dell'iperproliferazione, e KRT2, normalmente espresso nello strato granuloso, potrebbero, almeno in parte, spiegare le caratteristiche istopatologiche delle lesioni. L'espressione di KRT5 e KRT17, essendo aumentata anche nella cute dei soggetti atopici priva di lesioni, potrebbe essere un marker sensibile di questa malattia (Theerawatanasirikul et al., 2012).

4.2.2 Alterazioni nelle proteine funzionali.

Oltre a mutazioni nei geni che codificano per le proteine strutturali dei cheratinociti, nell'uomo sono state osservate anche mutazioni nei geni che codificano per le proteine funzionali, importanti nella regolazione delle funzioni della materia vivente, come le proteasi e gli inibitori della proteasi (Levin et al., 2013b). Queste mutazioni portano ad una maggiore desquamazione compromettendo la barriera cutanea; e, insieme a quelle presenti nel gene per la filaggrina, potrebbero spiegare l'eziologia della dermatite atopica anche in quei soggetti dove non è stata rilevata una concentrazione elevata di IgE (forma intrinseca) (Vasilopoulos et al., 2004).

La desquamazione, come già visto, è un processo controllato dall'attività delle callicreine (serina proteasi), regolate a sua volta dagli inibitori delle proteasi come il LEKTI, codificato dal gene SPINK5.

In alcuni pazienti umani con dermatite atopica è stata descritta una mutazione nel gene codificante per KLK7 (callicreina 7). Questa mutazione, caratterizzata dall'inserimento di 4 paia di basi nella regione 3'UTR, porta alla perdita della normale funzionalità e ad un aumento dell'attività dell'enzima provocando una prematura degradazione dei corneodesmosomi, particolarmente a pH alcalino (Vasilopoulos et al., 2004).

In seguito, nell'uomo sono stati segnalati livelli significativamente elevati di tutte le callicreine (soprattutto KLK7) nello strato corneo dei pazienti con dermatite atopica, eccetto KLK11. L'aumento che si verifica nella cute non si riflette però a livello sierologico. Il livello di callicreine nel siero non può quindi essere considerato un marker utile per diagnosticare la malattia, e l'incremento della presenza delle callicreine nello strato corneo è probabilmente da ritenersi una risposta secondaria all'infiammazione locale, più che una alterazione specifica per la dermatite atopica (Komatsu et al., 2007).

Oltre a mutazioni nelle callicreine, nell'uomo la dermatite atopica è stata associata anche al polimorfismo nell'esone 14 (E420K) del gene SPINK5 che codifica per LEKTI (Nishio et al., 2003). Questa alterazione nel gene porterebbe ad un valore più

basso del livello dell'inibitore proteasico LEKTI, che si traduce in un aumento dell'attività delle proteasi (Roedl et al., 2009).

Le alterazioni genetiche nel gene KLK7 e SPINK5 non sono tuttavia state confermate in altri studi (Folster-Holst et al., 2005; Hubiche et al., 2007).

L'attività delle serina proteasi, oltre che per alterazioni genetiche nell'enzima o nel suo inibitore, può essere alterata per l'aumento del pH nella cute. Le serina proteasi funzionano ad un pH ottimale tra il neutro e il basico; di conseguenza, se aumenta il pH della cute, aumenta anche l'attività di questi enzimi (Hachem et al., 2005). Nell'uomo l'aumento dell'attività nelle serina proteasi, a causa della maggior degradazione dei corneodesmosomi, diminuisce l'integrità della barriera cutanea, e questo si riflette in un aumento del TEWL e dell'assorbimento percutaneo (fig.24) (Hachem et al., 2003).

L'aumento dell'attività della serina proteasi interferisce inoltre con la costruzione delle lamelle lipidiche intercellulari tramite il decremento del contenuto totale dei lipidi dello strato corneo, secondario all'aumento dell'espressione dell'attivatore proteasico PAR-2 (*protease activator receptor 2*) e alla degradazione dei due enzimi glucocerebrosidasi e sfingomielinasi, essenziali nella processazione dei lipidi (Levin et al., 2013b).

In seguito ad una maggior attività delle serina proteasi si osserva poi un aumento dell'infiammazione Th2, tramite la liberazione delle citochine IL-1 alfa e beta, che stimolano a sua volta la secrezione di IL-4. L'aumento dell'infiammazione Th2 e la secrezione di IL-4 inducono un decremento nella sintesi delle ceramidi, della loricrina, della filaggrina e una minor espressione della desmogleina-3 (Elias and Schmuth, 2009).

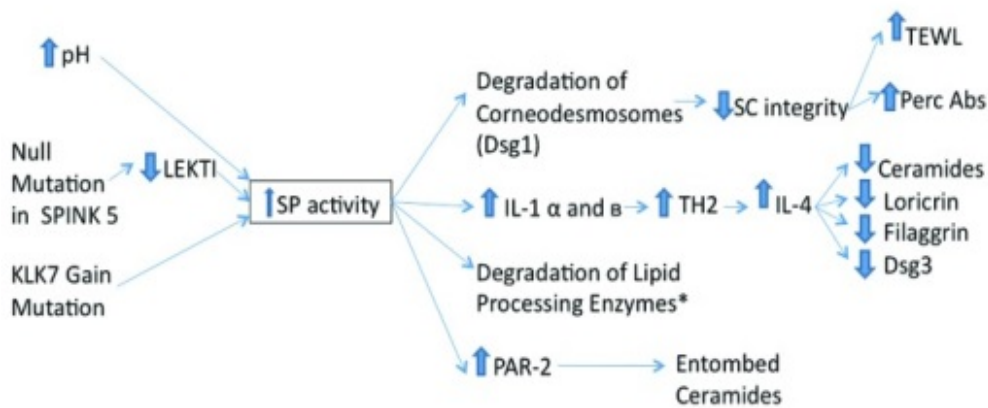


Figura 26. Conseguenze dell'aumento dell'attività delle serina proteasi nello strato corneo (Levin et al., 2013b).

Dsg 1= desmogleina 1; Dsg 3= desmogleina 3; IL= Interleuchina;

KLK7= callicreina 7; LEKTI= *lymphoepithelial Kazal-type trypsin inhibitor*;

PAR-2= *protease activator type 2 receptor*; perc abs= assorbimento percutaneo; SC= strato corneo; SP= serina-proteasi;

SPINK 5=*serine peptidase inhibitor Kazal-type 5*;

TEWL= *transepidermal water loss*

Nel cane, che ruolo assumano effettivamente le alterazioni delle proteasi e dei loro inibitori sulla patogenesi di questa malattia non è ancora ben chiaro, le informazioni disponibili sono molto limitate. Un recente studio, che ha valutato la trascrizione genica in biopsie cutanee di cani con dermatite atopica, ha riportato che esistono significative differenze nell'espressione dell'mRNA tra cani normali e atopici oltre che per callicreine e SPINK5, anche per altre proteasi come sfingosina-1-fosfato-liasi e le proteasi mastocitiche (Shona H Wood et al., 2009). Anche le cellule dell'infiltrato infiammatorio sono infatti in grado di produrre proteasi che possono contribuire ulteriormente al danneggiamento della barriera cutanea, in particolar modo, negli uomini (Karlen and Roger, 2005) e nei cani (Shona H Wood et al., 2009) affetti da dermatite atopica, è stato registrato un aumento di quelle mastocitiche; a causa di ciò non è ancora chiaro se l'aumento delle proteasi rifletta un difetto primario o sia semplicemente un'alterazione secondaria all'infiammazione della cute (Karlen and Roger, 2005).

I mastociti sono una componente importante dell'immunità innata e un aumento del numero di queste cellule si osserva nelle lesioni cutanee croniche della dermatite

atopica. Le chimosi mastocitiche (MCC) sono serina-proteasi generalmente immagazzinate insieme ad altre proteasi nei granuli dei mastociti. Il principale effetto delle proteasi mastocitiche è costituito dalla processazione e attivazione di varie sostanze quali angiotensina, metalloproteasi, procollagenasi, lipoproteine, neuropeptidi e citochine (Karlen and Roger, 2005). Per l'incremento dell'attivazione delle procollagenasi e metalloproteasi, e per la degradazione delle proteine della matrice extracellulare, le proteasi mastocitiche svolgono un ruolo importante nell'induzione della fibrosi e iperplasia tissutale tipiche delle lesioni croniche nei soggetti affetti da dermatite atopica (Karlen and Roger, 2005).

Infine la barriera epidermica nel cane può essere danneggiata anche da protesi esogene prodotte da *Staphylococcus aureus* e dagli acari della polvere (Marsella and Samuelson, 2009).

L'aumento dei processi desquamativi, indotto dall'aumento dell'attività delle proteasi, potrebbe essere la spiegazione del ridotto spessore che si osserva nello strato corneo dei siti predisposti allo sviluppo delle lesioni nell'uomo affetto da dermatite atopica (12,2 μm a dispetto dei 19,7 μm dei controlli sani di pari età e regione corporea). Uno strato corneo più sottile aumenta il rischio di penetrazione degli allergeni (Marsella and Samuelson, 2009). Nei cani, studi preliminari riportano che lo strato corneo ha uno spessore medio inferiore rispetto a quello di altre specie (13 μm), ma non esistono studi che confrontino questo valore con quello dei soggetti atopici, quindi, nonostante le molte similitudini con l'uomo, non è possibile dire con certezza se anche nei cani atopici le alterazioni geniche delle proteasi e degli inibitori portino ad un assottigliamento dello strato corneo (Marsella and Samuelson, 2009).

4.3 ALTERAZIONE DEI LIPIDI DELLO STRATO CORNEO

Le recenti acquisizioni nel campo della dermatite atopica hanno messo in evidenza l'esistenza di alterazioni, oltre che nella componente proteica, anche nell'organizzazione e nella composizione dei lipidi dello strato corneo. Queste anomalie permetterebbero agli allergeni di oltrepassare la barriera con maggior facilità, innescando la reazione immunitaria (Th2) tipica dell'ipersensibilità verso queste molecole (Kondo et al., 1998).

4.3.1 Alterazioni nei corpi lamellari e nelle lamelle lipidiche

Grazie a Inman et al. nel 2001, al fine di studiare le differenze strutturali all'interno dei lipidi dello strato corneo, preparati istologici di cute prelevata da cani normali e atopici sono stati fissati nel tetrossido di rutenio e osservati al microscopio elettronico (fig. 25). La deposizione delle lamelle lipidiche nello strato corneo della cute canina atopica è apparsa decisamente irregolare ed eterogenea rispetto a quanto visibile nella cute dei soggetti normali. Molte aree dello strato corneo si presentavano infatti prive di lamelle lipidiche e, quando presenti, mostravano una struttura anormale o incompleta (Inman et al., 2001).

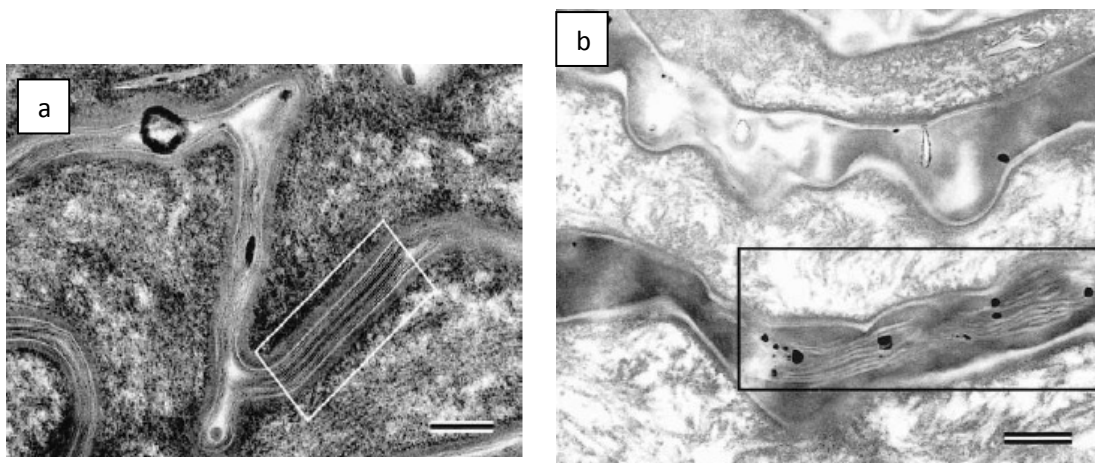


Figura 27. *Strato corneo della cute osservato tramite microscopia elettronica a trasmissione.* (a) lamelle lipidiche ben formate (rettangolo bianco) riempiono gli spazi intercellulari dello strato corneo di cani normali. Bar =110 nm; (b) nella cute clinicamente normale dello strato corneo dei cani atopici, quando presenti, le lamelle lipidiche intercellulari presentano una struttura anomala e incompleta (rettangolo nero). Bar=75 nm (Inman et al., 2001)

Continuità e spessore delle lamelle lipidiche intercellulari, valutati grazie ad una scala semi quantitativa (punteggio crescente da 1 a 5 attribuito dagli esaminatori), sono risultati significativamente ridotti nella cute dei soggetti atopici, anche se privi di lesioni, rispetto alla cute dei cani normali (tab. 1).

Skin Specimen	Continuity	Thickness
Nonlesional atopic	2.5 (2.0-2.6)	2.0 (1.9-2.4)
Normal	3.5 (3.3-3.8)	3.0 (2.6-3.6)

*Median (95% confidence interval)

Tabella 1. *Punteggi semiquantitativi per la continuità e lo spessore delle lamelle lipidiche dello strato corneo canino (Inman et al., 2001).*

Nonostante questo, i corpi lamellari, che nello strato granuloso estrudono i lipidi per formare le lamelle lipidiche, sono risultati comparabili nel numero e nella morfologia a quelli dei soggetti normali (Inman et al., 2001).

Secondo Piekutowska et al. (2008), dall'osservazione alla microscopia elettronica è evidente, inoltre, la presenza di spazi intercellulari più ampi, spesso privi di lamelle lipidiche, che contribuiscono ad una prematura separazione dei corneociti. Questo studio conferma che tali cambiamenti si possono osservare nei soggetti affetti da dermatite atopica anche in assenza di lesioni cutanee, e quindi, come per la maggior parte delle alterazioni proteiche, anche in questo caso le anomalie sarebbero da ritenersi di natura primaria (Piekutowska et al., 2008).

Marsella et al. (2010) ha studiato il comportamento della barriera cutanea nei soggetti sani e nei soggetti atopici prima e dopo la sensibilizzazione sperimentale agli acari della polvere. In seguito al contatto con l'allergene, i cani beagle atopici sviluppano grave dermatite pruriginosa, mentre non sono state osservate lesioni cutanee nei soggetti di controllo. A livello ultrastrutturale, prima di essere sensibilizzati con l'allergene, i beagle atopici mostravano gravi anomalie nell'organizzazione delle lamelle lipidiche e spazi intercellulari più ampi contenenti materiale lipidico anormale; inoltre, a differenza dei soggetti di controllo sani, nei beagle atopici erano visibili i corpi lamellari all'interno dei corneociti (fig. 26).

L'estrusione dei corpi lamellari avviene, in condizioni fisiologiche, nello strato granuloso; questo ritrovamento denota quindi un rilascio incompleto di questi granuli.

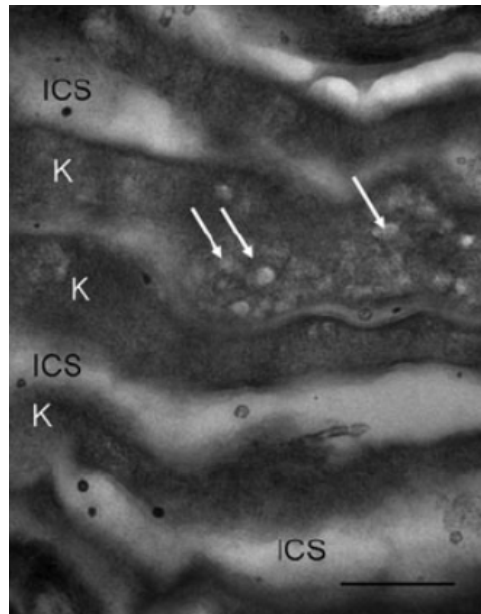


Figura 28. Osservazione dello strato corneo tramite microscopia elettronica. Sono visibili i corpi lamellari all'interno dei corneociti dei soggetti atopici. K=cheratinociti; ICS=spazio intercellulare. Bar=20nm (Marsella et al., 2010).

Dopo la fase di sensibilizzazione con l'allergene, non sono stati osservati cambiamenti apprezzabili nei cani normali. Alcune modificazioni caratterizzavano invece la cute dei cani atopici: i corpi lamellari non erano più visibili all'interno dei corneociti, e gli spazi intercellulari dello strato corneo apparivano ulteriormente aumentati. In essi era visibile un abbondante quantitativo di materiale lipidico anomalo altamente disorganizzato, risultato probabilmente di un aumento dell'estrusione dei corpi lamellari da parte dei cheratinociti, al fine di rendere disponibile un maggior quantitativo di lipidi per la riparazione della barriera cutanea (Marsella et al., 2010).

Possiamo quindi concludere che nei soggetti atopici, sia interessati da lesioni cutanee sia clinicamente non affetti, sono presenti anomalie nell'organizzazione dello strato corneo, e che l'esposizione di questi soggetti all'allergene ne peggiora le alterazioni.

4.3.2 Alterazioni nella composizione lipidica dello strato corneo

Diversi studi effettuati in medicina umana (Imokawa, 2001; Jungersted et al., 2008; Nardo et al., 1998) hanno analizzato la composizione lipidica dello strato corneo di soggetti atopici e soggetti normali, evidenziando anomalie sia nel quantitativo totale dei lipidi, sia nel rapporto tra le varie classi e sottoclassi.

Nello studio di Shimada et al. (2009), condotto su 10 cani atopici e 30 cani normali, è risultato un minor quantitativo di ceramidi in rapporto agli altri lipidi totali: $24,4 \pm 5,6\%$ nella cute con lesioni e $25,6 \pm 3,8\%$ in quella clinicamente non affetta, rispetto al valore dei soggetti di controllo ($31,4 \pm 6,9\%$), mentre il quantitativo di colesterolo e di acidi grassi è rimasto sostanzialmente lo stesso. Inoltre è stata evidenziata una correlazione negativa tra il TEWL e il quantitativo di ceramidi; il valore è risultato significativamente alto sia nella cute con lesioni ($94,3 \pm 38,8 \text{ g/m}^2/\text{h}$) sia in quella integra ($28,8 \pm 9,5$) nei cani con AD, rispetto ai controlli sani ($12,3 \pm 2,3$), indicando il possibile contributo di questi lipidi nella regolazione della permeabilità cutanea. La valutazione dell'idratazione cutanea ha fornito invece risultati comparabili tra i soggetti sani ($24,2 \pm 8,8 \text{ AU}$) e soggetti atopici privi di lesioni nella cute ($25,2 \pm 6,6$), mentre il valore nei soggetti atopici con lesioni cutanee è risultato significativamente più basso ($15,8 \pm 7,0$) (Shimada et al., 2009). In questo studio però, l'età media dei soggetti atopici supera di quasi il doppio quella dei soggetti normali, la diminuzione delle ceramidi può quindi essere una conseguenza dovuta anche all'età, e non unicamente allo status atopico (Shimada et al., 2009). Nell'uomo è noto già da tempo infatti che il contenuto di ceramidi diminuisce notevolmente con l'aumentare dell'età; diversità nella composizione lipidica sono riportate anche in base al sesso (Denda et al., 1993).

Al fine di eliminare le maggiori variabili che giocano un ruolo importante nel determinare la composizione lipidica dell'epidermide, nello studio di Reiter et al. (2009) è stato analizzato il quantitativo di lipidi in un campione di soggetti standardizzati per età, sesso e razza, costituito da 14 cani sani e 14 cani atopici (fig. 27). Come nello studio precedente, il quantitativo di ceramidi (CER) è apparso diminuito nei soggetti atopici, soprattutto CER[EOS] (ceramide 1) e CER[EOP]

(ceramide 9), mentre il quantitativo di colesterolo è risultato aumentato rispetto al gruppo di controllo (Reiter et al., 2009).

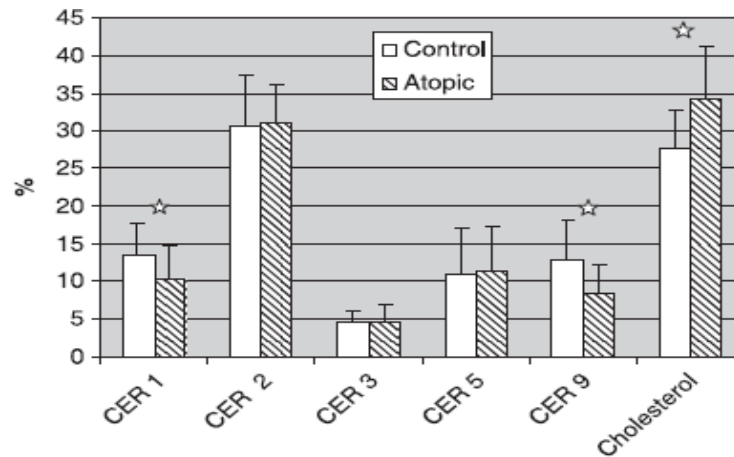


Figura 29. Percentuali medie (deviazione standard) del quantitativo di ceramidi e colesterolo dello strato corneo dei pazienti con dermatite atopica, a confronto con i soggetti sani. ☆P < 0.05 (Reiter et al., 2009)

L'aumento della sintesi del colesterolo epidermica è stato dimostrato verificarsi in risposta all'aumento del TEWL o in seguito a disturbi della barriera cutanea. È possibile, pertanto, che l'aumento della steroidogenesi avvenga semplicemente nel tentativo di ripristinare la funzione di barriera, come avviene negli stati caratterizzati da carenza di acidi grassi essenziali e nella cute trattata con detergenti o solventi lipidici (Feingold et al., 1986).

CER[EOS] è un carrier dell'acido linoleico, il quale ha un ruolo essenziale nello strato lipidico, garantendo una buona fluidità e plasticità delle lamelle lipidiche. Per questo, anche se nella cute dell'uomo rappresenta la frazione meno abbondante delle ceramidi, è il componente lipidico più importante per una barriera cutanea intatta e funzionale (Yamamoto et al., 1991). Nelle diete carenti, l'acido linoleico viene sostituito dall'acido oleico. Questo cambiamento si traduce nella formazione di corpi lamellari difettosi, non più in grado di formare lamelle lipidiche funzionali, con una conseguente instabilità della barriera lipidica ed un aumento della perdita d'acqua (Elias et al., 1980). Anche nella cute dei pazienti atopici umani è stato trovato un significativo aumento dei livelli di acido oleico (Yamamoto et al., 1991).

CER[EOP] appartiene alla stessa sottoclasse di CER[EOS], e come quest'ultima, è un carrier dell'acido linoleico. Non è ancora stato chiarito il suo ruolo nel mantenimento delle lamelle lipidiche ma, per la somiglianza strutturale con CER[EOS], si ipotizza abbia una importanza funzionale simile (Wartewig, 2007).

CER[EOS] e CER[EOP] sono quindi due classi di ceramidi con una lunga catena carboniosa da ritenersi fondamentali per la normale funzione di barriera cutanea (Mizutani et al., 2009). La diminuzione delle ceramidi di maggiori dimensioni è infatti correlata con un'alterata organizzazione lipidica, con l'aumento del TEWL, e con una maggior gravità della malattia (Janssens et al., 2012).

La diminuzione dei livelli di ceramidi nello strato corneo, oltre ad alterare la funzionalità e l'integrità della barriera cutanea, la rende maggiormente predisposta allo sviluppo di infezioni batteriche secondarie. Infatti a causa della riduzione delle ceramidi si ha una diminuzione dei livelli di sfingosina, un antimicrobico naturale all'interno dello strato corneo, che porta ad un aumento della colonizzazione batterica della cute (Arikawa et al., 2002).

Oltre a CER[EOS] e CER[EOP], studi più recenti condotti sia nella medicina umana (Ishikawa et al., 2010), sia in quella veterinaria (Yoon et al., 2011), hanno evidenziato una significativa riduzione anche di altre sottoclassi di ceramidi: CER[NS], CER[NDS], CER[NP], CER[AS], CER[NH]; sia nella cute lesionata, sia in quella non interessata dalle lesioni, senza significative differenze tra i diversi siti esaminati.

Ciascuna classe di ceramidi può essere ulteriormente suddivisa in base alla lunghezza della catena carboniosa dell'acido grasso che le esterifica. Nel 2010, lo studio condotto da Ishikawa et al. (2010) sulla cute interessata da lesioni di 8 pazienti atopici umani, ha mostrato che le specie di CER[NS], CER[NDS], CER[NH], CER[AS], e CER[AH], con un numero maggiore di atomi di carbonio (>50 atomi di carbonio) tendono ad essere espresse ad un livello minore, mentre le specie più piccole (<40 atomi di carbonio) di CER[NS], CER[NDS], e CER[AS] sono maggiormente espresse rispetto a gli individui sani. Per esempio, nella sottoclasse CER[NS], è stato osservato un incremento dei livelli di ceramidi esterificate con

acidi grassi a catena carboniosa molto corta (34 atomi di carbonio totali, chiamate C34 CERs). L'aumento delle CER[NS]C34 risultava correlato significativamente con un decadimento della funzionalità della barriera cutanea monitorata tramite la misurazione del TEWL (Ishikawa et al., 2010).

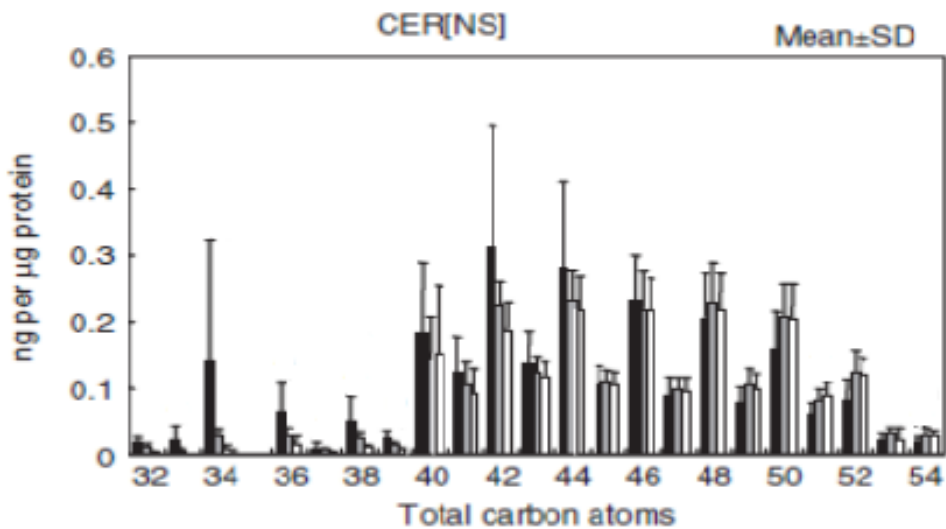


Figura 30. Valori medi, per ciascuna specie di CER[NS], nei siti affetti da dermatite atopica (con e senza lesioni), e nella cute dei soggetti sani, indicati rispettivamente in nero, grigio e bianco (Ishikawa et al., 2010).

Lo stesso studio riporta una correlazione tra la riduzione dei livelli delle CERs esterificate con acidi grassi a catena carboniosa più lunga e l'incremento del TEWL. Questi risultati hanno mostrato, per la prima volta, che non solo la tipologia di ceramide, ma anche la lunghezza della catena lipidica, può giocare un ruolo importante nella funzionalità della barriera cutanea nei soggetti affetti da dermatite atopica. Le stesse alterazioni sono osservabili, con un grado minore, anche nella cute non interessata dalle lesioni (Ishikawa et al., 2010).

Queste osservazioni vanno in parallelo con lo studio, nella cute, degli acidi grassi liberi: è stata osservata una riduzione degli acidi grassi a catena lunga (maggiori di C24) nei pazienti atopici, sia nella cute interessata, che non, dalle lesioni. La presenza degli acidi grassi a catena corta (C16 e C18) è risultata invece aumentata (Smeden et al., 2014).

L'enzima *elongation of very long chain fatty acid* (ELOVL) è il responsabile dell'allungamento degli acidi grassi a lunga catena. ELOVL4 ed ELOVL1 per esempio, sono responsabili per la formazione degli acidi grassi con una lunghezza pari o superiore a 24 atomi di carbonio (Janssens et al., 2014). Nello studio di Vasireddy et al. (2007), l'inattivazione dell'enzima ELOVL4 in un campione di ratti, ha portato ad un decremento nella lunghezza della catena carboniosa degli acidi grassi. Inoltre l'inattivazione dell'enzima, è stato correlato con una significativa riduzione degli acidi grassi ω -idrossilati che costituiscono le ω -idrossiceramidi, stabilendo un legame tra l'enzima ELOVL4 e la sintesi delle ω -idrossiceramidi. Una ridotta espressione o attività di questi enzimi potrebbe essere quindi la causa della diversa composizione lipidica dei soggetti affetti da dermatite atopica (Vasireddy et al., 2007).

La relazione tra la lunghezza degli acidi grassi liberi e la composizione delle ceramidi è in linea con la recente ipotesi che acidi grassi e ceramidi possano avere una via di sintesi comune (Ohno et al., 2010). Essendo gli acidi grassi liberi parte della struttura delle ceramidi, la correlazione tra le due classi lipidiche suggerisce che un ridotto numero di atomi di carbonio osservato nelle ceramidi dei pazienti affetti da dermatite atopica, provenga da una ridotta lunghezza della catena degli acidi grassi liberi. Tuttavia, per stabilire con certezza questo rapporto, sono necessari ulteriori studi (Janssens et al., 2014; Ohno et al., 2010).

Nello studio di Popa et al. (2011), il confronto della composizione lipidica dello strato corneo tra cani sani e cani affetti da dermatite atopica, tramite cromatografia su strato sottile ad alta prestazione (HPTLC), ha confermato la presenza di un ridotto quantitativo di ceramidi, in particolare delle ceramidi che si legano alle proteine dell'envelope (CER[OS], CER[OP] e CER[OH]). Lo studio inoltre ha evidenziato un'abbondante presenza di glucosilceramidi ($39 \pm 17 \mu\text{g}/\text{mg}$ proteina), normalmente presenti in tracce. Secondo l'Autore questo incremento potrebbe suggerire l'esistenza di una via anomala nel metabolismo delle ceramidi, per esempio una carenza, o una ridotta attività, dell'enzima beta-glucocerebrosidasi, l'enzima che converte la glucosilceramide in ceramide (Popa et al., 2011b), già dimostrato nella medicina umana (Chang-Yi et al., 1997). La ridotta attività dell'enzima beta-

glucocerebrosidasi potrebbe essere dovuta allo spostamento del pH dello strato corneo verso valori più elevati (Popa et al., 2011b). Come già discusso, è noto che negli atopici, soprattutto nei bambini, il pH cutaneo è maggiore rispetto ai soggetti di controllo (Sparavigna et al., 1999), e questo aumento del pH è stato dimostrato indurre, oltre che la degradazione, da parte degli enzimi serina-proteasi, dei corneodesmosomi, anche la degradazione degli enzimi che processano i lipidi come la beta-glucocerebrosidasi (Hachem et al., 2005).

In medicina umana è stata osservata una riduzione anche dell'enzima sfingomielinasi, considerata parzialmente responsabile per la riduzione dei livelli di ceramidi presenti nello strato corneo dei soggetti atopici (Baranowsky et al., 2004).

Secondo lo studio di Hara et al. (2000), la carenza di ceramide nell'uomo può essere collegata anche ad una nuova via metabolica catalizzata dall'enzima, finora sconosciuto, sfingomielina deacilasi (*SM-deacylase*). Questo enzima compete con i substrati degli enzimi sfingomielinasi e beta-glucocerebrosidasi, idrolizzando la sfingomielina e la glucosilceramide, e diminuendo così la loro disponibilità per la sintesi di ceramidi. L'attività di questo enzima negli atopici sembra essere maggiore di almeno cinque volte nella cute con lesioni, e di almeno tre volte in quella clinicamente non affetta, rispetto a quella dei soggetti sani (Hara et al., 2000); sembra inoltre essere specifico dei soggetti affetti da dermatite atopica e non viene rilevato nei pazienti con dermatite da contatto. L'aumento dell'attività di questo enzima non sembra quindi essere legato ai cambiamenti che si verificano nel processo patogenetico generale dell'infiammazione cutanea (Imokawa, 2009). Nel cane, per le conoscenze attuali, non è stata segnalata la presenza di questo enzima e di questa via metabolica come possibile spiegazione ad un minor livello di ceramidi nei cani atopici. In futuro, date le somiglianze con la malattia nell'uomo, un miglioramento delle tecniche molecolari e cromatografiche potrebbe rivelare l'espressione di questo enzima.

Infine, dallo studio di Bäumer et al. (2011) è risultato che la cute dei cani affetta da dermatite atopica presenta quantità nettamente inferiori di sfingosina-1-fosfato (S1P) (0,18 nmol/mg proteine) rispetto ai soggetti di controllo (0,63 nmol/mg proteine) (Baumer, 2011), un antinfiammatorio naturale, prodotto di degradazione delle

ceramidi (Baranowsky et al., 2004). In parallelo alle osservazioni fatte sulle biopsie cutanee, anche i livelli plasmatici e sierici di S1P sono risultati significativamente più bassi negli atopici rispetto ai cani normali. Sempre nello stesso studio, campioni di epidermide tratti dalle biopsie, sono stati omogeneizzati in terreno di coltura, e addizionati con S1P. Si è visto che la S1P viene rimossa più rapidamente rispetto al normale, dopo circa 24h, la concentrazione di S1P è apparsa infatti notevolmente più bassa nei campioni prelevati da cani atopici, suggerendo un'attività più elevata dell'enzima S1P-liasi (SGPL1) (Baumer, 2011). Un aumento del tasso di trascrizione del gene codificante per l'enzima SGPL1 era già stato segnalato sia nei soggetti atopici con lesioni cutanee che privi di lesioni, e questa maggiore espressione potrebbe spiegare la riduzione dei livelli di S1P e la sue maggior degradazione (Shona Hiedi Wood et al., 2009).

In sintesi, sebbene un articolo riporti livelli normali di ceramidi nella cute priva di lesioni cliniche (Farwanah et al., 2005), è stata dimostrata una riduzione delle ceramidi totali e di alcune sottoclassi, sia libere, sia legate alle proteine dell'envelope corneo, nei cani con dermatite atopica presentanti lesioni o clinicamente non affetti. La riduzione delle ceramidi sembra essere quindi un'alterazione primaria della barriera cutanea, associata ad un aumento del TEWL. Nonostante siano state rilevate anomalie in alcune vie metaboliche, ulteriori studi saranno necessari per chiarire l'origine di queste diversità nella composizione lipidica.

5 APPROCCI TERAPEUTICI PER IL RIPRISTINO DELLA BARRIERA CUTANEA

Negli ultimi anni sono stati compiuti notevoli progressi riguardo la comprensione della patogenesi della dermatite atopica nel cane. Così, se prima l'approccio terapeutico era concentrato sul controllo dell'infiammazione, ora prevale un approccio di tipo combinato che comprende terapie volte alla riparazione della barriera cutanea, sia con l'applicazione topica di prodotti contenenti una combinazione di ceramidi e acidi grassi, sia tramite l'integrazione orale di acidi grassi essenziali. È importante ricordare che l'approccio al trattamento della dermatite atopica canina dovrebbe essere multimodale e a misura di ogni singolo paziente, secondo l'età e la durata della malattia. L'istruzione del cliente svolge un ruolo essenziale nella comprensione dell'importanza di un approccio a lungo termine al fine di minimizzare le recidive e, in questo contesto, l'uso di prodotti atti a correggere la barriera cutanea può essere di grande beneficio. In medicina umana, l'uso prolungato di creme idratanti può avere un effetto notevole sulla barriera cutanea e sull'espressione genica di proteine coinvolte nella barriera cutanea (Buraczewska et al., 2009; Grether-beck et al., 2012). Questo effetto è variabile a seconda della formulazione utilizzata. È ragionevole ipotizzare che lo stesso possa essere vero nei cani; quindi, ulteriori studi sono necessari al fine di poter identificare gli ingredienti e le formulazioni corrette da utilizzare (Marsella, 2012).

5.1 TERAPIE TOPICHE

Spesso i termini idratante ed emolliente sono erroneamente usati come sinonimi. Le creme idratanti contengono come ingrediente principale l'acqua insieme ad altri agenti umettanti per idratare lo strato corneo, mentre le creme emollienti contengono classicamente una formulazione a base di lipidi. L'acqua, al contrario di quanto si possa pensare, contribuisce alla secchezza e al peggioramento della barriera cutanea, in quanto il contatto prolungato con l'acqua può distruggere lo strato corneo; inoltre l'acqua evapora rapidamente dopo l'applicazione (Tsai, 1999). Lozioni a base di acqua possono quindi peggiorare l'integrità della barriera cutanea e predisporre allo sviluppo della dermatite atopica. Pertanto, nel corso della ricerca in questa malattia,

lo studio di unguenti o creme emollienti ha trovato maggior sviluppo rispetto alle creme idratanti (Rendell et al., 2011).

Da alcuni anni sono presenti in commercio dei prodotti spot-on contenenti ceramidi, colesterolo ed acidi grassi, la cui funzione è quella di ricostituire la barriera cutanea. L'efficacia di questi preparati è stata testata in alcuni studi con risultati spesso promettenti. Nello studio condotto da Piekutowska et al. (2008), l'applicazione di un prodotto spot-on a base di ceramidi 1, 3 e 6, acidi grassi e colesterolo (*Allerderm® Spot-on; Virbac Laboratory*) per sei volte, ad intervalli di tre giorni tra una somministrazione e l'altra, ha portato a un aumento, e ad una miglior organizzazione, delle lamelle lipidiche, visibile tramite l'osservazione al microscopio elettronico. Lo spazio intercellulare, nello strato corneo dei soggetti sani, è risultato essere occupato dalle lamelle lipidiche per l'89,5%. La percentuale scende al 31,8% nei soggetti affetti da dermatite atopica, e raggiunge invece valori statisticamente simili alla normalità dopo il trattamento (74%) (fig. 29) (Piekutowska et al., 2008).

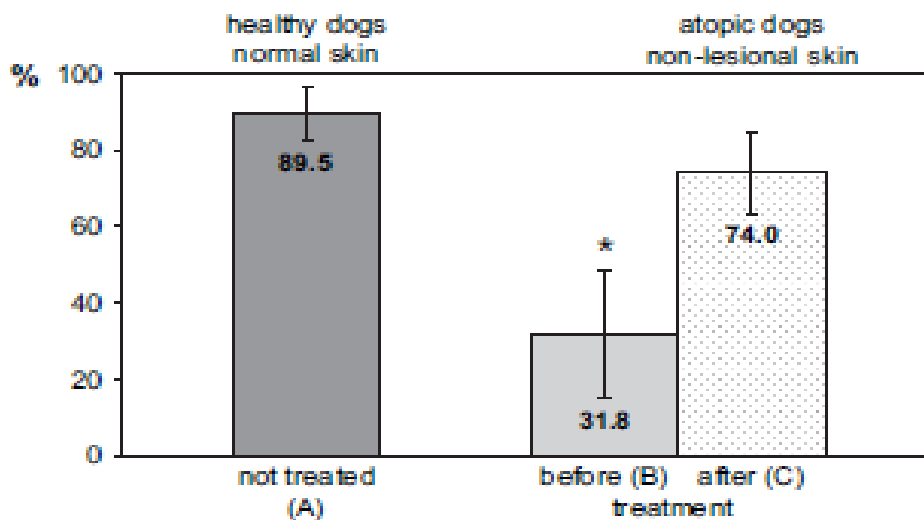


Figura 31. Valutazione quantitativa dello spazio intercellulare totale occupato dalle lamelle lipidiche nella parte inferiore dello strato corneo di cani atopici e cani normali. I valori relativi alla cute di cani normali non trattati (A) non sono significativamente diversi da quelli degli atopici trattati con il complesso lipidico (C), mentre in entrambi i gruppi i valori sono significativamente maggiori rispetto a quelli ottenuti da pazienti atopici non trattati (Piekutowska et al., 2008).

Inoltre, tramite l'analisi con l'HPTLC (*high performance thin-layer chromatography*), nello studio di Popa et al. (2012), si è osservato un notevole miglioramento nella composizione lipidica dello strato corneo. Prima del trattamento, la cute dei soggetti atopici era caratterizzata da una significativa riduzione delle ceramidi totali e da un'elevata presenza di glucosilceramidi. Al termine del trattamento topico, i livelli delle ceramidi avevano raggiunto valori comparabili con quelli della cute dei soggetti sani, e la presenza di glucosilceramidi era notevolmente ridotta, come evidenziato in Tabella 2. Tra le varie classi di ceramidi, l'incremento maggiore si è osservato in CER1 e CER9 (Popa et al., 2012).

Lipid class	Normal dogs	Atopic dogs		
		Untreated	Treated	<i>P</i> *
Cholesterol	98 ± 20	84 ± 18	93 ± 21	NS
Fatty acids	117 ± 26	105 ± 20	211 ± 24	< 0.01
Ceramides	145 ± 29	108 ± 21	136 ± 23	< 0.05
GlcCer	traces	27 ± 15	Trace	< 0.01

Tabella 2. Lipidi (valori espressi come $\mu\text{g} \pm \text{SD}$ per mg di proteine) presenti nello strato corneo di cani normali e cani atopici prima e dopo il trattamento topico con *Allerderm*® *spot-on* (Virbac) (Popa et al., 2012).

Secondo gli autori questi risultati indicherebbero che l'apporto esogeno, per via topica, di alcune specifiche classi lipidiche, permetterebbe la formazione di nuove lamelle lipidiche, in particolar modo tramite l'aggregazione di queste molecole nei corpi lamellari e la loro estrusione nello spazio extracellulare, ma anche tramite la stimolazione diretta della biosintesi, come dimostrato dall'incremento di classi ceramidiche non presenti nel prodotto (Popa et al., 2012).

Se da questi due studi appare chiaro l'effetto positivo a livello ultrastrutturale e sulla composizione lipidica dello strato corneo, la dimostrazione dell'efficacia tramite studi clinici è ancora limitata.

L'applicazione dello stesso prodotto, due volte alla settimana per 12 settimane, è risultata, nello studio di Fujimura et al. (2011) portare ad una significativa riduzione dell'indice CADESI-03, particolarmente dopo le prime sei settimane di trattamento (26,0%), dovuto in prevalenza alla marcata riduzione dell'eritema (36,2%) (fig. 30) (Fujimura et al., 2011).



Figura 32. *Progressivo miglioramento delle caratteristiche cliniche di un soggetto dello studio dall'inizio del trattamento (a), dopo sei settimane (b), e dopo 12 settimane (c). Completa remissione dei sintomi dopo 18 settimane (d) (Fujimura et al., 2011).*

Anche se questi risultati sono promettenti, l'impatto di questo studio è limitato dall'esiguo numero di pazienti (8 cani) e dalla mancanza di un gruppo di controllo (Fujimura et al., 2011).

In un recente studio (Blaskovic et al. 2014), l'applicazione di uno spot on a base di oli essenziali e acidi grassi insaturi (Dermoscent Essential 6-Spot On; Laboratoire de Dermo-Cosmetique Animale) una volta alla settimana per otto settimane, ha prodotto notevoli miglioramenti nei soggetti trattati (23 cani) rispetto a quelli trattati con il placebo (25 cani), sia dell'intensità del prurito, sia della gravità delle lesioni, come riportato in Tabella 3 (Blaskovic et al., 2014).

	Treatment Day 0	Treatment Day 56	Improvement ^a with treatment	Placebo Day 0	Placebo Day 56	Improvement ^a with placebo
Total number of dogs	23			25		
Mean CADESI-03 (95% CI)	46 (29–63)	28 (18–39)	18 (4–32)	78 (41–116)	80 (44–115)	-1 (-19 to 13)
Mean pruritus (95% CI)	5.2 (4.2–6.2)	3.9 (2.7–5.2)	1.3 (0.2–2.4)	5.3 (4.3–6.3)	5.0 (4.1–6.0)	0.2 (-0.7 to 1.2)
Number of dogs with mild AD	11			9		
Mean CADESI-03 (95% CI)	25 (13–36)	15 (9–22)	9 (-1 to 20)	22 (11–32)	34 (21–48)	-13 (-21 to -5)
Mean pruritus (95% CI)	4.8 (2.9–6.6)	4.0 (1.5–6.0)	1 (-0.9 to 2.9)	3.8 (2.1–5.5)	4.0 (2.1–5.9)	-0.2 (-2.6 to 2.2)
Number of dogs with moderate– severe AD	12			16		
Mean CADESI-03 (95% CI)	66 (38–94)	40 (22–58)	24 (-1 to 50)	110 (58–163)	105 (53–157)	6 (-19 to 30)
Mean pruritus (95% CI)	5.6 (4.4–6.8)	4.1 (2.5–5.7)	1.5 (0–3.0)	6.1 (5.1–7.2)	5.6 (4.5–6.8)	0.5 (-0.5 to 1.5)

CADESI-03, canine atopic dermatitis extent and severity index-03; CI, confidence interval.

^a Improvement = Score at the beginning of the trial – Score at the end of the trial.

Tabella 3. *Dati indice CADESI-03 e indice del prurito nei cani affetti da dermatite atopica trattati con una formulazione spot-on contenente acidi grassi essenziali/oli essenziali o con il placebo (Blaskovic et al., 2014).*

Un altro studio (Jung et al. 2013) ha valutato l'effetto di una crema a base di ceramidi, colesterolo e acidi grassi in rapporto 3:1:1 (*Atobarrier Cream; Amorepacific; Korea*), sia da un punto di vista clinico, sia a livello ultrastrutturale. L'applicazione giornaliera per quattro settimane ha prodotto notevoli miglioramenti nell'indice CADESI, nell'indice per la valutazione del prurito PICAD, nel TEWL e nel livello di idratazione cutanea (fig. 31). L'osservazione al microscopio elettronico, di campioni bioptici di cute, prima e dopo il trattamento, ha permesso inoltre di evidenziare un miglioramento nell'organizzazione dei corneociti e delle lamelle lipidiche (Jung et al., 2013).

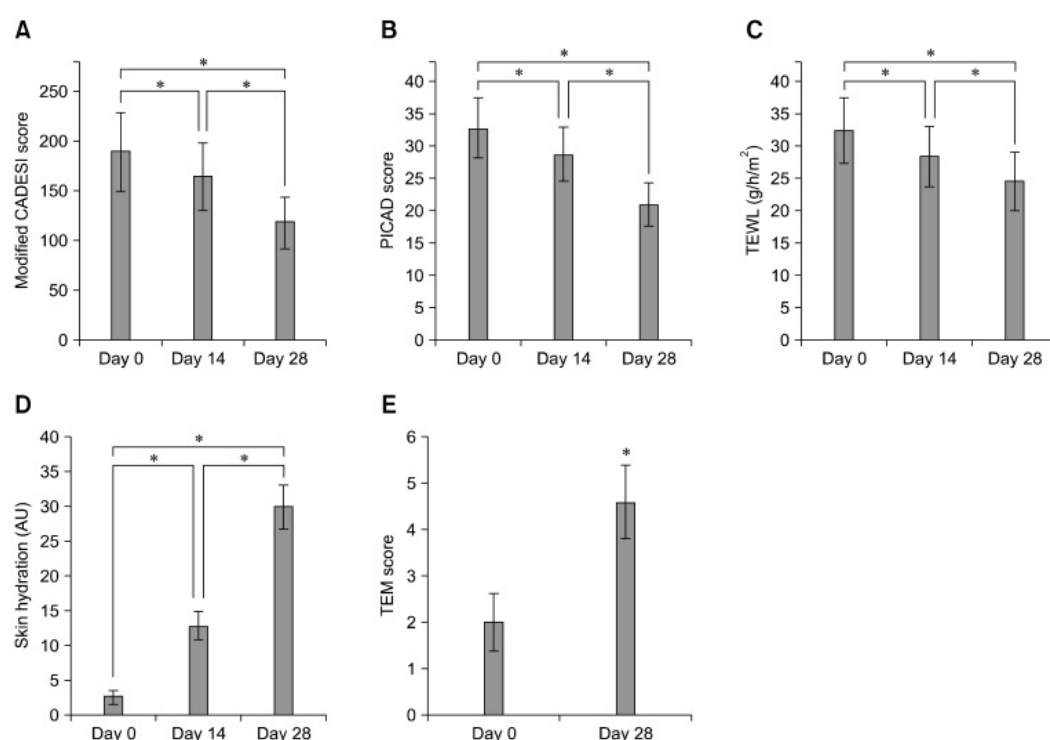


Figura 33. *Punteggi relativi ai parametri clinici e funzionali.* (A) L'indice CADESI è migliorato dopo 2 e 4 settimane di trattamento con la crema idratante a base di lipidi. (B) Il PICAD (*pruritus index for canine atopic dermatitis*) ha mostrato un graduale miglioramento nel corso del tempo. (C) Il TEWL è diminuito significativamente dopo l'applicazione della crema idratante. (D) L'idratazione della cute è aumentata più di quattro volte sia dopo 2, che dopo 4 settimane dall'inizio del trattamento. (E) I parametri (organizzazione dei corneociti, spessore e continuità dello strato lipidico) osservati tramite microscopia elettronica a trasmissione (TEM) differiscono significativamente prima e dopo l'applicazione della formulazione lipidica. I risultati sono presentati come media \pm SD. * $p < 0,001$ (Jung et al., 2013).

Oltre ai lipidi fisiologici, la crema idratante contiene anche panduratin A, una sostanza dagli effetti antimicrobici e anti-infiammatori. Data la vulnerabilità dei pazienti atopici alle infezioni batteriche della cute, è possibile che un parziale miglioramento dei sintomi, in questo studio, possa esser dovuto alla presenza di questa molecola (Jung et al., 2013).

Sono stati formulati, inoltre, dei prodotti a base di fitosfingosina, ma, al momento, le prove che ne supportino l'uso sono insufficienti. Nello studio di Bordeau et al. (2007) l'uso, in cani atopici, di uno shampoo contenente fitosfingosina (*Douxocalm*; Sogeval Laboratories Inc., Irving, TX, USA) (gruppo I), di uno shampoo spray contenente fitosfingosina ed altri ingredienti simili (gruppo II) o di uno shampoo per il controllo del prurito contenente molecole antisettiche, acidi grassi e zuccheri complessi (*Allermyl*; Virbac Animal Health) (gruppo III) ha portato un miglioramento clinico in tutti i gruppi senza alcuna differenza significativa tra essi, con una riduzione dell'indice CADESI-03 del 40, 45,9 e 45,9% rispettivamente nel gruppo I, II, III; e del prurito rispettivamente del 23,4, 22,7 e 29,8%. Dal momento che tutti gli interventi sono stati in grado di apportare beneficio alla barriera cutanea, non è possibile stabilire se la fitosfingosina fornisca un ulteriore vantaggio rispetto a qualsiasi altro bagno detergente o lenitivo (Bordeau et al., 2007).

L'applicazione topica di miscele a base lipidica nei soggetti con dermatite atopica, nonostante sembri portare a buoni risultati, non sembra essere utilizzabile come monoterapia (Fujimura et al., 2011) nonostante sia stato dimostrato che l'uso routinario di prodotti topici a base di lipidi fisiologici possa ritardare la necessità di ricorrere a terapia con glucocorticoidi nelle persone con dermatite atopica, (Wiren et al., 2009).

Ulteriori studi sono necessari a chiarire quale sia la miscela dei lipidi migliore per ottimizzare la riparazione della barriera, secondo Man et al. (1993), è necessario che sia il più possibile simile alla composizione normale dei lipidi cutanei (Man et al., 1993). Inoltre sono necessarie maggiori delucidazioni riguardo la modalità con cui queste formulazioni lipidiche sono in grado di distribuirsi nell'epidermide e per quanto tempo siano apprezzabili i benefici sia a livello clinico che ultrastrutturale (Blaskovic et al., 2014).

In medicina umana, oltre all'integrazione diretta di alcune classi lipidiche, sono state studiate nuove molecole in grado di apportare beneficio alla barriera cutanea dei soggetti affetti da dermatite atopica.

L'Idrossipalmitoil sfingalina è un precursore delle ceramidi, simile alla ceramide 5, ma che contiene la diidrosfingosina anziché la sfingosina (Bouwstra et al., 1998). In vitro, l'aggiunta di idrossipalmitoil sfingalina in colture di pelle umana ricostruita ha determinato un aumento delle CER 1, 2, e 3. L'incremento di CER 1, 2, e 3 è il risultato della processazione e della trasformazione dell'idrossipalmitoil sfingalina in queste CER, e non porta alla sintesi "de novo" delle ceramidi (Meckfessel and Brandt, 2014). L'Idrossipalmitoil sfingalina è stata formulata in creme idratanti ad uso umano (*Cetaphil RestoraDerm Skin Restoring Moisturizer* e *Cetaphil DermaControl Moisturizer SPF 30*) e in un bagno schiuma (*Cetaphil RestoraDerm Body Wash*) [Galderma Laboratories, LP, Fort Worth, TX] (Meckfessel and Brandt, 2014). Questi prodotti sono in grado di migliorare l'idratazione della cute, ridurre il TEWL, e aumentare il quantitativo di ceramidi nello strato corneo di pazienti con dermatite atopica (Simpson et al., 2012).

Le pseudo-ceramidi sono molecole strutturalmente simili alle ceramidi, ma che, si differenziano da queste in quanto mancano della base sfingoide o possiedono un gruppo amminico terziario. Anche se non sono delle vere e proprie ceramidi, sono comunque in grado di ripristinare la funzione di barriera nella cute danneggiata (Imokawa and Akasaki, 1989). Ratti con un deficit di barriera a causa di un'alterata composizione lipidica dovuta ad una progressiva carenza di acidi grassi essenziali, hanno mostrato notevoli miglioramenti con il trattamento a base di pseudoceramidi.

Tali risultati indicano che queste molecole possono funzionare in modo simile alle vere ceramidi (Imokawa et al., 1994). Le pseudo-ceramidi sono state incorporate in formulazioni per la cura della cute nell'uomo disponibili in commercio (ad esempio *Kao Men's Bior Double Moisture Creame* [Kao Corporation, Tokyo, Japan] e *Actua Deep Harmonize Cream* [Ajinomoto Health Supply, Tokyo, Japan]) (Meckfessel and Brandt, 2014).

Altri ingredienti utilizzati nel trattamento della dermatite atopica nell'uomo sono i petrolati, la paraffina liquida, gli oli vegetali, la glicerina e l'urea. Esistono grandi differenze tra i prodotti, l'efficacia varia molto in base alla composizione del prodotto e alla frequenza dell'applicazione (Simpson, 2010). Esiste una relazione diretta tra il grado di secchezza della cute e la gravità della malattia nei pazienti con dermatite atopica (Aalto-Korte, 1995). Un miglioramento dello stato di idratazione cutanea permette di ottenere un miglioramento della funzionalità della barriera, un più rapido beneficio dal punto di vista clinico ed una riduzione delle recidive di circa un terzo rispetto ai soggetti non trattati (Wiren et al., 2009).

I petrolati sono una classe di composti, ricavati per distillazione dal petrolio, con proprietà occludenti, ovvero formano uno sottile strato che trattiene l'umidità e riduce la TEWL. Hanno un effetto immediato nella riparazione della barriera e sono usati in molti prodotti (Matsumoto et al., 2007). Gli oli vegetali e l'olio di paraffina (frazione più raffinata tra i petrolati) sono anch'essi veicoli con caratteristiche occlusive, il loro utilizzo è infatti accompagnato dalla diminuzione del TEWL. A differenza dei petrolati che restano in superficie, queste molecole sono in grado di penetrare gli strati superiori dello strato corneo, ed hanno per questo proprietà occludenti maggiori (Patzelt et al., 2012).

Nello studio di Buraczewska et al. (2009) è stato inoltre osservato che formulazioni topiche a base di queste sostanze, utilizzate per periodi prolungati (sette settimane nello studio) sono in grado di influenzare l'espressione epidermica di alcuni geni coinvolti nell'assemblaggio, nel processo differenziativo e nella desquamazione dello strato corneo, come il gene per l'involucrina, la transglutaminasi 1 e le callicreine 5 e 7, con effetti sia positivi che negativi per il ripristino della barriera cutanea. Il

meccanismo con cui queste sostanze agiscono a livello genico non è attualmente conosciuto (Buraczewska et al., 2009).

Infine, tra gli agenti idratanti più comuni c'è l'urea, un metabolita endogeno, che oltre a migliorare l'idratazione dello strato corneo in quanto assorbe e trattiene l'acqua, si comporta come una piccola molecola regolatrice della struttura e della funzione epidermica aumentando l'mRNA e l'espressione delle proteine transglutaminasi-1, involucrina, loricrina, e filaggrina, e la produzione di peptidi antimicrobici (Grether-beck et al., 2012). L'applicazione topica risulta così in un aumento dell'idratazione della cute (Amichai and Grunwald, 2009) e nella diminuzione del TEWL (Lodén et al., 1999).

5.2 TERAPIA ORALE

Gli acidi grassi essenziali (EFAs o PUFA- acidi grassi polinsaturi), sono classificati come acidi grassi omega-3 e omega-6, a seconda della posizione del primo doppio legame rispetto al gruppo carbossilico situato all'estremità della catena carboniosa. Gli EFA non possono essere sintetizzati “*de novo*”, e devono quindi essere ingeriti preformati attraverso la dieta (Blaskovic et al., 2014).

Gli acidi grassi essenziali sembrano essere in grado di interferire con il processo infiammatorio che si scatena nei soggetti allergici tramite la modulazione delle prostaglandine e dei leucotrieni che vengono prodotti, l'inibizione dell'attivazione cellulare e la secrezione di citochine, ma anche alterando la composizione e la funzionalità della barriera lipidica dello strato corneo (Olivry et al., 2001). In cani normali, l'integrazione alimentare, o la somministrazione di diete ricche in EFA, si traduce generalmente in un miglioramento della qualità e della brillantezza del pelo, con una riduzione del TEWL. Questo suggerisce che gli EFA, somministrati per via orale, possono essere integrati agli altri lipidi intercellulari dello strato corneo (Marsh et al., 2000).

Nella letteratura scientifica alcuni studi riportano una significativa riduzione dell'indice CADESI e del prurito in seguito all'integrazione, per via orale, con gli EFA (Abba et al., 2005; Mueller et al., 2004; Nesbitt et al., 2003).

Nello studio di Popa et al. (2011) è stato invece studiato l'effetto dell'integrazione alimentare con una miscela di acidi grassi essenziali (*Megaderm®/EFA-Z®*; Virbac S.A., Carros, France) a livello ultrastrutturale, su campioni di cute prelevati prima e dopo il trattamento, in cani atopici privi di lesioni cutanee clinicamente manifeste. Prima del trattamento, alla microscopia elettronica, le lamelle lipidiche dello strato corneo esibivano una struttura incompleta ed anomala, ed una minor coesione tra i corneociti. All'esame HPTLC, lo strato corneo era inoltre caratterizzato da una significativa diminuzione del contenuto dei lipidi rispetto ai soggetti di controllo sani. Dopo la supplementazione orale di acidi grassi essenziali per due mesi (omega-6 ed omega-3 in rapporto 5:1, e vitamina E), il contenuto lipidico dello strato corneo è notevolmente aumentato, in particolar modo nella frazione di lipidi che si legano alle proteine dell'envelope corneo, fungendo da impalcatura per un'ordinata

organizzazione dello strato lipidico. Tuttavia, la frazione di ceramidi legata alle proteine, anche se notevolmente maggiore rispetto alla situazione presente prima del trattamento, è rimasta ben al di sotto dei valori riscontrati nei cani sani. Inoltre, lo studio semi quantitativo alla microscopia elettronica ha rivelato che il trattamento ha apportato un significativo miglioramento nell'organizzazione delle lamelle lipidiche dello strato corneo, raggiungendo un livello paragonabile a quello dei cani sani. Secondo questi risultati la supplementazione orale di acidi grassi essenziali può quindi apportare dei benefici alla barriera cutanea (Popa et al., 2011a).

Nello studio di Abba et al. (2005) è stato studiato l'effetto della somministrazione degli EFA a stadi differenti della malattia. Sono stati considerati due gruppi di cani: gruppo A (15 casi) comprendeva cani nelle fasi iniziali della malattia, che non erano stati sottoposti ancora ad alcun trattamento; gruppo B (7 casi) comprendeva cani con atopica cronica non responsiva all'immunoterapia. Le valutazioni cliniche sono state effettuate all'inizio, al giorno 30 e al termine del processo. I risultati migliori sono stati ottenuti nel gruppo A e particolarmente nella valutazione del prurito, rispetto all'indice CADESI. Inoltre, all'inizio e alla fine dello studio, è stato determinato il profilo degli acidi grassi nel siero del sangue. La concentrazione sierica dell'acido arachidonico (da cui derivano i leucotrieni e le prostaglandine responsabili dell'infiammazione) era significativamente inferiore alla fine del processo nel gruppo A, mentre quella dell'acido gamma-linoleico (omega-6) era significativamente superiore nel gruppo B. Secondo gli autori, cani atopici in differenti stadi della malattia potrebbero reagire diversamente all'integrazione con gli EFA, forse a causa di un diverso metabolismo degli acidi grassi. I soggetti che si trovano nelle fasi iniziali della malattia sembrano comunque essere più sensibili alla supplementazione degli EFA (Abba et al., 2005).

È stato poi studiato l'effetto di alcune diete ricche in acidi grassi essenziali nei cani con dermatite atopica (*Eukanuba Veterinary Diets Dermatitis FP*, *Hill's Prescription Diet Canine d/d Salmon*, *Royal Canin Hypoallergenic DR 21*). I risultati hanno riportato un miglioramento nell'indice CADESI e/o nella scala del prurito per *Eukanuba Veterinary Diets Dermatitis FP* e *Hill's Prescription Diet Canine d/d Salmon* (Bensignor et al., 2008; Glos et al., 2008), mentre non è stato osservato un

effettivo beneficio clinico per *Royal Canin Hypoallergenic DR 21* (Glos et al., 2008). Esistono quindi dati discordanti a tal proposito e ulteriori studi sono necessari per chiarire se l'uso di diete commerciali arricchite con EFA abbia una reale efficacia in corso di dermatite atopica.

In generale, è stato visto che le diete arricchite con acidi grassi essenziali forniscono un quantitativo maggiore di EFA rispetto alla loro supplementazione orale (Roudebush et al., 2001). Il beneficio arrecato dagli EFA, se presente, non è comunque visibile prima dei due mesi di trattamento (Olivry et al., 2010b; Olivry et al., 2001), ed è comunque limitato, non si possono quindi considerare come singola opzione terapeutica (Olivry et al., 2010a), ma negli atopici il trattamento concomitante con gli EFA potrebbe consentire la riduzione del dosaggio di altri farmaci anti-infiammatori, come glucocorticoidi, e l'ulteriore miglioramento dei segni clinici dovuto all'effetto sinergico con essi (Sævik et al., 2004).

Ulteriori studi sono necessari per cercare di stabilire il dosaggio ottimale degli EFA, se sia particolarmente utile una sola classe di acidi grassi essenziali o se siano necessarie entrambe, e in tal caso il rapporto più corretto tra omega-6 e omega-3. Inoltre è necessario investigare in quali animali queste integrazioni siano particolarmente utili, se una supplementazione più duratura è in grado di apportare maggiori benefici e in quale modo l'azione degli EFA può essere sinergica con quella degli antinfiammatori (Olivry et al., 2001).

Non è possibile fare un confronto diretto tra i risultati che si ottengono dalla somministrazione di un prodotto per via orale ed uno topico, ma, secondo Blaskovic et al. (2014) il suo studio (Blaskovic et al., 2014) fornirebbe la prova che l'efficacia di una terapia topica con oli essenziali ed EFA può essere paragonabile a quella riportata negli studi che valutano gli EFA per via orale (Mueller et al., 2004; Sævik et al., 2004). Sia con l'integrazione orale di acidi grassi (Mueller et al., 2004), sia tramite la l'integrazione per via topica (Blaskovic et al., 2014), circa metà dei cani trattati ha ottenuto un miglioramento del 50% o più rispetto al solo 10% del gruppo placebo.

Oltre agli acidi grassi essenziali, è stato dimostrato che anche altri integratori alimentari (ad es pantotenato, colina, nicotinamide, istidina e inositolo) sono in grado di aumentare la produzione delle ceramidi in vitro, e di ridurre la perdita di acqua trans-epidermica in vivo nei cani sani. Ulteriori studi sono però necessari per confermare il beneficio clinico di diete contenenti questi integratori nei cani con dermatite atopica (Watson et al., 2006).

Nell'uomo, oltre all'integrazione con acidi grassi essenziali, anche la supplementazione di glucosilceramidi sembra essere utile nei soggetti affetti da dermatite atopica. Nello studio di Miyanishi et al. (2005) l'apporto, per via orale, di glucosilceramidi estratte dalla pianta asiatica *Amorphophallus konjac*, in pazienti affetti da dermatite atopica per otto settimane, è risultato portare a un sensibile decremento dei valori del TEWL (già dopo 2 settimane) (fig. 32) e dello SCORAD (*Scoring Atopic Dermatitis*), ovvero dell'indice che si utilizza in medicina umana per quantificare la gravità delle lesioni in corso di dermatite atopica, che prima del trattamento aveva una media di $15.8 + 1.4$ (mean SCORAD index + SEM) scendendo dopo il trattamento a $13.2 + 1.2$ (Miyanishi et al., 2005).

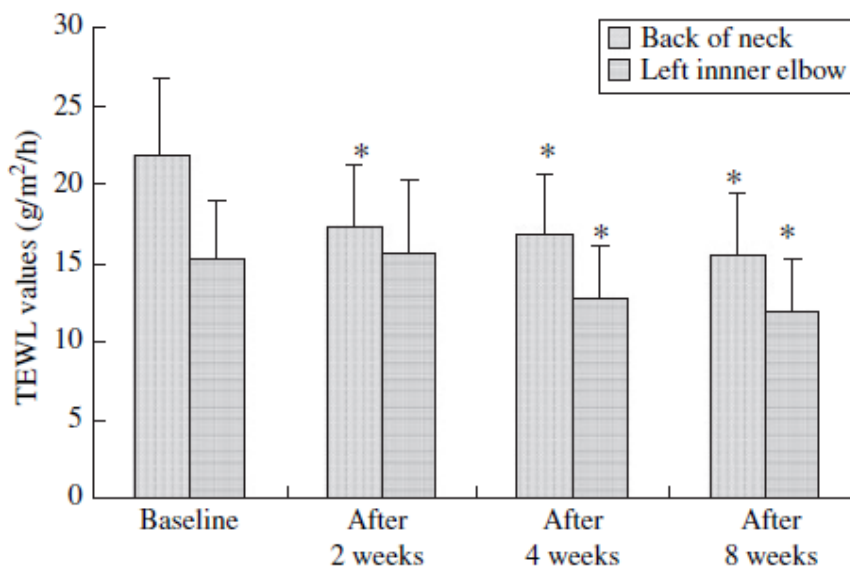


Figura 34. Effetto dell'assunzione per via orale di glucosilceramidi sulla perdita di acqua transepidermica (TEWL) valutata nella parte posteriore del collo e nella parte interna del gomito interno. I valori del TEWL ($\text{g/m}^2/\text{h}$) sono significativamente (* $P < 0.05$) diminuiti dopo l'assunzione di glucosilceramidi rispetto ai valori basali (Miyanishi et al., 2005).

Questo probabilmente è dovuto all'aumento del livello di sfingolipidi nello strato corneo, in particolar modo delle ceramidi, che si verifica in seguito all'assunzione per via orale di glucosilceramidi, come dimostrato da Ishikawa et al. nel 2009 in uno studio sperimentale condotto su 16 topi, ad una parte dei quali la dieta veniva integrata con GlcCer (Ishikawa et al., 2009).

Nello studio di Kimata (2006) è stato visto inoltre, che l'integrazione con GlcCer, oltre a migliorare i sintomi cutanei (diminuzione dello SCORAD), induce una deviazione nella produzione delle citochine, promuovendo la produzione di citochine Th1 (IFN- γ e IL-12) e inibendo la produzione delle citochine Th2 (IL-4 e IL-13) con effetto antiinfiammatorio grazie alla minore produzione di IgE (Kimata, 2006).

CONCLUSIONI

Secondo le recenti acquisizioni sull'eziopatogenesi della dermatite atopica, vi è una crescente evidenza che nei cani affetti da questa malattia la barriera cutanea sia caratterizzata da alcuni difetti, quali la minor espressione della filaggrina (Chervet et al., 2010; Marsella et al., 2009; Santoro et al., 2013) e di alcune frazioni lipidiche (in particolare delle ceramidi) (Reiter et al., 2009; Shimada et al., 2009), un'alterata espressione di alcune proteine funzionali quali le proteasi (Shona H Wood et al., 2009) e un'anomala morfologia dello strato corneo e della struttura delle lamelle lipidiche intercellulari (Inman et al., 2001; Marsella et al., 2010).

Gli studi attualmente pubblicati non hanno ancora chiarito se simili disfunzioni della barriera cutanea interessino tutti i cani con dermatite atopica o solo una parte, e se queste alterazioni siano di natura primaria (ovvero di origine genetica) o secondarie all'infiammazione causata dallo stimolo antigenico (Santoro et al., 2015). Se consideriamo che queste lesioni sono evidenziabili anche nella cute clinicamente priva di lesioni, l'ipotesi dell'origine genetica sembra essere supportata. Tuttavia, la presenza di mutazioni nei geni che codificano per le diverse componenti della barriera cutanea nel cane non è ancora stata dimostrata, ma solo ipotizzata (Chervet et al., 2010), a differenza di quanto emerso dagli studi sulla dermatite atopica umana nei quali si sono evidenziate alterazioni a carico dei geni codificanti la filaggrina (Irvine and Mclean, 2006). Infine, alterazioni della barriera cutanea in aree non interessate dalle lesioni, potrebbero anche essere la conseguenza di una lieve infiammazione cutanea che decorre in forma subclinica (Santoro et al., 2015). Lo stato infiammatorio che si genera al contatto con l'allergene sembra comunque peggiorare ulteriormente queste alterazioni (Marsella et al., 2011).

Negli ultimi anni sono stati sviluppati prodotti mirati al ripristino della funzione della barriera cutanea. Queste sostanze di recente commercializzazione non sono ancora state ampiamente studiate, ma da quanto attualmente disponibile in letteratura, sembrano avere un effetto positivo sulla sintomatologia clinica (Blaskovic et al., 2014; Glos et al., 2008; Mueller et al., 2004; Piekutowska et al., 2008; Popa et al., 2012). Questo approccio al trattamento della dermatite atopica potrebbe rivelarsi utile soprattutto se iniziato nelle prime fasi della malattia (Abba et al., 2005) e

potrebbe condizionarne positivamente il decorso riducendo le recidive (Wiren et al., 2009). Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per chiarire i meccanismi d'azione di tali sostanze e quali siano le molecole e le formulazioni più efficaci. Studi clinici sull'applicazione a lungo termine potranno infine chiarire quale sia la posologia più corretta, per quanto tempo perduri il beneficio ottenuto, se e come queste formulazioni siano in grado di migliorare la condizione clinica dei cani atopici se associate ai comuni e consolidati trattamenti terapeutici.

BIBLIOGRAFIA

Aalto-Korte, K., 1995. Improvement of skin barrier function during treatment of atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatology* 33, 969–972.

Abba, C., Mussa, P.P., Vercelli, A., Raviri, G., 2005. Essential fatty acids supplementation in different-stage atopic dogs fed on a controlled diet. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 89, 203–207.

Amichai, B., Grunwald, M.H., 2009. A randomized, double-blind, placebo-controlled study to evaluate the efficacy in AD of liquid soap containing 12% ammonium lactate + 20% urea. *Clin. Exp. Dermatol.* 34, e602–e604.

Arikawa, J., Ishibashi, M., Kawashima, M., Takagi, Y., Ichikawa, Y., Imokawa, G., 2002. Decreased Levels of Sphingosine, a Natural Antimicrobial Agent, may be Associated with Vulnerability of the Stratum Corneum from Patients with Atopic Dermatitis to Colonization by *Staphylococcus aureus*. *J. Invest. Dermatol.* 119, 433–439.

Arlian, L.G., Platts-Mills, T.A.E., 2001. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.* 107, 406–413.

Baranowsky, ã.A., Schunck, ã.M., Winoto-Morbach, ã.S., Jensen, J., Fo, ã.R., 2004. Impaired Sphingomyelinase Activity and Epidermal Differentiation in Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 122, 1423–1431.

Bardagi, M., Valah, H., Fondevila, D., Ferrer, L., 2007. Immunohistochemical detection of filaggrin in the skin of different species, in: Blackwell Publishing, Ltd. 22nd Annual Congress of the ESVD-ECVD. pp. 384–388.

Baumer, W., 2011. Decreased Concentration and Enhanced Metabolism of Sphingosine-1-Phosphate in Lesional Skin of Dogs with Atopic Dermatitis: Disturbed Sphingosine-1-Phosphate Homeostasis in Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 131, 266–268.

Beggs, P.J., 2004. Impacts of climate change on aeroallergens: past and future. *Clin. Exp. Dermatol.* 34, 1507–1513.

Bensignor, E., Morgan, D.M., Nuttall, T., 2008. Efficacy of an essential fatty acid-enriched diet in managing canine atopic dermatitis: a randomized, single-blinded, cross-over study. *Vet. Dermatol.* 19, 156–162.

Bethlehem, S., Bexley, J., Mueller, R.S., 2012. Patch testing and allergen-specific serum IgE and IgG antibodies in the diagnosis of canine adverse food reactions. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 145, 582–589.

Blaskovic, M., Rosenkrantz, W., Neuber, A., Sauter-Louis, C., Mueller, R.S., 2014. The effect of a spot-on formulation containing polyunsaturated fatty acids and essential oils on dogs with atopic dermatitis. *Vet. J.* 199, 39–43.

Bonnart, C., Bitoun, E., Robinson, R., Ishida-yamamoto, A., Ce, ã., Brien, T.J.O., Wakamatsu, K., Ohtsubo, ã.S., Takahashi, ã.H., Hashimoto, ã.Y., Dopping-hepenstal, P.J.C., Mcgrath, J.A., Iizuka, H., Richard, ã.G., Hovnanian, A., 2005a. LEKTI Is Localized in Lamellar Granules, Separated from KLK5 and KLK7, and Is Secreted in the Extracellular Spaces of the Superficial Stratum Granulosum. *J. Invest. Dermatol.* 124, 360–366.

Bonnart, C., Kreft, M., Kishibe, M., Descargues, P., Ishida-yamamoto, A., Elias, P., Barrandon, Y., Zambruno, G., Sonnenberg, A., Hovnanian, A., 2005b. Spink5-deficient mice mimic Netherton syndrome through degradation of desmoglein 1 by epidermal protease hyperactivity. *Nat. Genet.* 37, 56–65.

Boralevi, F., Hubiche, T., Saubusse, E., Fayon, M., Roul, S., 2008. Epicutaneous aeroallergen sensitization in atopic dermatitis infants – determining the role of epidermal barrier impairment. *Allergy* 63, 205–210.

Bordeau, P., Bruet, V., Gremillet, C., 2007. Evaluation of phytosphingosine-containing shampoo and microemulsion spray in the clinical control of allergic dermatoses in dogs: preliminary results of a multicentre study. *Vet. Dermatol.* 18, 177–178.

Borgoño, C.A., Michael, I.P., Komatsu, N., Jayakumar, A., Kapadia, R., Clayman, G.L., Diamandis, E.P., Borgon, C.A., 2007. A Potential Role for Multiple Tissue Kallikrein Serine Proteases in Epidermal Desquamation. *J. Biol. Chem.* 282, 3640–3652.

Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Dubbelaar, F.E.R., Weerheim, A.M., Ijzerman, A.P., Ponc, M., 1998. Role of ceramide 1 in the molecular organization of the stratum corneum lipids. *J. Lipid Res.* 39, 186–196.

Bouwstra, J.A., Gooris, G.S., Nijssse, J., 2003. Water Distribution and Related Morphology in Human Stratum Corneum at Different Hydration Levels. *J. Invest. Dermatol.* 120, 750–758.

Buraczewska, I., Berne, B., Lindberg, M., Lodén, M., Torma, H., 2009. Long-term treatment with moisturizers affects the mRNA levels of genes involved in keratinocyte differentiation and desquamation. *Arch. Dermatol. Res.* 301, 175–181.

Candi, E., Schmidt, R., Melino, G., 2005. The cornified envelope: a model of cell death in the skin. *Mol. Cell Biol.* 6, 328–340.

Carlotti, N.D., Boulet, M., Ducret, J., Machicote, G., Jasmin, P., Rème, C.A., 2009. The use of recombinant omega interferon therapy in canine atopic dermatitis: a double-blind controlled study. *Vet. Dermatol.* 20, 405–411.

Carr, M.N., Torres, S.M.F., Koch, S.N., Reiter, L. V, 2009. Investigation of the pruritogenic effects of histamine, serotonin, tryptase, substance P and interleukin-2 in healthy dogs. *Vet. Dermatol.* 20, 105–110.

Chang-Yi, C., Kusuda, S., Seguchi, T., Takahashi, M., Aisu, K., Tezuka, T., 1997. Decreased Level of Prosaponin in Atopic Skin. *J. Invest. Dermatol.* 109, 319–323.

Chervet, L., Galichet, A., Mclean, W.H.I., Chen, H., Suter, M.M., Roosje, P.J., Mu, E.J., 2010. Missing C-terminal filaggrin expression , NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Exp. Dermatol.* 19, 343–346.

Chesney, C., 1995. Measurement of skin hydration in normal dogs and in dogs with atopy or a scaling dermatosis. *J Small Anim. Pract.* 36, 305–9.

Codner, E.C., Griffin, C.E., 1999. I test allergometrici nel cane. *Vet J.* 13, 13–23.

Cohen, J.C., Hartman, D.G., Garofalo, M.J., Basehoar, A., Raynor, B., Ashbrenner, E., Akin, F.J., 2009. Comparison of closed chamber and open chamber evaporimetry. *Ski. Res. Technol.* 15, 51–54.

Cosgrove, S.B., Wren, J.A., Cleaver, D.M., Walsh, K.F., Follis, S.I., King, V.I., Tena, J.S., Stegemann, M.R., 2013. A blinded , randomized , placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the Janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel) in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 24, 587–e142

Deboer, D.J., 2004. Canine Atopic Dermatitis: New Targets, New Therapies. *J. Nutr.* 134, 2056–2061.

Deboer, D.J., Hill, P.B., 1999. Serum immunoglobulin E concentrations in West Highland White Terrier puppies do not predict development of atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 10, 275–281.

Deboer, D.J., Hillier, A., 2001a. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 271–276.

Deboer, D.J., Hillier, A., 2001b. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVI): laboratory evaluation of dogs with atopic dermatitis with serum-based “allergy tests”. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 277–287.

Dellmann, H.D., Eurell, J.A., 2012. *Istologia e Anatomia Microscopica Veterinaria.*, 2° ed. Casa Editrice Ambrosiana, Milano.

Denda, M., Horii, I., Takahashi, M., Hara, M., Tagami, H., 1993. Age- and sex-dependent change in stratum corneum sphingolipids. *Arch. Dermatol. Res.* 285, 415–417.

Dip, R., Carmichael, J., Letellier, I., Strehlau, G., Roberts, E., Bensignor, E., 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 Vet. Res.* 9, 173.

Doering, T., Proia, R.L., Sandhogg, K., 1999. Accumulation of protein-bound epidermal glucosylceramides in beta-glucocerebrosidase deficient type 2 Gaucher mice. *Fed. Eur. Biochem. Soc.* 447, 167–170.

Eberlein-Konig, B., Schafer, T., Darsow, U., Mohrenschlager, M., Herbert, O., Abeck, D., Kramer, U., 2000. Skin Surface pH, Stratum Corneum Hydration, Trans-epidermal Water Loss and Skin Roughness Related to Atopic Eczema and Skin Dryness in a Population of Primary School Children. *Acta Derm. Venereol.* 80, 188–191.

Eckert, R.L., Broome, Ñ.A., Ruse, Ñ.M., Rorke, E.A., 2005. Transglutaminase Function in Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 124, 481–192.

Egberts, F., Heinrich, M., Jensen, J., Winoto-morbach, S., Pfeiffer, S., Wickel, M., Schunck, M., Steude, J., Saftig, P., Proksch, E., Schütze, S., 2004. Cathepsin D is involved in the regulation of transglutaminase 1 and epidermal differentiation. *J. Cell Sci.* 117, 2295–2307.

Elias, P.M., Brown, B.E., Ziboh, V.A., 1980. The permeability barrier in essential fatty acid deficiency: evidence for a direct role for linoleic acid in barrier function. *J. Invest. Dermatol.* 74, 230–233.

Elias, P.M., Hatano, Y., Williams, M.L., 2008. Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: Outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 1337–1343.

Elias, P.M., Schmuth, M., 2009. Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 9, 437–446.

Farwanah, H., Raith, Æ.K., Neubert, Æ.R.H.H., 2005. Ceramide profiles of the uninvolved skin in atopic dermatitis and psoriasis are comparable to those of healthy skin. *Arch. Dermatol. Res.* 296, 514–521.

Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W., Picco, F., 2010. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet. Dermatol.* 21, 23–31.

Feingold, K.R., Brown, B.E., Steven, L.R., Arthur, M.H., Elias, P.M., 1986. Effect of Essential Fatty Acid Deficiency on Cutaneous Sterol Synthesis. *J. Invest. Dermatol.* 87, 588–591.

Fitch, K.R., McGowan, K. a, Van Raamsdonk, C.D., Fuchs, H., Lee, D., Puech, A., Héroult, Y., Threadgill, D.W., Hrabé de Angelis, M., Barsh, G.S., 2003. Genetics of dark skin in mice. *Genes Dev.* 17, 214–28.

Fluhr, J.W., Dickel, H., Weyher, I., Berardesca, E., 2002. Impact of anatomical location on barrier recovery , surface pH and stratum corneum hydration after acute barrier disruption. *Br. J. Dermatol.* 146, 770–776.

Folster-Holst, R., Stoll, M., Koch, W.A., Hampe, J., Christophers, E., Schreiber, S., 2005. Lack of association of SPINK 5 polymorphisms with nonsyndromic atopic dermatitis in the population of Northern Germany. *Br. J. Dermatol.* 152, 1365–1366.

Frew, A.J., Brighton, F., Kingdom, U., 2009. Allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.* 125, S306–S313.

Fujimura, M., Nakatsuji, Y., Fujiwara, S., Christophe, R., Gatto, H., 2011. Spot-On Skin Lipid Complex as an Adjunct Therapy in Dogs with Atopic Dermatitis : An Open Pilot Study. *Vet. Med. Int.* 2011, 1–5.

Glos, K., Linek, M., Loewenstein, C., Mayer, U., Mueller, R.S., Kleintierklinik, M., Care, G.P., Canin, R., Glos, V.K., 2008. The efficacy of commercially available veterinary diets recommended for dogs with atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 19, 280–287.

Gonzales, A.J., Humphrey, W.R., Messamore, J.E., Fleck, T.J., Fici, G.J., Shelly, J.A., Teel, J.F., Bammert, G.F., Dunham, S.A., Fuller, T.E., McCall, R.B., 2013. Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 24, 48–e12.

Grenard, P., Bates, M.K., Aeschlimann, D., 2001. Evolution of Transglutaminase Genes : Identification of a Transglutaminase Gene Cluster on Human Chromosome 15q15 : structure of the gene encoding transglutaminase X and a novel gene family. *J. Biol. Chem.* 276, 33066–33078.

Grether-beck, S., Felsner, I., Brenden, H., Kohne, Z., Majora, M., Marini, A., Jaenicke, T., Rodriguez-martin, M., Trullas, C., Hupe, M., Elias, P.M., Krutmann, J., 2012. Urea Uptake Enhances Barrier Function and Antimicrobial Defense in Humans by Regulating Epidermal Gene Expression. *J. Invest. Dermatol.* 132, 1561–1572.

Grif, C.E., Deboer, D.J., 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 255–269.

Gupta, J., Grube, E., Ericksen, M.B., Stevenson, M.D., Lucky, A.W., 2008. Intrinsically defective skin barrier function in children with atopic dermatitis correlates with disease severity. *J Allergy Clin Immunol* 121, 725–730.e2.

Hachem, J., Man, M., Crumrine, Æ.D., Uchida, Æ.Y., Brown, Æ.B.E., Rogiers, V., Roseeuw, D., Feingold, K.R., Æ, P.M.E., 2005. Sustained Serine Proteases Activity by Prolonged Increase in pH Leads to Degradation of Lipid Processing Enzymes and Profound Alterations of Barrier Function and Stratum Corneum Integrity. *J. Invest. Dermatol.* 125, 510–520.

Hachem, J.-P., Crumrine, D., Fluhr, J., Brown, B.E., Feingold, K.R., Elias, P.M., 2003. pH Directly Regulates Epidermal Permeability Barrier Homeostasis, and Stratum Corneum Integrity/Cohesion. *J. Invest. Dermatol.* 121, 345–353.

Halliwel, R., 2006. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 114, 207–208.

Halliwell, R.E.W., Gordon, C., Horvath, C., Wagner, R., 2004. IgE and IgG antibodies to food antigens in sera from normal dogs, dogs with atopic dermatitis and dogs with adverse food reactions. *Vet. Dermatol.* 15, 2–3.

Hara, J., Higuchi, K., Okamoto, R., Kawashima, M., Imokawa, G., 2000. High-expression of sphingomyelin deacylase is an important determinant of ceramide deficiency leading to barrier disruption in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 115, 406–413.

Hatano, Y., Terashi, H., Katagiri, K., 2005. Interleukin-4 Suppresses the Enhancement of Ceramide Synthesis and Cutaneous Permeability Barrier Functions Induced by Tumor Necrosis Factor- α and interferon- γ in Human Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 124, 786–792.

Henderson, J., Northstone, K., Lee, S.P., Liao, H., Zhao, Y., Pembrey, M., Mukhopadhyay, S., Smith, D., Palmer, C.N.A., Mclean, W.H.I., Irvine, A.D., Kingdom, U., Al, H.E.T., 2008. The burden of disease associated with filaggrin mutations: A population-based, longitudinal birth cohort study. *J. Allergy Clin. Immunol.* 121, 872–877.

Herrmann, T., Hoeven, F. Van Der, Gröne, H., Stewart, A.F., Langbein, L., Kaiser, I., Liebisch, G., Gosch, I., Buchkremer, F., Drobnik, W., Schmitz, G., Stremmel, W., 2003. Mice with targeted disruption of the fatty acid features of lethal restrictive dermatopathy. *J. Cell Biol.* 4, 1105–1115.

Hibberson, C., Vogelnest, L., 2014. Storage mite contamination of commercial dry dog food in south-eastern Australia. *Aust. Vet. J.* 92, 219–224.

Hightower, K., Marsella, R., Flynn-lurie, A., 2010. Effects of age and allergen exposure on transepidermal water loss in a house dust mite-sensitized beagle model of atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 21, 89–96.

Hill, P.B., Deboer, D.J., 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 169–186.

Hill, P.B., Lau, P., Rybnicek, J., 2007. Development of an owner-assessed scale to measure the severity of pruritus in dogs. *Vet. Dermatol.* 18, 301–308.

Hill, P.B., Moriello, K.A., Deboer, D.J., 1995. Concentrations of total serum IgE, IgA, and IgG in atopic and parasitized dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 44, 105–113.

Hillier, A., Deboer, D.J., 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 289–304.

Hillier, A., Griffin, C.E., 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 147–151.

Holleran, W.M., Takagi, I.Y., Menon, G.K., Legler, I.G., Feingold, K.R., Elias, P.M., 1993. Processing of Epidermal Glucosylceramides Is Required for Optimal Mammalian Cutaneous Permeability Barrier Function. *J. Invest. Dermatol.* 91, 1656–1664.

Hoste, E., Kemperman, P., Devos, M., Denecker, G., Kezic, S., Yau, N., Gilbert, B., Lippens, S., Groote, P. De, Roelandt, R., Damme, P. Van, Gevaert, K., Presland, R.B., Takahara, H., Puppels, G., Caspers, P., Vandenabeele, P., Declercq, W., 2011. Caspase-14 Is Required for Filaggrin Degradation to Natural Moisturizing Factors in the Skin. *J. Invest. Dermatol.* 131, 2233–2241.

Howell, M.D., Kim, B.E., Gao, P., Audrey, V., Boguniewicz, M., De Benedetto, A., Schneider, L., Beck, L.A., Barnes, K.C., Leung, D.Y.M., 2007. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J. Allergy Immunol.* 120, 150–155.

Hubiche, T., Ged, C., Benard, A., Léauté-labrèze, C., Mcelreavey, K., De, H., Taïeb, A., Boralevi, F., 2007. Analysis of SPINK 5 , KLK 7 and FLG Genotypes in a French Atopic Dermatitis Cohort. *Acta Derm. Venereol.* 87, 499–505.

Imokawa, G., 2001. Lipid abnormalities in atopic dermatitis. *J. Am. Acad. Dermatology* 45, 29–32.

Imokawa, G., 2009. A possible mechanism underlying the ceramide deficiency in atopic dermatitis : Expression of a deacylase enzyme that cleaves the N-acyl linkage of sphingomyelin and glucosylceramide. *J. Dermatol. Sci.* 55, 1–9.

Imokawa, G., Akasaki, S., 1989. Water-retaining function in the stratum corneum and its recovery properties by synthetic pseudoceramides. *J. Soc. Cosmet. Chem.* 40, 273–285.

Imokawa, G., Yada, Y., Higuchi, K., Okuda, M., Ohashi, Y., Kawamata, A., 1994. Pseudo-acylceramide with Linoleic Acid Produces Selective Recovery of Diminished Cutaneous Barrier Function in Essential Fatty Acid-deficient Rats and Has an Inhibitory Effect on Epidermal Hyperplasia. *J. Clin. Invest.* 94, 89–96.

Inazawall, J., Nonomuras, K., Ariyamall, T., Abell, T., Doill, H., Hiranoll, J., Fukushima, S., 1992. Structure of the Gene for Human Transglutaminase I. *J. Biol. Chem.* 267, 17858–17863.

Inman, A.O., Olivry, T., Dunston, S.M., Monteiro-Riviere, N.A., Gatto, H., 2001. Electron Microscopic Observations of Stratum Corneum Intercellular Lipids in Normal and Atopic Dogs. *Vet. Pathol.* 38, 720–723.

Irvine, A.D., Mclean, W.H.I., 2006. Breaking the (Un)Sound Barrier : Filaggrin Is a Major Gene for Atopic. *J. Invest. Dermatol.* 126, 1200–1202.

Ishida-Yamamoto, A., 2003. Loricrin keratoderma: a novel disease entity characterized by nuclear accumulation of mutant loricrin. *J. Dermatol. Sci.* 1, 3–8.

Ishida-Yamamoto, A., Igawa, S., 2014. Genetic skin diseases related to desmosomes and corneodesmosomes. *J. Dermatol. Sci.* 74, 99–105.

Ishida-Yamamoto, A., Kishibe, M., 2011. Involvement of corneodesmosome degradation and lamellar granule transportation in the desquamation process. *Med Mol. Morphol.* 44, 1–6.

Ishikawa, J., Narita, H., Kondo, N., Hotta, M., Takagi, Y., Masukawa, Y., Kitahara, T., Takema, Y., Koyano, S., Yamazaki, S., Hatamochi, A., 2010. Changes in the Ceramide Profile of Atopic Dermatitis Patients. *J. Invest. Dermatol.* 130, 2511–2514.

Ishikawa, J., Takada, S., Takagi, Y., Masukawa, Y., Mizutani, Y., 2009. Dietary glucosylceramide is absorbed into the lymph and increases levels of epidermal sphingolipids. *J. Dermatol. Sci.* 56, 216–218.

Janssens, M., Smeden, J. Van, Gooris, G.S., Bouwstra, J.A., 2014. The important role of stratum corneum lipids for the cutaneous barrier function. *BBA - Mol. Cell Biol. Lipids* 1841, 295–313.

Janssens, M., Smeden, J. Van, Gooris, G.S., Bras, W., Portale, G., Caspers, P.J., Vreeken, R.J., Hankemeier, T., Kezic, S., Wolterbeek, R., Lavrijsen, A.P., Bouwstra, J.A., 2012. Increase in short-chain ceramides correlates with an altered lipid organization and decreased barrier function in atopic eczema patients. *J. Lipid Res.* 53, 2755–2766.

Jarnik, M., Simon, M.N., Steven, A.C., 1998. Cornified cell envelope assembly: a model based on electron microscopic determinations of thickness and projected density. *J. Cell Sci.* 111, 1051–1060.

Jassies-van der Lee, A., Rutten, V.P.M.G., Bruijn, J., Willemse, T., Broere, F., 2014. CD4(+) and CD8(+) skin-associated T lymphocytes in canine atopic dermatitis produce interleukin-13, interleukin-22 and interferon-gamma and contain a CD25(+) FoxP3(+) subset. *Vet. Dermatol.* 25, 456-e72.

Jennemann, R., Rabionet, M., Gorgas, K., Epstein, S., Dalpke, A., Rothermel, U., Bayerle, A., Hoeven, F. Van Der, Imgrund, S., Kirsch, J., Nickel, W., Willecke, K., Riezman, H., 2012. Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum. Mol. Genet.* 21, 586–608.

Jensen, J., Schütze, S., Förl, M., Krönke, M., 1999. Roles for tumor necrosis factor receptor p55 and sphingomyelinase in repairing the cutaneous permeability barrier. *J Clin Invest* 104, 1761–1770.

Jung, J., Nam, E., Park, S., Han, S., Hwang, C., 2013. Clinical use of a ceramide-based moisturizer for treating dogs with atopic dermatitis. *J. Vet. Sci.* 14, 199–205.

Jungersted, J.M., Hellgren, L.I., Jemec, G.B.E., Agner, T., 2008. Lipids and skin barrier function – a clinical perspective. *Contact Dermatitis* 58, 255–262.

Ka, D., Marignac, G., Desquilbet, L., Freyburger, L., Hubert, B., Garelik, D., Perrot, S., 2014. Association between passive smoking and atopic dermatitis in dogs. *Food Chem. Toxicol.* 66, 329–333.

Kalinin, A.E., Idler, W.W., Marekov, N., Mcphie, P., Bowers, B., Steinert, P.M., Steven, A.C., Marekov, L.N., 2004. Co-assembly of Envoplakin and Periplakin into Oligomers and Ca²⁺-dependent Vesicle Binding: implication for cornified cell envelope formation in stratified squamous epithelia. *J. Biol. Chem.* 279, 22773–22780.

- Kalinin, A.E., Kajava, A. V, Steinert, P.M., 2002. Epithelial barrier function : assembly and structural features of the cornified cell envelope. *BioEssay* 24, 789–800.
- Kanda, S., Sasaki, T., Shiohama, A., Nishifuji, K., Amagai, M., 2013. Characterization of canine filaggrin: gene structure and protein expression in dog skin. *Vet. Dermatol.* 24, 25–32.
- Kang, M., Kim, H., Jang, H., Park, H., 2014. Sensitization rates of causative allergens for dogs with atopic dermatitis : detection of canine allergen-specific IgE. *J. Vet. Sci.* 15, 545–550.
- Kao, J.S., Joachim, W., 2003. Short-Term Glucocorticoid Treatment Compromises Both Permeability Barrier Homeostasis and Stratum Corneum Integrity: Inhibition of Epidermal Lipid Synthesis Accounts for Functional Abnormalities. *J. Invest. Dermatol.* 120, 456–464.
- Karlen, S., Roger, Æ.L., 2005. Mast cell chymase is increased in chronic atopic dermatitis but not in psoriasis. *Arch. Dermatol. Res.* 296, 503–506.
- Kasting, G.B., Barai, N.D., 2003. Equilibrium Water Sorption in Human Stratum Corneum. *J. Pharm. Sci.* 92, 1624–1631.
- Kawasaki, H., Nagao, K., Kubo, A., Hata, T., 2012. Altered stratum corneum barrier and enhanced percutaneous immune responses in filaggrin-null mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* 129, 1538–1546.
- Kezic, S., Kemperman, P., Koster, E., Al, E., 2008. Loss-of-Function Mutations in the Filaggrin Gene Lead to Reduced Level of Natural Moisturizing Factor in the Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* 128, 2117–2119.

Kezic, S., Regan, G.M.O., Yau, N., Sandilands, A., Chen, H., Campbell, L.E., Kroboth, K., Watson, R., Rowland, M., Mclean, W.H.I., Irvine, A.D., 2011. Levels of filaggrin degradation products are influenced by both filaggrin genotype and atopic dermatitis severity. *Allergy* 66, 934–940.

Kimata, H., 2006. Improvement of Atopic Dermatitis and Reduction of Skin Allergic Responses by Oral Intake of Konjac Ceramide. *Pediatr. Dermatol.* 23, 386–389.

Koch, P.J., Viragh, P.A. De, Scharer, E., Bundman, D., Longley, M.A., Bickenbach, J., Kawachi, Y., Suga, Y., Zhou, Z., Huber, M., Hohl, D., Kartasova, T., Jarnik, M., Steven, A.C., Roop, D.R., 2000. Lessons from Loricrin-deficient Mice: Compensatory Mechanisms Maintaining Skin Barrier Function in the Absence of a Major Cornified Envelope Protein. *J. Cell Biol.* 151, 389–400.

Komatsu, N., Saijoh, K., Kuk, C., Liu, A.C., Khan, S., Shirasaki, F., Takehara, K., Diamandis, E.P., 2007. Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients. *Exp. Dermatol.* 16, 513–519.

Kondo, H., Ichikawa, Y., Imokawa, G., 1998. Percutaneous sensitization with allergens through barrier-disrupted skin elicits a Th2-dominant cytokine response. *Eur. J. Immunol.* 28, 769–779.

Lau-Gillard, P.J., Hill, P.B., Chesney, C.J., Budleigh, C., 2009. Evaluation of a hand-held evaporimeter (VapoMeter) for the measurement of transepidermal water loss in healthy dogs. *Vet. Dermatol.* 21, 136–145.

Lee, C., Chuang, H., Shih, C., Jong, S., Chang, C., Yu, H., 2006. Transepidermal water loss, serum IgE and b-endorphin as important and independent biological markers for development of itch intensity in atopic dermatitis. *Br. J. Dermatol.* 154, 1100–1107.

Lee, H.S.J.Y., Chal, C., Kuot, K., 1997. Depletion of stratum corneum intercellular lipid lamellae and barrier function abnormalities after long-term topical corticosteroids. *Br. J. Dermatol.* 136, 884–890.

Levin, J., Friedlander, S.F., Del Rosso, J.Q., 2013a. Atopic Dermatitis and the Stratum Corneum Part 1: The Role of Filaggrin in the Stratum Corneum Barrier and Atopic Skin. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 6, 16–22.

Levin, J., Rosso, J.Q. Del, Friedlander, S.F., 2013b. Atopic Dermatitis and the Stratum Corneum Part 2: Other Structural and Functional Characteristics of the Stratum Corneum Barrier in Atopic Skin. *J. Clin. Aesthet. Dermatol.* 6, 49–54.

Litzlbauer, P., Weber, K., Mueller, R.S., 2014. Oral and subcutaneous therapy of canine atopic dermatitis with recombinant feline interferon omega. *Cytokine* 66, 54–59.

Lodén, M., Andersson, A.C., Lindberg, M., 1999. Improvement in skin barrier function in patients with atopic dermatitis after treatment with a moisturizing cream. *Br. J. Dermatol.* 140, 264–267.

Loewenstein, C., Mueller, R.S., 2009. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Vet. Dermatol.* 20, 84–98

Madison, K.C., 2003. Barrier Function of the Skin: “La Raison d’être” of the Epidermis. *J. Invest. Dermatol.* 121, 231–241.

Man, M., Feingold, K., Elias, P., 1993. Exogenous lipids influence permeability barrier recovery in acetone-treated murine skin. *Arch. Dermatol. Res.* 129, 728–738.

Marekov, L.N., Steinert, P.M., 1998. Ceramides Are Bound to Structural Proteins of the Human Foreskin Epidermal Cornified Cell Envelope Ceramides Are Bound to Structural Proteins of the Human Foreskin Epidermal Cornified Cell Envelope. *J. Biol. Chem.* 273, 17763–17770.

Marsella, R., 2012. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet. Med. Res. Reports* 3, 85–91.

Marsella, R., Girolomoni, G., 2009. Canine models of atopic dermatitis: a useful tool with untapped potential. *J. Invest. Dermatol.* 129, 2351–7.

Marsella, R., Nicklin, C., Lopez, J., 2006. Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to. *Vet. Dermatol.* 17, 306–312.

Marsella, R., Olivry, T., Carlotti, D.-N., 2011. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 22, 239–248.

Marsella, R., Olivry, T., Maeda, S., 2006a. Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles. *Vet. Dermatol.* 17, 111–120.

Marsella, R., Olivry, T., Nicklin, C., Lopez, J., 2006b. 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. *Vet. Dermatol.* 17, 24–35.

Marsella, R., Samuelson, D., 2009. Unravelling the skin barrier: a new paradigm for atopic dermatitis and house dust mites. *Vet. Dermatol.* 20, 533–40.

Marsella, R., Samuelson, D., Doerr, K., 2010. Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 21, 81–88.

Marsella, R., Samuelson, D., Harrington, L., 2009. Immunohistochemical evaluation of filaggrin polyclonal antibody in atopic and normal beagles. *Vet. Dermatol.* 20, 547–54.

Marsella, R., Sousa, C.A., Gonzales, A.J., Fadok, V.A., 2012. Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *Vet. Med. Today* 241, 194–207.

Marsh, K.A., Ruedisueli, F.L., Coe, S.L., Timothy, D.G., 2000. Effects of zinc and linoleic acid supplementation on the skin and coat quality of dogs receiving a complete and balanced diet. *Vet. Dermatol.* 11, 277–284.

Mason, D., Powri, F., 1998. Control of immune pathology by regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* 10, 649–655.

Masukawa, Y., Narita, H., Sato, H., Naoe, A., Kondo, N., Sugai, Y., Oba, T., Homma, R., Ishikawa, J., Takagi, Y., Kitahara, T., 2009. Comprehensive quantification of ceramide species in human stratum corneum. *J. Lipid Res.* 50, 1708–1719.

Matsumoto, M., Zhou, Y., Matsuo, S., Nakanishi, H., Hirose, K., Oura, H., Arase, S., 2008. Targeted deletion of the murine corneodesmosin gene delineates its essential role in skin and hair physiology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 6720–6724.

Matsumoto, T., Yuasa, H., Kai, R., Ueda, H., Ogura, S., Honda, Y., 2007. Skin capacitance in normal and atopic infants, and effects of moisturizers on atopic skin. *J. Dermatol.* 34, 447–450.

Meckfessel, M.H., Brandt, S., 2014. The structure, function, and importance of ceramides in skin and their use as therapeutic agents in skin-care products. *J. Am. Dermatology* 71, 177–184.

Meury, S., Molitor, V., Doherr, M.G., Roosje, P., Leeb, T., Hobi, S., Wilhelm, S., Favrot, C., 2011. Role of the environment in the development of canine atopic dermatitis in Labrador and golden retrievers. *Vet. Dermatol.* 22, 327–334.

Miller, W.H., Griffin, C.E., Campbell, K.L., 2013. *Muller & Kirk's Small Animal Dermatology*, 7 th. ed. Elsevier, St. Louis, Missouri.

Mischke, D., Korge, B., Marenholz, I., Volz, A., Ziegler, A., 1996. Genes encoding structural proteins of epidermal cornification and S100 calcium-binding proteins form a Gene Complex on Human Chromosome 1q21. *J. Invest. Dermatol.* 106, 989–992.

Miyanishi, K., Shiono, N., Shirai, H., Dombo, M., Kimata, H., 2005. Reduction of transepidermal water loss by oral intake of glucosylceramides in patients with atopic eczema. *Allergy* 60, 1454–1455.

Mizutani, Y., Mitsutake, S., Tsuji, K., Kihara, A., Igarashi, Y., 2009. Ceramide biosynthesis in keratinocyte and its role in skin function. *Biochimie* 91, 784–790.

Mueller, R., Tsohalis, J., 1998. Evaluation of serum allergen-specific IgE for the diagnosis of food adverse reactions in the dog. *Vet. Dermatol.* 9, 167–171.

Mueller, R.S., Fieseler, K. V., Fettman, M.J., Zabel, S., Rosychuk, R.A.W., Ogilvie, G.K., 2004. Effect of omega-3 fatty acids on canine atopic dermatitis. *J. Small Anim. Pract.* 45, 293–297.

Nardo, A., Wertz, P., Giannetti, A., Seidenari, S., 1998. Ceramide and Cholesterol Composition of the Skin of Patients with Atopic Dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* 78, 27–30.

Nemes, Z., Steinert, P.M., 1999. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Exp. Mol. Med.* 31, 5–19.

Nesbitt, G.H., Freeman, L.M., Hannah, S.S., 2003. Effect of n-3 fatty acid ratio and dose on clinical manifestations, plasma fatty acids and inflammatory mediators in dogs with pruritus. *Vet. Dermatol.* 14, 67–74.

Nicander, I., Nyren, M., Emtestam, L., Ollmar, S., 1997. Baseline electrical impedance measurements at various skin sites-related to age and sex Ingrid. *Ski. Res. Technol.* 3, 252–258.

Nicander, I., Ollmar, S., 2000. Electrical impedance measurements at different skin sites related to seasonal variations. *Ski. Res. Technol.* 6, 81–86.

Nikolovski, J., Stamatias, G.N., Kollias, N., Wiegand, B.C., 2008. Barrier Function and Water-Holding and Transport Properties of Infant Stratum Corneum Are Different from Adult and Continue to Develop through the First Year of Life. *J. Invest. Dermatol.* 128, 1728–1736.

Nimmo Wilkie, J.S., Yager, J.A., Eyre, P., Parker, M., 1990. Morphometric Analyses of the Skin of Dogs with Atopic Dermatitis and Correlations with Cutaneous and Plasma Histamine and Total Serum IgE. *Vet. Pathol.* 27, 179–186.

Nishifuji, K., Yoon, J.S., 2013. The stratum corneum: the rampart of the mammalian body. *Vet. Dermatol.* 24, 60–e16.

Nishio, Y., Noguchi, E., Shibasaki, M., Kamioka, M., Ichikawa, E., Ichikawa, K., Umebayashi, Y., 2003. Association between polymorphisms in the SPINK5 gene and atopic dermatitis in the Japanese. *Genes Immun.* 4, 515–517.

Noli, C., Toma, S., 2011. *Dermatologia del cane e del gatto*, 2° ed. Editrice Poletto, Milano.

Nuttall, T.J., Knight, P.A., Mcaleese, S.M., Lamb, J.R., Hill, P.B., 2002. Expression of Th1, Th2 and immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 32, 789–795.

Oh, W., Oh, T., 2009. Mapping of the dog skin based on biophysical measurements. *Vet. Med. Today* 21, 367–372.

Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y., 2010. ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 18439–18444.

Olivry, T., 2010. New diagnostic criteria for canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 21, 124–127.

Olivry, T., 2011. Is the skin barrier abnormal in dogs with atopic dermatitis? *Vet. Immunol. Immunopathol.* 144, 11–16.

Olivry, T., Bizikova, P., 2013. A systematic review of randomized controlled trials for prevention or treatment of atopic dermatitis in dogs: 2008-2011 update. *Vet. Dermatol.* 24, 97–e26.

Olivry, T., Deboer, D.J., Jackson, H.A., Mueller, R.S., Nuttall, T., Pre, P., 2010a. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet. Dermatol.* 21, 233–248.

Olivry, T., Foster, A.P., Mueller, R.S., Mcewan, N.A., Chesney, C., Williams, H.C., 2010b. Interventions for atopic dermatitis in dogs: a systematic review of randomized controlled trials. *Vet. Dermatol.* 21, 4–22.

Olivry, T., Guaguère, E., Hèripret, D., 1997. Treatment of canine atopic dermatitis with misoprostol, a prostaglandin E1 analogue: an open study. *J. Dermatolog. Treat.* 8, 243-247.

Olivry, T., Marsella, R., Hillier, A., 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIII): are essential fatty acids effective ? *Vet. Immunol. Immunopathol.* 81, 347–362.

Olivry, T., Marsella, R., Iwasaki, T., Mueller, R., Uk, P.H., Uk, H.J., 2007. Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 18, 78–86.

Olivry, T., Moore, P.F., Affolter, V.K., Naydan, D.K., 1996. Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 288, 579–585.

Olivry, T., Rivierre, C., Jackson, H.A., Murphy, K.M., Davidson, G., Sousa, C.A., 2002a. Cyclosporine decreases skin lesions and pruritus in dogs with atopic dermatitis: a blinded randomized prednisolone-controlled trial. *Vet. Dermatol.* 13, 77–87.

Olivry, T., Saridomichelakis, M., Nuttall, T., Bensignor, E., Craig, E., Hill, P.B., Committee, I., Icada, A., 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. *Vet. Dermatol.* 25, 77–86.

Olivry, T., Steffan, J., Fisch, R.D., Prélaud, P., Guaguère, E., Fontaine, J., Carlotti, D.N., 2002b. Randomized controlled trial of the efficacy of cyclosporine in the treatment of atopic dermatitis in dogs. *JAVMA* 221, 370–377.

Olivry, T., Wofford, J., Paps, J.S., Dunston, S.M., 2010c. Stratum corneum removal facilitates experimental sensitization to mite allergens in atopic dogs. *Vet. Dermatol.* 22, 188–196.

Palmer, C.N.A., Irvine, A.D., Terron-kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S.P., Regan, M.O., Goudie, D.R., Sandilands, A., Campbell, L.E., Smith, F.J.D., Watson, R.M., Cecil, J.E., Bale, S.J., Compton, J.G., Digiovanna, J.J., Fleckman, P., Lewis-jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C.S., Houate, B. El, Mcelreavey, K., Halkjaer, L.B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S., Mclean, W.H.I., 2006. Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nat. Genet.* 38, 441–446.

Paterson, S., 2008. *Manual of Skin Diseases of the Dog and Cat*, 2 th. ed. Blackwell Publishing, The Atrium, Southern Gate.

Patzelt, A., Lademann, J., Richter, H., Darvin, M.E., Schanzer, S., Thiede, G., Sterry, W., Vergou, T., Hauser, M., 2012. In vivo investigations on the penetration of various oils and their influence on the skin barrier. *Ski. Res. Technol.* 18, 364–369.

Pearton, D.J., Dale, B.A., Presland, R.B., 2002. Functional Analysis of the Profilaggrin N-Terminal Peptide: Identification of Domains that Regulate Nuclear and Cytoplasmic Distribution. *J. Invest. Dermatol.* 119, 661–669.

Pelucchi, C., Galeone, C., Vecchia, L., 2013. Pet exposure and risk of atopic dermatitis at the pediatric age: A meta-analysis of birth cohort studies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 132, 616–622.

Piekutowska, A., Pin, D., Rème, C.A., Gatto, H., Haftek, M., 2008. Effects of a topically applied preparation of epidermal lipids on the stratum corneum barrier of atopic dogs. *J. Comp. Pathol.* 138, 197–203.

Popa, I., Pin, D., Remoué, N., 2011a. Analysis of epidermal lipids in normal and atopic dogs , before and after administration of an oral omega-6/omega-3 fatty acid feed supplement. A pilot study. *Vet Res Commun* 35, 501–509.

Popa, I., Remoue, N., Hoang, L.T., Pin, D., Gatto, H., Haftek, M., Portoukalian, J., 2011b. Atopic dermatitis in dogs is associated with a high heterogeneity in the distribution of protein-bound lipids within the stratum corneum. *Arch. Dermatol. Res.* 303, 433–40.

Popa, I., Remoue, N., Osta, B., Pin, D., Gatto, H., Haftek, M., Portoukalian, J., 2012. The lipid alterations in the stratum corneum of dogs with atopic dermatitis are alleviated by topical application of a sphingolipid-containing emulsion. *Clin. Exp. Dermatol.* 37, 665–671.

Prelaud, P., Cochet-Faivre, N., 2007. A retrospective study of 21 cases of canine atopic-like dermatitis (abstr), in: *Proceedings. 22nd Ann Cong Eur Soc Vet Dermatol Eur Coll Vet Dermatol.* p. 101.

Presland, R.B., Boggess, D., Lewis, S.P., Hull, C., Fleckman, P., Sundberg, J.P., 2000. Loss of Normal Profilaggrin and Filaggrin in Flaky Tail (ft/ft) Mice: an Animal Model for the Filaggrin-Deficient Skin Disease Ichthyosis Vulgaris. *J. Invest. Dermatol.* 115, 1072–1081.

Presland, R.B., Kuechle, M.K., Lewis, S.P., Fleckman, P., Dale, B.A., 2001. Regulated Expression of Human Filaggrin in Keratinocytes Results in Cytoskeletal Disruption , Loss of Cell-Cell Adhesion , and Cell Cycle Arrest. *Exp Cell Res* 270, 199–213.

Proksch, E., Brandner, J.M., Jensen, J., 2008. The skin : an indispensable barrier. *Exp. Mol. Med.* 17, 1063–1072.

Proksch, E., Feingold, K.R., Elias, P.M., 1992. Epidermal HMG CoA reductase activity in essential fatty acid deficiency barrier requirements rather than eicosanoid generation regulate cholesterol synthesis. *J. Invest. Dermatol.* 99, 216–220.

Queralt, M., Mora, F. De, Ferrer, L., Puigdemont, A., 1998. Comparative study of histamine release from skin mast cells dispersed from atopic , ascaris-sensitive and healthy dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66, 43–51.

Rawlings, A.V., Harding, C.R., 2004. Moisturization and skin barrier function. *Dermatol. Ther.* 17, 43–48.

Regan, M.O., Clayton, T.H., Sandilands, A., Terron-kwiatkowski, A., Hull, P.R., Watson, R.M., Carrick, T., Evans, A.T., Liao, H., Zhao, Y., Campbell, L.E., Schmuth, M., Gruber, R., Janecke, A.R., Elias, P.M., Steensel, M.A.M. Van, Nagtzaam, I., Geel, M. Van, Steijlen, P.M., Munro, C.S., Bradley, D.G., Palmer, C.N.A., Smith, F.J.D., Mclean, W.H.I., Irvine, A.D., 2007. Comprehensive analysis of the gene encoding filaggrin uncovers prevalent and rare mutations in ichthyosis vulgaris and atopic eczema. *Nat. Genet.* 39, 650–654.

Reiter, L. V, Torres, S.M.F., Wertz, P.W., 2009. Characterization and quantification of ceramides in the nonlesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared with controls. *Vet. Dermatol.* 20, 260–6.

Rendell, M., Baig-Lewis, S., Berry, T., Denny, M., Simpson, B., Brown, P., 2011. Do early skin care practices alter the risk of atopic dermatitis? a case-control study. *Pediatr. Dermatol.* 28, 593–595.

Resing, A., Walsh, A., 1993. Characterization of Protease Processing Sites during Conversion of Rat Profilaggrin to Filaggrin. *Biochemistry* 32, 10036–10045.

Roedl, D., Ring, J., Behrendt, H., 2009. Serine protease inhibitor lymphoepithelial Kazal type-related inhibitor tends to be decreased in atopic dermatitis. *Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 23, 1263–1266.

Roque, J.B., O’Leary, C. a, Kyaw-Tanner, M., Duffy, D.L., Shipstone, M., 2011. Real-time PCR quantification of the canine filaggrin orthologue in the skin of atopic and non-atopic dogs: a pilot study. *BMC Res. Notes* 4, 554.

Roudebush, P., Bloom, P., Jewell, D., 2001. Consumption of essential fatty acid in selected commercial dog food compared to dietary supplementation, in: *Annual Meeting of the American Academy of Veterinary Dermatology & American College of Veterinary Dermatology.* p. 43.

Sævik, B.K., Bergvall, K., Holm, B.R., 2004. A randomized , controlled study to evaluate the steroid sparing effect of essential fatty acid supplementation in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 15, 137–145.

Sandilands, A., Sutherland, C., Irvine, A.D., McLean, W.H.I., 2009. Filaggrin in the frontline: role in skin barrier function and disease. *J. Cell Sci.* 122, 1285–94.

Santoro, D., Marsella, R., Ahrens, K., Graves, T.K., Bunick, D., 2013. Altered mRNA and protein expression of filaggrin in the skin of a canine animal model for atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 24, 329–e73.

Santoro, D., Marsella, R., Pucheu-Haston, C.M., Eisenschenk, M.N.C., Nuttall, T., Bizikova, P., 2015. Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host-micro-organism interaction. *Vet. Dermatol.* In press, doi 10.1111/vde.12197

Sato, J., Denda, M., Nakanishi, J., Nomura, J., Koyama, J., 1998. Cholesterol Sulfate Inhibits Proteases that are Involved in Desquamation of Stratum Corneum. *J. Invest. Dermatol.* 111, 189–193.

Serre, G., Mils, V., Haftek, M., Vincent, C., Croute, F., 1991. Identification of late differentiation antigens of human cornified epithelia, expressed in re-organized desmosomes and bound to cross-linked envelope. *J. Invest. Dermatol.* 97, 1061–1072.

Shah, J.H., Zhai, H., Maibach, H.I., 2005. Comparative evaporimetry in man. *Ski. Res. Technol.* 11, 205–208.

Shimada, K., Yoon, J.-S., Yoshihara, T., Iwasaki, T., Nishifuji, K., 2009. Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 20, 541–6.

Shimada, K., Yoshihara, T., Yamamoto, M., Konno, K., Momoi, Y., Nishifuji, K., Iwasaki, T., 2008. Transepidermal water loss (TEWL) reflects skin barrier function of dog. *J. Vet. Med. Sci.* 70, 841–3.

Shimizu, H., 2007. Shimizu's textbook of Dermatology, 1 st. ed. Nakayama Shoten Publishers, Hokkaido.

Simon, M., Montézin, M., Durieux, J., Serre, G., Monte, M., Guerrin, M., 1997. Characterization and Purification of Human Corneodesmosin , an Epidermal Basic Glycoprotein Associated with Corneocyte-specific Modified Desmosomes. *J. Biol. Chem.* 272, 31770–31776.

Simou, C., Thoday, K.L., Forsythe, P.J., Hill, P.B., 2005. Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs : effect of pyoderma , pruritus score , treatment and gender. *Vet. Dermatol.* 16, 385–391.

Simpson, E., Trookman, N.S., Rizer, R.L., Johnson, L.A., Preston, N., Colo, L.E., Gottschalk, R.W., 2012. Safety and Tolerability of a Body Wash and Moisturizer When Applied to Infants and Toddlers with a History of Atopic Dermatitis : Results from an Open-Label Study. *Pediatr. Dermatol.* 29, 590–597.

Simpson, E.L., 2010. Atopic dermatitis: a review of topical treatment options. *Curr. Med. Res. Opin.* 26, 633–640.

Smeden, J. Van, Janssens, M., Kaye, E.C.J., Caspers, P.J., Lavrijsen, A.P., Vreeken, R.J., Bouwstra, J.A., 2014. The importance of free fatty acid chain length for the skin barrier function in atopic eczema patients. *Exp. Dermatol.* 23, 45–52.

Sparavigna, A., Setarol, M., Gualandri, V., 1999. Cutaneous pH in children affected by atopic dermatitis and in healthy children: a multicenter study. *Ski. Res. Technol.* 5, 221–227.

Steffan, J., Favrot, C., Mueller, R., 2006. A systematic review and meta-analysis of the efficacy and safety of cyclosporin for the treatment of atopic dermatitis in dogs. *Vet. Dermatol.* 17, 3–16.

Steinert, P., Candi, E., Kartasova, T., Marekov, L., 1998. Small Proline-Rich Proteins Are Cross-Bridging Proteins in the Cornified Cell Envelopes of Stratified Squamous Epithelia 1. *J. Struct. Biol.* 122, 76–85.

Steinert, P., Nemes, Z., Marekov, L., 1999. A novel function for transglutaminase 1: Attachment of long-chain ω -hydroxyceramides to involucrin by ester bond formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 8402–8407.

Steven, A.C., Steinert, P.M., 1994. Protein composition of cornified cell envelopes of epidermal keratinocytes. *J. Cell Sci.* 700, 693–700.

Sugawara, T., Iwamoto, N., Akashi, M., Kojima, T., Hisatsune, J., 2013. Tight junction dysfunction in the stratum granulosum leads to aberrant stratum corneum barrier function in claudin-1-deficient mice. *J. Dermatol. Sci.* 70, 12–18.

Swinnen, C., Vroom, M., 2004. The clinical effect of environmental control of house dust mites in 60 house dust mite-sensitive dogs. *Vet. Dermatol.* 15, 31–36.

Terada, Y., Nagata, M., Murayama, N., Nanko, H., 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. *J. Dermatol.* 38, 784–790.

Terranova, F., 2006. *Fisiopatologia dell'idratazione cutanea*, 1° ed. Tecniche nuove, Milano.

Tesfaigzi, J., Carlson, D.M., 1999. Expression, Regulation, and Function of the SPR Family of Proteins: A Review. *Cell Biochem Biophys* 30, 243–265.

Theerawatanasirikul, S., Sailasuta, A., Thanawongnuwech, R., 2012. Alterations of keratins, involucrin and filaggrin gene expression in canine atopic dermatitis. *Res. Vet. Sci.* 93, 1287–1292.

Tokura, Y., 2010. Extrinsic and intrinsic types of atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 58, 1–7.

Trautmann, A., Akdis, M., Kleemann, D., Altnauer, F., Simon, H., Graeve, T., Noll, M., Bröcker, E., Blaser, K., Akdis, C.A., 2000. T cell – mediated Fas-induced keratinocyte apoptosis plays a key pathogenetic role in eczematous dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 106, 25–35.

Tsai, T., 1999. How irritant is water? An overview. *Contact Dermatitis* 41, 311–314.

Vasilopoulos, Y., Cork, A.M.J., Murphy, A.R., Williams, H.C., Robinson, D.A., Duff, A.G.W., Ward, A.S.J., 2004. Genetic Association Between an AACC Insertion in the 3' UTR of the Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme Gene and Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 123, 62–66.

Vasireddy, V., Uchida, Y., Jr, N.S., Kim, S.Y., Mandal, N.A., Reddy, G.B., Bodepudi, R., Nathan, L., Brown, J.C., Hama, H., Dlugosz, A., Elias, P.M., Walter, M., Ayyagari, R., 2007. Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids ($\geq C28$) and the unique ω -O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Hum. Mol. Genet.* 16, 471–482.

Wang, X., Schunck, A.M., Kallen, A.K., Neumann, C., Trautwein, A.C., A, E.P., 2004. The Interleukin-6 Cytokine System Regulates Epidermal Permeability Barrier Homeostasis. *J. Invest. Dermatol.* 123, 124–131.

Wartewig, S., 2007. Properties of Ceramides and Their Impact on the Stratum Corneum Structure : A Review. *Ski. Pharmacol Physiol* 20, 220–229.

Watson, A., Fray, T., Bailey, J., Baker, C., Beyer, S., Markwell, P., 2006. Dietary constituents are able to play a beneficial role in canine epidermal barrier function. *Exp. Dermatol.* 15, 74–81.

Weidinger, S., Rodriguez, E., Stahl, C., Wagenpfeil, S., Klopp, N., Illig, T., Novak, N., 2007. Filaggrin Mutations Strongly Predispose to Early-Onset and Extrinsic Atopic Dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* 127, 724–726.

Werner, Y., Lindberg, M., 1985. Transepidermal Water Loss in Dry an Clinically Normal Skin in Patients with Atopic Dermatitis. *Acta Derm. Venereol.* 65, 102–105.

Wickett, R.R., Visscher, M.O., 2006. Structure and function of the epidermal barrier. *AJIC* 34, 98–110.

Wiren, K., Nohlgard, C., Nyberg, F., Holm, L., Svensson, M., Johannesson, A., Wallberg, P., Berne, B., Edlund, F., Lode, M., 2009. Treatment with a barrier-strengthening moisturizing cream delays relapse of atopic dermatitis : a prospective and randomized controlled clinical trial. *Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 23, 1267–1272.

Wood, S.H., Clements, D.N., Ollier, W.E., Nuttall, T., McEwan, N.A., Carter, S.D., 2009. Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores. *J. Dermatol. Sci.* 55, 27–33.

Wood, S.H., Ke, X., Nuttall, T., McEwan, N., Ollier, W.E., Carter, S.D., 2009. Genome-wide association analysis of canine atopic dermatitis and identification of disease related SNPs. *Immunogenetics* 61, 765–72.

Yamamoto, A., Serizawa, S., Ito, M., Sato, Y., 1991. Stratum corneum lipid abnormalities in atopic dermatitis. *Arch. Dermatol. Res.* 283, 219–223.

Yanagi, T., Akiyama, M., Nishihara, H., Sakai, K., Nishie, W., 2008. Harlequin ichthyosis model mouse reveals alveolar collapse and severe fetal skin barrier defects. *Hum. Mol. Genet.* 17, 3075–3083.

Yoon, J.-S., Nishifuji, K., Sasaki, A., Ide, K., Ishikawa, J., Yoshihara, T., Iwasaki, T., 2011. Alteration of stratum corneum ceramide profiles in spontaneous canine model of atopic dermatitis. *Exp. Dermatol.* 20, 732–6.

Young, L.A., Dodge, J.C., Guest, K.J., Cline, J.L., Kerr, W.W., 2002. Age, Breed, Sex and Period Effects on Skin Biophysical Parameters for Dogs Fed Canned Dog Food. *J. Nutr.* 132, 1695–1697.

Zajac, M., Szczepanik, M.P., Wilkołek, P.M., Adamek, L.R., Pomorski, Z.J.H., Sitkowski, W., Gołyński, M.G., 2014. Assessment of the relationship between transepidermal water loss (TEWL) and severity of clinical signs (CADESI-03) in atopic dogs. *Vet. Dermatol.* 25, 1–5.

Zeeuwen, P.L.J.M., Vlijmen-willems, I.M.J.J. Van, Olthuis, D., Johansen, H.T., Hitomi, K., Hara-nishimura, I., Powers, J.C., James, K.E., Camp, H.J. Den, Lemmens, R., Schalkwijk, J., 2004. Evidence that unrestricted legumain activity is involved in disturbed epidermal cornification in cystatin M/E deficient mice. *Hum. Mol. Genet.* 13, 1069–1079.