

Associação do sistema de hidrogel polimérico ao anticorpo LUP37C11 no tratamento do pavilhão auricular e poro acústico de cães com dermatite atópica: resultados preliminares

Vanessa Dressler Siegert^{1*}, Gustavo Henrique Marques Araújo¹, Alana Flávia Romani¹, Jair Ribeiro Chagas², Marcelo Bergamin Zani³, Micael Siegert Schimmunech⁴

Submitted: 18/02/2024

Accepted: 24/04/2024

¹Universidade Federal de Jataí – Jataí/GO, Unidade Acadêmica Especial de Ciências Agrárias - CIAGRA. Rodovia BR-364 - km 195, nº 3800 – CIAGRA Setor Francisco Antônio 75801615 - Jataí, GO – Brasil. Email: vanessadresslersiegert@gmail.com ORCID: 0009-0003-9120-8295, Email: gustavoaraujovet@gmail.com ORCID: 0000-0003-3781-7068, Email: alana_romani@ufj.edu.br ORCID: 0000-0002-8138-408X

²Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Psicobiologia. Rua Napoleão de Barros 925, Vila Clementino 04024002 - São Paulo, SP – Brasil. Email: jchagas9@gmail.com ORCID: 0000-0002-0357-8276

³Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Biofísica. Rua Pedro de Toledo, 669, Laboratório de Enzimologia, 7º Andar Vila Clementino 04024002 - São Paulo, SP – Brasil. Email: marcelobezani@gmail.com ORCID: 0000-0003-0777-1433

⁴Laboratório de Parasitologia Clínica Veterinária, Universidade Federal do Paraná. Rua dos Funcionários, 1540. CEP. 80.035-050. Curitiba, PR, Brasil. Email: micaelsiegert@hotmail.com ORCID: 0000-0001-8610-8052

*Email para correspondência: vanessadresslersiegert@gmail.com

Resumo: A dermatite atópica canina (DAC) é uma doença caracterizada por inflamação, infecções secundárias e prurido que frequentemente afeta os pavilhões auriculares e condutos auditivos dos cães. A atividade excessiva de algumas proteases, como a calicreína 7 (KLK7), tem sido reportada como anormalidade característica que contribui para o defeito da barreira epidérmica em pacientes com DAC. O presente estudo avaliou a apresentação, formulação e efeitos adversos de um sistema de hidrogel polimérico. Utilizou-se o sistema de hidrogel polimérico puro e em associação ao LUP37C11 (anticorpo anti-KLK7 humano), no tratamento tópico do pavilhão auricular e poro acústico de cães não atópicos e de cães diagnosticados com DAC. Os tratamentos foram instituídos com o LUP37C11 na concentração de 1 µg/mL em veículo de hidrogel polimérico no pavilhão auricular e poro acústico em uma orelha e somente o hidrogel polimérico na mesma região da orelha contralateral. Os tratamentos foram randomizados e realizados em “duplo-cego”, com aplicações diárias dos produtos em cada orelha durante 8 dias consecutivos. A região tratada foi avaliada através de citologia para a presença de células inflamatórias, bactérias e leveduras (*Malassezia* spp.), e quanto a presença de eritema, edema, erosão/ulceração e exsudato, de acordo com o Índice de Pontuação de Otite (OTIS3). Os animais saudáveis não apresentaram alteração dos parâmetros avaliados, mostrando que os tratamentos empregados não apresentaram efeitos adversos. Para os animais atópicos foi observado diferença significativa ($p=0,002$) no fator tempo, com melhora nos resultados pós-tratamento. Entretanto, não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre os tratamentos (pré e pós) para o grupo dos animais atópicos. Os tratamentos utilizados neste estudo se mostraram promissores empregando as orelhas, e se correlacionado com o OTIS3, de modo que os produtos precisam ser aprimorados e padronizados para o tratamento da otite alérgica.

Palavras-chaves: alergia, atopia, calicreína, imunobiológico, barreira cutânea, otite.

1. Introdução

A Dermatite Atópica em humanos (DA) e em cães (DAC) é uma doença dermatológica inflamatória crônica, e uma condição prevalente na rotina clínica de ambas as espécies. Assim como em humanos, os cães desenvolvem espontaneamente a doença, demonstrando uma estreita semelhança entre a fisiopatologia, sinais clínicos e resposta terapêutica à doença nas duas espécies (Olivry, 2012). A DAC apresenta interações complexas das respostas imunológicas inata e adaptativa, de fatores ambientais e de fatores genéticos em pacientes predispostos. A fisiopatologia da DAC está relacionada a alterações que conduzem a distúrbios da função de barreira da pele, defeitos na resposta imune antimicrobiana, hipersensibilidade cutânea a alérgenos ambientais e a抗ígenos microbianos e trofoalérgenos (Choi et al., 2016; Marsella & de Benedetto, 2017; Szajewska & Nowak-Wegrzyn, 2017; Langan et al., 2020). A prevalência da DAC alcança 15% e representa 30% dos atendimentos de dermatopatias em pequenos animais, sendo uma das causas mais frequentes de prurido observado nos consultórios veterinários (Miller W., 2012). Calessso et.al (2021) revelaram que de todos os diagnósticos dermatológicos, entre 2015 e 2020, realizados no serviço de dermatologia do Hospital Veterinário da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), 28,12% foram de cães com DAC.

Na DAC, as regiões preferencialmente acometidas são a periocular, perialabial, face interna das orelhas e conduto auditivo, axilas, patas, flexura antecubital, área inguinal e abdome (Hensel et al., 2015; Favrot et al., 2020). Indivíduos acometidos pela DAC apresentam em geral, antecedente próprio ou familiar da doença, no estágio agudo eczema caracterizado por eritema mal definido e edema, e no estágio crônico, placa eritematosa bem definida, descamativa e com grau variável de liquenificação (Antunes et al., 2017). A DA compartilha semelhanças clínicas e imunológicas com a DAC sendo caracterizada principalmente por eritema, liquenificação, xerose e descamação, podendo acometer orelhas, mãos, antebraço, pescoço e peito nos humanos, e, orelhas, patas, região antebraquial, pescoço e tórax em cães (Marsella e De Benedetto, 2017). O pavilhão auricular e condutos auditivos são apontados como regiões preferencialmente acometidas na DAC, e, como o epitélio que recobre a orelha é anatômica e funcionalmente uma extensão da pele que recobre o corpo, as alterações encontradas na otite externa causada por DAC são reflexos da doença, caracterizando-se também por inflamação e infecção secundária (otite alérgica).

O diagnóstico da DAC é feito pela exclusão de outras causas de dermatites, histórico clínico e a interpretação de critérios clínicos conhecidos como critérios de Favrot (Favrot et al., 2010). No estágio agudo da doença, os cães apresentam eczema caracterizado por eritema mal definido e edema. Já no estágio crônico, apresentam placa eritematosa bem definida, descamativa e com grau variável de liquenificação (Antunes et al., 2017). A alteração na barreira cutânea é um dos distúrbios relacionados à DAC e contribui para o desequilíbrio microbiano, desestabilizando o mecanismo de homeostase nas relações entre o sistema imunológico e microbiota normal. Dessa forma, as células imunes residentes na pele associadas às células epiteliais, deixam de manter o sofisticado sistema de barreira que garante uma simbiose estável. A sinalização prejudicada entre as células da pele e os microrganismos leva também a condições dermatológicas inflamatórias como visto na DAC (Pierezan et al., 2016; Kobayashi & Imanishi, 2021). Os defeitos na barreira cutânea em pacientes com DAC contribuem com alterações que levam à maior penetração de alérgenos, toxinas microbianas e substâncias irritantes, que por sua vez, estimulam a resposta imune inflamatória exacerbada (Bouwstra & Ponec, 2006).

As calicreínas teciduais (KLKs) constituem um grupo de serino proteases relacionadas a uma variedade de processos fisiológicos e encontradas em diversos tecidos e fluidos biológicos, como nas glândulas salivares, na pele, pâncreas e no sistema nervoso central (Moreau et al., 2005). A participação ativa das KLKs na homeostase epidermal, particularmente no processo de descamação da pele, é importante para a contínua renovação do tecido epitelial (Nishifushi, 2013; Fanton et al., 2017). Essas enzimas são responsáveis pela clivagem dos corneodesmossomos, que são estruturas proteicas responsáveis pela coesão celular na camada córnea da pele (Ekholm et al., 2000; Ishida-Yamamoto et al., 2005; Ovaere et al., 2009). As KLKs são secretadas a partir dos corpos lamelares como foi demonstrado por Sondell et al (1995) e Ishida-Yamamoto et al (2004), e são inibidas pela ação endógena de inibidores proteicos como o inibidor do tipo Kazal (LEKTI), mas podem ainda ser moduladas pela ação de outras proteases ou por autólise (Fischer & Meyer-Hoffert, 2013; Nishifushi & Yoon, 2013). Conforme as células epiteliais migram para as camadas mais superficiais da pele, as KLKs se dissociam do LEKTI e passam a ser ativas, causando a degradação dos corneodesmossomos e, consequentemente, a descamação da pele (Lundwall & Brattsand, 2008; Matsui & Amagai, 2015; Proksch, 2018) (Figura 1).

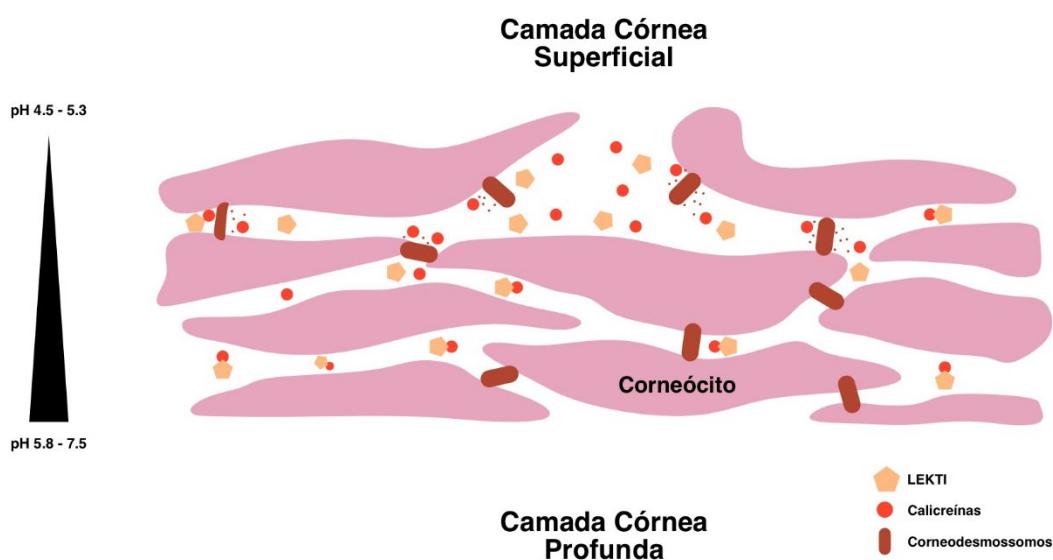


Figura 1 – Modelo de descamação: o pH controla a atividade das calicreínas regulando sua interação com o inibidor LEKTI (Adaptado de Deraison et al., 2007).

A atividade excessiva das calicreínas epidérmicas é reconhecida como uma anormalidade característica que afeta a barreira cutânea, aumentando significativamente a descamação, observando-se principalmente xrose, hiperqueratose e liquenificação (Ghadially et al., 1992; Bernard et al., 2001). A KLK7, também chamada de enzima quimiotriptica da camada córnea, é uma serino protease expressa especificamente na camada córnea (Ekholm & Egelrud, 1999). Johnson et al. (2003), indicaram que a KLK7 é expressa anormalmente na pele onde a cinética das células epidérmicas é interrompida devido a defeitos herdados ou adquiridos. O aumento na expressão de KLKs na epiderme de pacientes com DA é expressivamente representado pelo aumento na expressão de KLK7 (Komatsu et al., 2007; Voegeli et al., 2009; Nauroy & Nyström, 2020). Modelos murinos de eczema apresentaram atividade da KLK7 aumentada em lesões de eczema crônico (Bäckman et al., 2002).

A natureza específica e altamente direcionada da reação imune normal do organismo a uma doença é aplicada no desenvolvimento da abordagem terapêutica com anticorpos, também conhecido como imunobiológicos (Lee et al., 2020). O Lokivetmab é um imunobiológico caninizado anti-IL-31, aprovado para uso em cães com DAC. Diminui significativamente o prurido por pelo menos 4 semanas (Michels et al., 2016). Sua eficácia é comparável à ciclosporina oral (Moyaert et al., 2017).

Lokivetmab é considerado seguro sem quaisquer reações de hipersensibilidade. Até o momento não existe nenhum outro anticorpo terapêutico aprovado para tratamento em DAC. Pensando no desenvolvimento de um fármaco tópico para o tratamento das doenças de pele relacionadas à KLK7, foi gerado o anticorpo LUP37C11, sob número de processo BR 10 2020 009679 6 no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) encapsulado em um sistema de hidrogel polimérico para liberação controlada do fármaco na pele humana (Laureano, 2020).

O anticorpo LUP37C11 foi desenvolvido pela Universidade Federal do ABC (UFABC) em parceria com a Technische Universität Braunschweig (TUB) e se mostrou capaz de inibir a atividade da KLK7 humana *in vitro* com bastante eficiência, sendo uma molécula promissora para o tratamento da DA e DAC (Laureano, 2020). Visto o importante papel da barreira cutânea e o envolvimento da KLK7, o presente estudo objetivou avaliar a segurança, tolerabilidade e os efeitos clínicos do sistema de hidrogel polimérico puro, comparando com o sistema de hidrogel polimérico em associação ao anticorpo LUP37C11, na pele do pavilhão auricular de cães com otite externa, diagnosticados com DAC.

2. Materiais e Métodos

O presente estudo foi um ensaio clínico pragmático, intra-animal, duplo cego, randomizado (Souza, 2009). Utilizou-se o veículo como controle, dividido em duas etapas: a primeira utilizando como modelo 10 cães não atópicos e sem otite, e a segunda utilizando 7 cães diagnosticados com DAC e otite externa bilateral associado. Os experimentos foram realizados em uma clínica veterinária privada, na cidade de Itumbiara, Goiás. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Jataí (CEUA – UFJ), sob o protocolo número 009/2022, com termo de livre consentimento dos tutores dos animais.

2.1. Critérios de inclusão e exclusão

Na primeira etapa (cães não atópicos/sem otite), foram incluídos cães pertencentes a tutores, de qualquer raça, sexo, idade ou porte, em bom estado de saúde geral e sem diagnóstico de otite externa, para avaliar a apresentação, tolerabilidade e efeitos adversos e laboratoriais do sistema de hidrogel polimérico puro e em associação ao anticorpo LUP37C11. Na segunda etapa (cães atópicos/com otite) foram incluídos cães pertencentes a tutores, de qualquer raça, sexo, idade ou porte que tiveram diagnóstico confirmado de otite externa causada por DAC, com indicação de tratamento clínico tópico, para avaliar a formulação, efeitos clínicos e laboratoriais do sistema de hidrogel polimérico puro e em associação ao anticorpo LUP37C11.

Para os cães atópicos, foi estabelecido que seriam excluídos do estudo os cães que apresentassem dor excruciante, excesso de secreção nos condutos auditivos, otorreia supurativa, otocaríase, otite externa estenosante e tumores em conduto auditivo. Essas alterações impedem a adequada visualização das estruturas e/ou manejo e coleta de material durante o exame clínico. Além disso, foram excluídos animais que tivessem recebido fármaco antimicrobiano tópico auricular ou sistêmico até 14 dias antes da inclusão no estudo, fármacos anti-inflamatórios tópicos auriculares ou sistêmicos, incluindo glicocorticoides até 21 dias antes da inclusão no estudo; ciclosporina por via oral por 14 dias antes da inclusão no estudo; e limpadores auriculares tópicos por 7 dias antes da inclusão no estudo.

2.2. Avaliação clínica e coleta de amostras dos animais

Durante a realização da anamnese, dados referentes ao histórico clínico, raça, idade, sexo, foram registrados e os cães foram submetidos ao exame físico, visando avaliar o estado geral de saúde. Os cães foram submetidos a inspeção dos pavilhões auriculares e ao exame citológico. A inspeção dos condutos auditivos foi realizada em ambulatório com otoscópio veterinário (Gowlands 3123, Croydon, Reino Unido), a fim de verificar seu epitélio e membrana timpânica. A coleta da secreção otológica de todas as orelhas foi realizada na região do poro acústico por meio de *swab*. O material coletado foi transferido para uma lâmina de microscópio, e analisado por microscopia direta (Microscópio Coleman N-180, Santo André, Brasil), sem coloração a fim de investigar a presença de ácaros (aumento de 10X). Em seguida, foi realizada a coloração da lâmina empregando o corante Panótico Rápido NEW Prov, para que fosse novamente analisada quanto a presença de leveduras (*Malassezia spp.*), bactérias e células inflamatórias (Rigaut, 2011; Budach & Mueller, 2012). Para a quantificação dos microrganismos, foram avaliados pelo menos 10 campos em lente objetiva de imersão (aumento de 1000x), e a contagem média de microrganismos por campo foi registrada e quantificada seguindo os critérios de Angus (2004) e Rigaut (2011).

Os dados do exame citológico foram empregados para auxiliar na exclusão do diagnóstico de otite e comparação pré e pós-tratamentos para os cães não atópicos, e para confirmar a presença ou não de infecções secundárias e comparação pré e pós-tratamentos para os cães atópicos. As alterações observadas no exame clínico (eritema, edema/inchaço, erosão/ulceração e exsudato dos pavilhões auriculares e poro acústico) foram pontuadas de 0 a 3, empregando o Índice de Pontuação de Otite (OTIS3) (Nuttall & Bensignor, 2014). O OTIS3 foi utilizado no primeiro dia, durante e no final do tratamento, de forma independente para cada orelha dos cães incluídos. A pontuação total de cada avaliação foi calculada por meio da soma das pontuações individuais de cada alteração, podendo variar de 0 a 12. Para o grupo de cães não atópicos, animais com pontuação ≤ 3 foram incluídos no estudo, e, para o grupo de cães atópicos, animais com pontuação ≥ 4 foram incluídos no estudo (Nuttall & Bensignor, 2014).

A coleta de sangue através de punção da veia jugular foi realizada em todos os animais no primeiro dia e no final dos tratamentos para comparação pré e pós-tratamentos. O material foi acondicionado em frascos de 2 mL com EDTA K₃ Vacuplast (Bramberg am Wildkogel, Áustria), frascos de 5 mL com ativador de coágulo Vacuplast e frascos de 2 mL com fluoreto de sódio Vacuplast para realização de eritrograma, leucograma, contagem de plaquetas (Método automatizado BC 2800Vet Mindray, Shenzhen, China) e

exames bioquímicos (Alanina Transaminase, Fosfatase Alcalina, Creatinina, Uréia e Glicose – Analisador Bioquímico BTS 350 Biosystems, Barcelona, Espanha e Reagentes Vida Biotecnologia, Belo Horizonte, Brasil), respectivamente.

2.3. Delineamento experimental

Para os lotes de hidrogel utilizados nos testes, uma solução foi preparada contendo 30% de polímero 407 (Pluronic F-127, Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e 1 µg/mL do anticorpo LUP37C11 na forma scFv-Fc, produzido em células HEK293-6E. O polímero foi dissolvido em água até a total dissolução e o anticorpo foi adicionado para encapsulamento e formação do biofármaco (Laureano, 2020; Laureano et al., 2020). A metodologia de preparação e a concentração do anticorpo utilizado são as mesmas apresentadas no pedido de patente da tecnologia ao INPI, sob número de processo: BR 10 2020 009679 6. Para controle dos testes, um lote não contendo anticorpo também foi preparado. Ambos os lotes foram rotulados adequadamente para evitar a identificação, garantindo um teste duplo cego.

Os cães não atópicos/sem otite foram divididos em 2 grupos, um de 4 e outro de 6 animais. Os cães atópicos/com otite foram divididos em 2 grupos, um de 3 e outro de 4 animais. Os locais escolhidos para a aplicação do hidrogel puro (veículo) e em associação ao anticorpo LUP37C11 foram os pavilhões auriculares e poro acústico, locais frequentemente afetados pela DAC e de não acesso a lambredura. As aplicações foram administradas da mesma forma para ambos os grupos, cães não atópicos/sem otite e cães atópicos/com otite. As aplicações foram realizadas uma vez ao dia com seringa Vacuplast 1 ml sem agulha, sendo 0,5 ml em cada orelha para os cães de até 15 kg, e 1,0 ml em cada orelha para cães acima de 15 kg, durante 8 dias consecutivos. Foi realizada a remoção dos resíduos do produto na região de aplicação dos tratamentos a partir do segundo dia, com água de injeção (Equiplex, Aparecida de Goiânia, Brasil) imediatamente antes de cada aplicação. Cada animal recebeu uma dose do hidrogel com anticorpo em uma orelha, e uma dose de hidrogel sem anticorpo na outra orelha, como controle do uso do fármaco, e ao longo do tratamento as duas orelhas foram comparadas.

| Cães não atópicos/sem otite | | Cães atópicos/com otite | |
|-----------------------------|---------------|-------------------------|---------------|
| Grupo 1 | Grupo 2 | Grupo 1 | Grupo 2 |
| OD – AC | OD – Controle | OD – Controle | OD – AC |
| OE – Controle | OE – AC | OE – AC | OE - Controle |
| Cão 1 | Cão 3 | Cão 11 | Cão 13 |
| Cão 2 | Cão 7 | Cão 14 | Cão 12 |
| Cão 4 | Cão 8 | Cão 15 | Cão 17 |
| Cão 5 | Cão 9 | | Cão 16 |
| Cão 6 | | | |
| Cão 10 | | | |

Tabela 1 – Organização dos grupos experimentais. OD (orelha direita); OE (orelha esquerda); AC (hidrogel+LUP37C11); controle (hidrogel puro). A diferenciação da identificação entre os lotes hidrogel+LUP37C11 e hidrogel puro foi feita somente após o término do experimento para a realização das análises estatísticas, garantindo um teste duplo cego.

Os animais foram tratados e acompanhados através de exame clínico da pele no local de aplicação e registro fotográfico utilizando câmera digital Apple iPhone 13 Wide Angle, 26mm f1.6 (Cupertino, EUA). Foram realizadas as coletas de material para os exames (citologia das orelhas, eritrograma, leucograma, contagem de plaquetas e bioquímicos), nos dias 1 (imediatamente antes do início dos tratamentos) e no dia 9 (24 horas após o término dos tratamentos) em todos os animais; e no dia 30 (21 dias após o término dos tratamentos) nos animais que apresentaram alterações, para acompanhamento e comparação entre os resultados dos exames, e avaliação de efeitos adversos.

Foi realizada a aplicação de escore utilizando a escala OTIS3 (Nuttall & Bensignor, 2014) para ambos os quatro grupos (cães não atópicos/sem otite e cães atópicos com otite) e avaliação de parâmetros que caracterizam alterações dermatológicas de caráter inflamatório somente para o grupo cães não atópicos/sem otite (descamação, hipotricose/alopecia e hiperqueratose) (Olivry, 2012; Gedon & Mueller, 2018; Marsella & de Benedetto, 2017), dos dias 1 ao 9 em todos os animais, e no dia 30 (21 dias após o término dos tratamentos) nos animais que apresentaram alterações ao final dos tratamentos, para acompanhamento, comparação e avaliação de possíveis efeitos adversos.

2.4. Análises estatísticas

Para avaliar a diferença entre os momentos pré e pós-intervenção, tanto em animais saudáveis, como em atópicos com otite, seguindo a escala de OTIS3, foram usadas duas abordagens distintas. A primeira abordagem consistiu em um modelo de efeitos mistos de dois fatores e medidas repetidas considerando-se o tempo (pré e pós-tratamento) e o tipo de tratamento (veículo e veículo

com Ac) como variáveis independentes com testes *a posteriori* de Sidak. A segunda abordagem consistiu no teste de McNemar considerando-se o diagnóstico do animal (normal ou com otite) (Zar, 2009). As avaliações citológicas (escala de 0 a 3 para bactérias, células inflamatórias e *Malassezia spp.*) também foram avaliadas a partir de modelos de efeitos mistos de dois fatores com medidas repetidas, sendo o tempo e o tipo de tratamento as variáveis independentes (Zar, 2009). Antes de avaliar a diferença entre os escores, entre os tratamentos e os tempos, foi desenvolvido um teste de Wilcoxon entre os escores no tempo pré-tratamento a fim de identificar se os diferentes tratamentos partiram do mesmo ponto de partida. As análises estatísticas foram desenvolvidas nos programas R, versão 4.2.2, e Graphpad Prism, versão 9.5.0 (Boston, EUA), sendo considerado um nível de significância de 5% ($p = 0,05$).

3. Resultados

3.1. Cães não atópicos/sem otite

Na avaliação do OTIS3 dos cães não atópicos/sem otite, foi observado igualdade de valores no tempo pré-tratamento, com 2 animais apresentando 1 ponto a mais no grupo AC no tempo pós-tratamento (Tabela 2). Entretanto, ao avaliar os resultados, foi observado que todos os animais, em ambos os tempos e tratamentos, foram classificados como “sem otite” (OTIS3 ≤ 3). O modelo não identificou diferenças significativas em nenhuma das categorias. As análises de Wilcoxon não mostraram diferenças significativas ($p > 0,05$) entre nenhuma das variáveis estudadas no tempo pré-tratamento. Portanto, as variáveis apresentavam classificações semelhantes (ou iguais) entre os 2 tratamentos de estudo (Controle e AC).

| Cães não atópicos/sem otite | | | | | | | | | | | |
|-----------------------------|---------|---------|-----|-------|-----|---------------|-----|----------|-----|-------|-----|
| Cães | Orelhas | Eritema | | Edema | | Úlcera/Erosão | | Exsudato | | Total | |
| | | Pré | Pós | Pré | Pós | Pré | Pós | Pré | Pós | Pré | Pós |
| 1 | OD | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| | OE | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 2 |
| 2 | OD | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 3 |
| | OE | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| 3 | OD | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 3 | 3 |
| | OE | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 3 | 3 |
| 4 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 5 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 6 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 7 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 8 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 9 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 10 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |

Tabela 2 – Resultado das avaliações pré/pós-tratamentos dos cães não atópicos/sem otite utilizando o escore de pontuação OTIS3, que se baseia na pontuação de 0-3 para eritema, edema, erosão/ulceração e exsudato (0-ausente, 1-leve, 2-moderado e 3-intenso). OD (orelha direita); OE (orelha esquerda); Pré (pré-tratamento); Pós (pós-tratamento).

Relacionado a presença de descamação, hipotricose/alopecia e hiperqueratose (0-ausente, 1-leve, 2-moderado e 3-intenso), foi observado reação local em 2 cães durante o período das aplicações (cães 1 e 2). O cão 1 apresentou hipotricose leve na orelha

esquerda no dia 9 (Figura 2A), com repilação completa da região no dia 30 pós-tratamento (21 dias após o término dos tratamentos) (Figura 2B). O cão 2 apresentou descamação intensa na orelha direita (Figura 3A) e descamação leve na orelha esquerda (Figura 3B) no dia 4, retornando ao estado inicial no dia 30 pós-tratamento (21 dias após o término dos tratamentos) (Figura 3C/D).

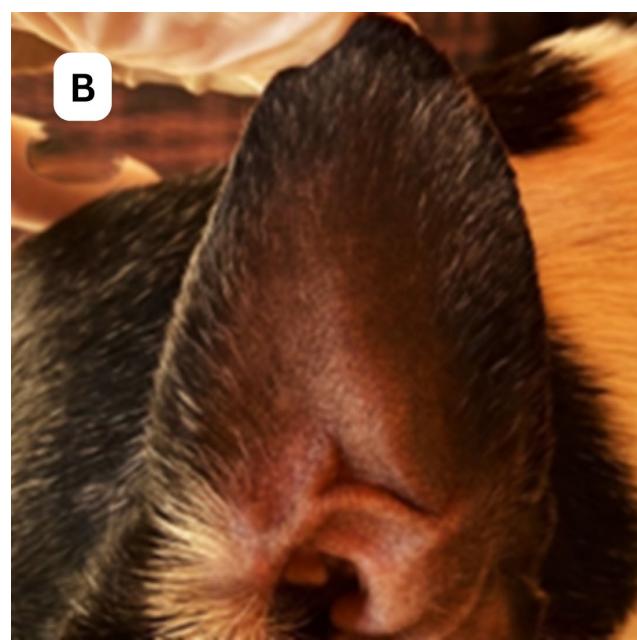


Figura 2 – Registro fotográfico da orelha esquerda do cão 1 que recebeu tratamento com o Controle. A – Orelha esquerda apresentando hipotrofose leve no dia 9. B – Orelha esquerda apresentando repilação completa no dia 30 (21 dias após o término do tratamento).

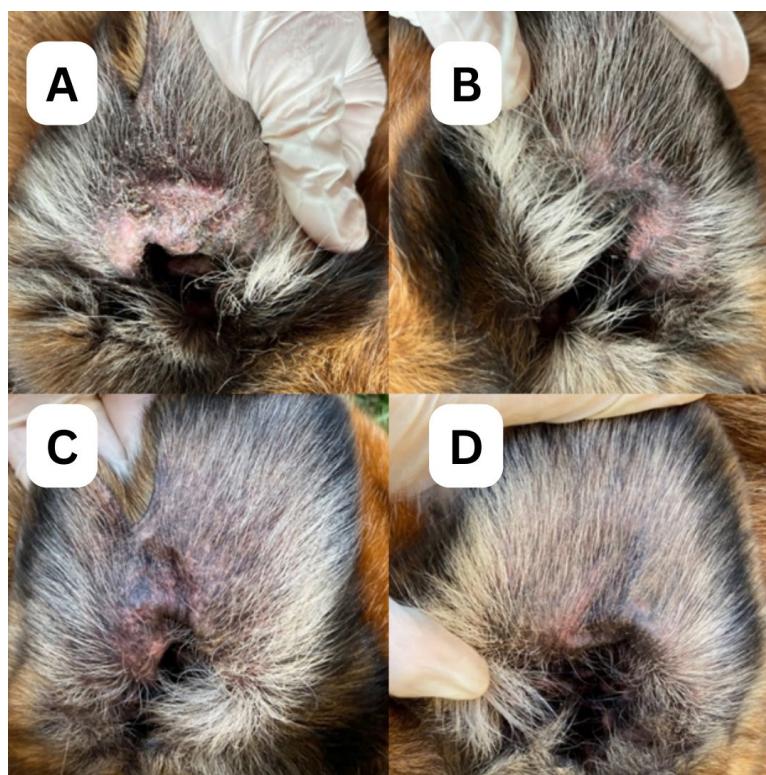


Figura 3 – Registro fotográfico das orelhas do cão 2 que recebeu tratamento com Controle na orelha esquerda e tratamento com AC na orelha direita. A- Orelha direita apresentando descamação intensa no dia 4. B - Orelha esquerda apresentando descamação leve no dia 4. C – Orelha direita e D – Orelha esquerda apresentando o estado inicial no dia 30 (21 dias após o término do tratamento).

Nas avaliações citológicas para bactérias e células inflamatórias, foram observadas ausências de valores tanto no tempo pré como pós-tratamento em ambos os grupos (Tabela 3). Em relação à *Malassezia spp.*, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos fatores avaliados, sendo os resultados pré/pós-tratamento entre os grupos muito semelhantes.

| Cão | Orelha | Cães não atópicos/sem otite | | | | | |
|-----|--------|-----------------------------|-----|-----------------------|-----|------------------------|-----|
| | | Bactérias | | Células Inflamatórias | | <i>Malassezia spp.</i> | |
| | | Pré | Pós | Pré | Pós | Pré | Pós |
| 1 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 2 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 3 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 4 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 5 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 6 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 7 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 8 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 9 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 10 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |

Tabela 3 – Resultado das avaliações pré/pós-tratamentos dos cães não atópicos/sem otite utilizando a pontuação de escore citológico, que se baseia na pontuação de 0-3 para bactérias, *Malassezia spp.* e células inflamatórias. OD (orelha direita); OE (orelha esquerda); Pré (pré-tratamento); pós (pós-tratamento).

Na Tabela 4 e Figura 4 é possível observar o comportamento das 4 variáveis estudadas, segundo tempo e tratamento nos cães não atópicos/sem otite.

| Tempo | Variável | Tratamento | Med | Min | Max | Q1 | Q3 |
|----------------|------------------------|------------|-----|-----|-----|----|------|
| Pré-tratamento | Bactérias | AC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Controle | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Células Inflamatórias | AC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Controle | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Malassezia</i> spp. | AC | 1 | 0 | 2 | 0 | 1,25 |
| | | Controle | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| | Otis3 | AC | 1 | 1 | 3 | 1 | 1,25 |
| | | Controle | 1 | 1 | 3 | 1 | 1,25 |
| Pós-tratamento | Bactérias | AC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Controle | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | Células Inflamatórias | AC | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | | Controle | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | <i>Malassezia</i> spp. | AC | 0 | 0 | 2 | 0 | 1 |
| | | Controle | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | Otis3 | AC | 1 | 1 | 3 | 1 | 2,25 |
| | | Controle | 1 | 1 | 3 | 1 | 2 |

Tabela 4 – Estatísticas descritivas associadas aos resultados de 10 cães não atópicos/sem otite avaliados através dos tratamentos AC (hidrogel+LUP37C11) e Controle (hidrogel puro) em 2 tempos distintos (pré e pós-tratamentos), segundo 4 avaliações distintas (OTIS3, bactérias, células inflamatórias e *Malassezia* spp). Med (mediana); Min (valor mínimo); Max (valor máximo); Q1 (primeiro quartil) e Q3 (terceiro quartil).

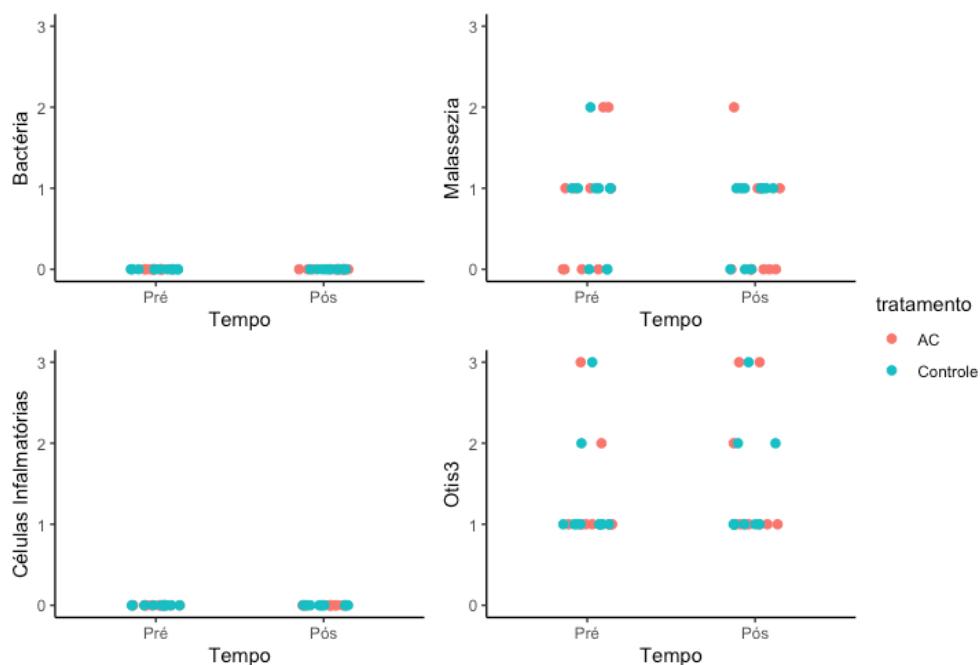


Figura 4 – Dispersão dos dados associados a 10 cães não atópicos/sem otite avaliados através dos tratamentos AC (hidrogel+LUP37C11) e Controle (hidrogel puro), em 2 tempos distintos (pré e pós-tratamentos), segundo 4 avaliações distintas (OTIS3, bactérias, células inflamatórias e *Malassezia* spp) (AC marcado em vermelho, Controle em azul).

Os cães 1 e 3 apresentaram aumento dos níveis da enzima fosfatase alcalina nos exames bioquímicos, mas que voltaram aos valores iniciais no dia 30 pós-tratamento. Os dados dos exames eritrograma, leucograma, contagem de plaquetas e bioquímicos (Alanina Transaminase, Fosfatase Alcalina, Creatinina, Uréia e Glicose) foram empregados para auxiliar no controle de eventuais alterações sistêmicas, e somente 2 cães apresentaram alterações, e em uma única enzima (Fosfatase Alcalina).

3.2. Cães atópicos/com otite

A análise de Wilcoxon não mostrou diferença significativa ($p>0,05$) entre nenhuma das variáveis estudadas no tempo pré-tratamento. Portanto, as variáveis apresentavam classificações semelhantes (ou iguais) entre os 2 tratamentos de estudo (Controle e AC). Na avaliação do OTIS3, foi observado diferença somente associado ao fator “tempo”, isto é, houve mudanças na escala entre o tempo pré-tratamento para o tempo pós-tratamento, com melhora dos resultados pós-tratamento tanto para o grupo AC quanto para o grupo Controle (Figura 5 e Tabela 5). Por outro lado, não houve diferença entre os tratamentos e nem entre a interação dos tratamentos e do tempo. Apesar desta melhora nos escores de OTIS3, e de alguns animais melhorarem seus diagnósticos, as análises de McNemar não mostraram diferenças significativas ($p>0,05$).

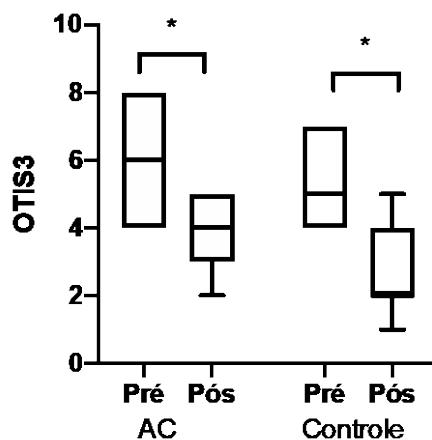


Figura 5 – Box-plot da escala de Otis3 em 7 cães atópicos/com otite, pré e pós-tratamento tratados com AC (hidrogel+LUP37C11) e Controle (hidrogel puro) - asteriscos representam diferenças significativas no teste a posteriori de Sidak ao nível de alfa = 0,05.

| Cães | Orelhas | Eritema | | Edema | | Úlcera/Erosão | | Exsudato | | Total | |
|------|---------|---------|-----|-------|-----|---------------|-----|----------|-----|----------|----------|
| | | Pré | Pós | Pré | Pós | Pré | Pós | Pré | Pós | Pré | Pós |
| 11 | OD | 2 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 5 | 5 |
| | OE | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 4 |
| 12 | OD | 3 | 2 | 2 | 1 | 1 | 1 | 2 | 1 | 8 | 5 |
| | OE | 2 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 2 | 1 | 7 | 3 |
| 13 | OD | 3 | 2 | 3 | 2 | 0 | 0 | 2 | 1 | 8 | 5 |
| | OE | 3 | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 7 | 4 |
| 14 | OD | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 4 | 1 |
| | OE | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 2 | 1 | 4 | 3 |
| 15 | OD | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 5 | 2 |
| | OE | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 | 5 | 2 |
| 16 | OD | 1 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 1 | 6 | 3 |
| | OE | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 2 | 4 | 2 |
| 17 | OD | 1 | 1 | 1 | 0 | 2 | 2 | 2 | 1 | 6 | 4 |
| | OE | 1 | 0 | 1 | 0 | 2 | 1 | 2 | 1 | 6 | 2 |

Tabela 5 – Resultado das avaliações pré/pós-tratamentos dos cães atópicos/com otite utilizando o escore de pontuação OTIS3, que se baseia na pontuação de 0-3 para eritema, edema, erosão/ulceração e exsudato (0-ausente, 1-leve, 2-moderado e 3-intenso). OD (orelha direita); OE (orelha esquerda); Pré (pré-tratamento); pós (pós-tratamento).

A Figura 6 mostra o registro fotográfico do cão 12, que recebeu tratamento com AC na orelha direita e tratamento com Controle na orelha esquerda. O escore de pontuação OTIS3 foi 8 para a orelha direita no pré-tratamento (Tabela 5 e Figura 6A), e pontuação 7 para a orelha esquerda (Tabela 5 e Figura 6B). No pós-tratamento a pontuação foi 5 para a orelha direita (Tabela 5 e Figura 6C), e pontuação 3 para a orelha esquerda (Tabela 5 e Figura 6D).

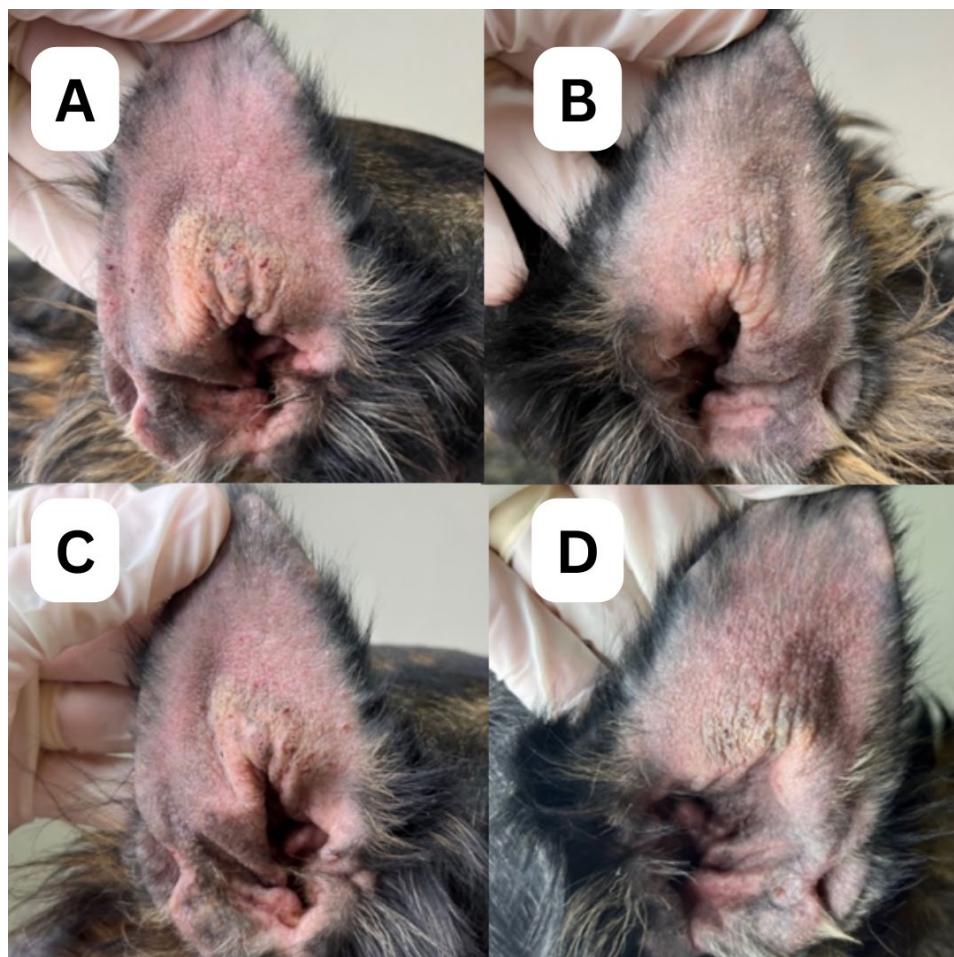


Figura 6 - Registro fotográfico das orelhas do cão 12 que recebeu tratamento com AC na orelha direita e tratamento com Controle na orelha esquerda. Orelha direita (A) escore 8 (OTIS3) apresentando eritema intenso, edema moderado, erosão leve e exsudato ceruminoso leve; e orelha esquerda (B) escore 7 (OTIS3) apresentando eritema moderado, edema moderado, erosão leve e exsudato ceruminoso leve imediatamente antes do início do tratamento no dia 1. Orelha direita (C) escore 5 (OTIS3) apresentando eritema moderado, edema leve, erosão leve e exsudato ceruminoso leve; e orelha esquerda (D) escore 3 (OTIS3) apresentando eritema leve, edema leve e exsudato ceruminoso leve 24 horas após o último tratamento (dia 9).

Na avaliação de bactérias, foi observado diferença somente associado ao fator “tempo”. Entretanto, as análises a posteriori identificaram que somente quando agrupamos os dados de ambos os grupos foi possível observar diferença significativa. Este fato é corroborado pela observação das estatísticas descritivas que se apresentam muito similares entre os tratamentos avaliados (Figura 7 e Tabela 6). Na avaliação de células inflamatórias, não foram observadas diferenças significativas em nenhum fator. Este fato é corroborado pela observação das estatísticas descritivas que se apresentam iguais entre os tratamentos avaliados (Figura 7 e tabela 6). Na avaliação da *Malassezia* spp. foi observado diferença somente associado ao fator “tempo”. Entretanto, as análises a posteriori identificaram que somente quando agrupamos os dados de ambos os grupos foi possível observar diferença significativa. Este fato é corroborado pela observação das estatísticas descritivas que se apresentam muito similares entre os tratamentos avaliados (Figura 7 e tabela 6). Na Tabela 7 e Figura 8 é possível observar o comportamento das 4 variáveis estudadas segundo tempo e tratamento.

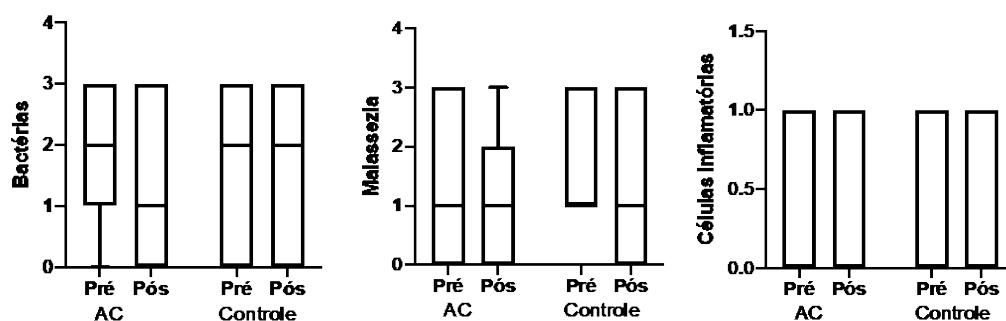


Figura 7 – Box-plot das escalas de bactérias, *Malassezia* spp. e células inflamatórias em 7 cães atópicos/com otite, pré e pós-tratamento com AC (hidrogel+LUP37C11) e Controle (hidrogel puro).

| Cães atópicos/com otite | | | | | | | |
|-------------------------|---------|-----------|-----|-----------------------|-----|------------------------|-----|
| Cães | Orelhas | Bactérias | | Células Inflamatórias | | <i>Malassezia</i> spp. | |
| | | Pré | Pós | Pré | Pós | Pré | Pós |
| 11 | OD | 2 | 2 | 0 | 0 | 3 | 3 |
| | OE | 2 | 1 | 0 | 0 | 3 | 2 |
| 12 | OD | 3 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | OE | 2 | 2 | 1 | 0 | 1 | 1 |
| 13 | OD | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| | OE | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |
| 14 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| | OE | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| 15 | OD | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 |
| | OE | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 1 |
| 16 | OD | 3 | 3 | 1 | 1 | 0 | 0 |
| | OE | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 0 |
| 17 | OD | 3 | 3 | 1 | 1 | 1 | 3 |
| | OE | 3 | 3 | 1 | 1 | 3 | 3 |

Tabela 6 – Resultado das avaliações pré/pós-tratamentos dos cães atópicos/com otite utilizando a pontuação de escore citiológico, que se baseia na pontuação de 0-3 para bactérias, *Malassezia* spp. e células inflamatórias. OD (orelha direita); OE (orelha esquerda); Pré (pré-tratamento); pós (pós-tratamento).

| Tempo | Variável | Tratamento | Med | Min | Max | Q1 | Q3 |
|----------------|------------------------|------------|-----|-----|-----|----|----|
| Pré-tratamento | Bactérias | AC | 2 | 0 | 3 | 1 | 3 |
| | | Controle | 2 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| | Células Inflamatórias | AC | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | | Controle | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | <i>Malassezia</i> | AC | 1 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| | | Controle | 1 | 1 | 3 | 1 | 3 |
| | Otis3 | AC | 6 | 4 | 8 | 4 | 8 |
| | | Controle | 5 | 4 | 7 | 4 | 7 |
| Pós-tratamento | Bactérias | AC | 1 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| | | Controle | 2 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| | Células Inflamatórias | AC | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | | Controle | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |
| | <i>Malassezia</i> spp. | AC | 1 | 0 | 3 | 0 | 2 |
| | | Controle | 1 | 0 | 3 | 0 | 3 |
| | Otis3 | AC | 4 | 2 | 5 | 3 | 5 |
| | | Controle | 2 | 1 | 5 | 2 | 4 |

Tabela 7 – Estatísticas descritivas associadas aos resultados de 7 cães atópicos/com otite avaliados através dos tratamentos AC (hidrogel+LUP37C11) e Controle (hidrogel puro) em 2 tempos distintos (pré e pós-tratamentos), segundo 4 avaliações distintas (OTIS3, bactérias, células inflamatórias e *Malassezia*). Med (mediana); Min (valor mínimo); Max (valor máximo); Q1 (primeiro quartil) e Q3 (terceiro quartil).

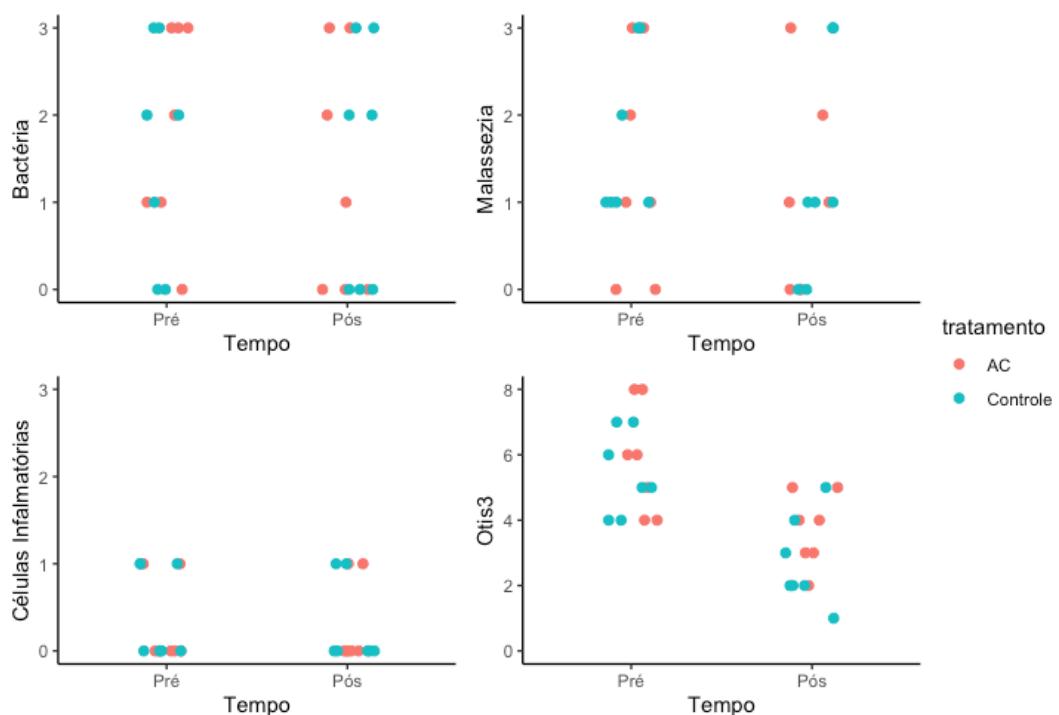


Figura 8 – Dispersão dos dados associados a 7 cães atópicos/com otite avaliados através dos tratamentos AC (hidrogel+LUP37C11) e Controle (hidrogel puro) em 2 tempos distintos (pré e pós-tratamentos), segundo 4 avaliações distintas (OTIS3, bactérias, células inflamatórias e *Malassezia*) (AC marcado em vermelho, Controle em azul).

4. Discussão

O presente estudo utilizou cães como modelo por serem homólogos da DA humana. A DAC surge espontaneamente, em uma espécie que compartilha o mesmo ambiente que os tutores humanos, maximizando o efeito comparativo em relação aos vários modelos experimentais desenvolvidos para avaliar o mecanismo de formação de lesões cutâneas e testar novas intervenções antialérgicas (Olivry, 2012). Também é de conhecimento que a KLK7 humana possui identidade próxima à KLK7 canina (Stenshamn et al., 2006), de forma que o anticorpo anti-KLK7 (LUP37C11) pode também ter aplicação no mercado veterinário. Nesse contexto, a DAC é uma doença cujo estudo pode também ajudar a avançar o conhecimento importante para sua contraparte humana. Laureano (2020) testou a mesma formulação utilizada neste estudo, *in vitro* em modelos de pele e os resultados demonstraram a capacidade de entrega do anticorpo na camada córnea com a capacidade de continuar inibindo a KLK7 pós liberação. Nas análises de citotoxicidade em cultura de células Vero tanto a formulação de hidrogel contendo o anticorpo como a formulação livre do anticorpo mostraram baixa mortalidade celular (Laureano, 2020).

O pavilhão auricular e condutos auditivos são apontados como regiões preferencialmente acometidas na DAC (Hensel et al., 2015; Favrot et al., 2020), constituindo a causa primária de otite externa em cães (Santoro et al., 2015). Sempre que possível, o tratamento de primeira escolha é realizado via tópico (Nuttall, 2016). Até o presente momento, não é de conhecimento dos autores a existência de formulações contendo imunobiológicos para tratamento tópico da otite externa canina. Um ponto extremamente favorável na utilização de imunobiológicos como princípio ativo, é que o complexo antígeno-anticorpo é decomposto através das vias normais de catabolismo de proteínas e eliminado do organismo sem causar prejuízos (Murphy et al., 2017). As alterações epidérmicas relacionadas à filagrina, metabolismo lipídico, alterações genéticas e imunológicas ligadas às KLKs, convergem para a relevância da via percutânea na exposição ao alérgeno. Nesse contexto, vários autores admitem a importância das alterações da barreira cutânea na DA humana e canina, fornecendo incentivo para continuar investigando a relação da barreira e a fisiopatologia da doença (Marsella et al., 2011; Tintle et al., 2011; Santoro & Rodrigues Hoffmann, 2016; Chermprapai et al., 2018).

A importância dos corneodesmossomos e a coesividade dos corneócitos para a resistência mecânica da camada córnea da pele e para o processo de descamação nas doenças relacionadas à pele tem sido estudada desde o final da década de 1980. Mais de três décadas se passaram e ainda não é possível determinar se a disfunção na barreira cutânea é um fator primário ou secundário na DA e na DAC (Holleran et al., 2006; McLean, 2016; Olivry et al., 2022). Combarros et al. (2021), levantaram a hipótese de que as anormalidades da camada córnea da pele em cães podem ser defeitos primários, pois, foram encontrados em pele não lesionada sem quaisquer sinais histológicos de inflamação. Tanto em cães como em humanos, o prurido é uma característica consistente da dermatite atópica que tende a piorar quando infecções secundárias se desenvolvem (Olivry, 2012; Gedon & Mueller, 2018; Marsella & de Benedetto, 2017). Os dados do exame citológico foram empregados para confirmar a presença ou não de infecções secundárias e para a comparação pré e pós-tratamentos. Nas avaliações citológicas dos cães não atópicos/sem otite foram observados ausência de valores para bactérias e células inflamatórias. Em relação a *Malassezia spp.*, a quantidade encontrada não é considerada infecção em cães sem nenhum sinal clínico ou lesão relacionado à otite (Angus, 2004; Rigaut, 2011; Budach & Mueller, 2012; Hensel et al., 2015). Desta forma, não foram observadas diferenças significativas ($p>0,05$) em nenhum dos fatores avaliados, sendo os resultados pré/pós-tratamentos entre os grupos muito semelhantes.

O Índice de Pontuação de Orite Externa 3 (OTIS3) (Nuttal & Bensignor, 2014) foi utilizado como critério padrão neste estudo para distinguir orelhas sem otite, de orelhas com otite nos cães incluídos e para o acompanhamento das alterações causadas pelos tratamentos nos grupos testados. O OTIS3 mostrou ser uma boa ferramenta de escore para distinguir orelhas com e sem otite e avaliar a melhora clínica da otite externa (região poro acústico e pavilhão auricular). Apesar do OTIS3 não ter sido validado, vem sendo aplicado nos estudos da atualidade para a quantificação das alterações observadas nos condutos auditivos, visando principalmente a comparação de protocolos terapêuticos (King et al., 2018; Seppänen et al., 2019; Léonard et al., 2021). As análises realizadas não mostraram diferenças significativas ($p>0,05$) entre nenhuma das variáveis (OTIS3, bactérias, células inflamatórias e *Malassezia spp.*) estudadas no tempo pré-tratamento. Isso demonstra que as orelhas que receberam os tratamentos (AC e Controle), apresentavam classificações iniciais semelhantes, ou seja, os diferentes tratamentos usados partiram do mesmo ponto. Dessa forma, é possível inferir que as orelhas que receberam o tratamento Controle não estavam menos alteradas que as que receberam o tratamento com AC. Isso indica que os tratamentos foram realizados em grupos homogêneos.

A formulação do hidrogel foi considerada satisfatória para a administração nas regiões aplicadas, se mostrando promissora inclusive para aplicação em outras regiões, visto que na DAC, as regiões das axilas, patas, flexura anticubital, área inguinal e abdome também são frequentemente acometidas (Hensel et al., 2015; Favrot et al., 2020). Os cães não atópicos/sem otite não mostraram alteração de seus parâmetros com a aplicação dos tratamentos, ou seja, ambas as formulações (com e sem o AC) não causaram prejuízo. Na DAC, as mutações no gene da filagrina estão associadas, entre outras coisas, à formação de uma camada córnea desorganizada e perda transepitelial de água (Irvine et al., 2011). Portanto, uma possível justificativa para a melhora nos escores do OTIS3 nos cães atópicos/com otite (grupos Controle e AC), e de alguns desses cães terem apresentado melhora em seus diagnósticos, seria devido as propriedades intrínsecas dos hidrogéis. Segundo Ahmed (2015), os hidrogéis constituem um grupo de materiais poliméricos cuja estrutura torna-os capazes de reter grandes quantidades de água, atuando como umectante e melhorando a hidratação da pele no local das aplicações dos tratamentos.

Não foi possível determinar o que levou a uma diminuição da quantidade de bactérias e *Malassezia spp.* nos grupos Controle e AC dos cães atópicos/com otite. Uma possível explicação seria que a redução nos escores do OTIS3 se relacionando com a

diminuição da inflamação, corroboraria com os estudos de Nuttall (2016) e Léonard et. al. (2021), que relacionam a terapia anti-inflamatória ativa e proativa com a remissão e prevenção de recidivas dos processos infecciosos. A estrutura do anticorpo LUP37C11, tempo de tratamento empregado e a concentração do anticorpo em sua formulação, pode ter influenciado na ausência de diferenças significativas entre os 2 tratamentos (Controle e AC). Nesse contexto, é possível que o tempo de tratamento e a concentração atual do anticorpo não foram suficientes para a observação de melhora clínica dos animais, uma vez que o fator concentração do princípio ativo pode ter influência na resposta em diferentes animais (Rose & Golan, 2015). A permeação do anticorpo e a interação antígeno/anticorpo poderia ser demonstrada através de imuno-histoquímica, analisando por exemplo, amostras de biópsias da pele tratada (Ehrenfeld et al., 2023).

O tratamento da DAC continua sendo um desafio devido à resposta limitada e individualizada às terapias disponíveis. Avanços recentes na compreensão dos mecanismos da doença levaram à descoberta de novos alvos terapêuticos (Bieber, 2022). O reparo da barreira cutânea é uma abordagem promissora, mas ainda pouco explorada na DA canina. Assim como na DA humana, essa abordagem pode ser muito benéfica quando iniciada precocemente, e pode minimizar o desenvolvimento da sensibilização alérgica (Marsella, 2013).

5. Conclusão

O presente estudo mostrou que os cães não atópicos/sem otite não tiveram alteração nos parâmetros avaliados com os tratamentos. Os cães com Otite Alérgica se mostraram sensíveis aos tratamentos através da redução do OTIS3. Entretanto, não foi possível observar diferenças entre os tratamentos empregados, indicando que o Hidrogel Polimérico sozinho, apresenta os mesmos resultados que o Hidrogel Polimérico em associação ao anticorpo LUP37C11. Este é o primeiro estudo *in vivo* que avaliou o uso do anticorpo anti-KLK7 na terapêutica da otite em cães com DAC, gerando expectativa futura para aplicação em outras regiões afetadas pela DAC.

6. Referências

- Ahmed EM. Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. In *Journal of Advanced Research*, Vol. 6, Issue 2, pp. 105–121, 2015. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2013.07.006>
- Angus JC. Otic cytology in health and disease. In *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, Vol. 34, Issue 2, pp. 411–424, 2004. W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2003.10.005>
- Antunes AA, Solé D, Carvalho VO, Bau AEK., Kuschnir, FC, Mallozi MC, Markus JR, Silva MGNE, Pires MC, Mello MEEA, Rosário Filho NA, Sarinho ESC, Chong-Neto HJ, Rubini NPM, & Silva LR. Guia prático de atualização em dermatite atópica - Parte I: etiopatogenia, clínica e diagnóstico. Posicionamento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. Arquivos de Asma, Alergia e Imunologia, 1(2), 2017. <https://doi.org/10.5935/2526-5393.20170019>
- Bäckman ANA, Edlund M, Ekholm E, Hammarström B, Törnell J, Wallbrandt P, Egelrud T, Hansson L, & Wennbo H. Epidermal Overexpression of Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme in Mice: A Model for Chronic Itchy Dermatitis. *Journal of Investigative Dermatology*, 118(3), 444–449, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01684.x>
- Bernard D, Minondo AM, Camus C, Fiat F, Corcuff P, Schmidt R, Simon M, & Serre G. Persistence of Both Peripheral and Non-Peripheral Corneodesmosomes in the Upper Stratum Corneum of Winter Xerosis Skin Versus only Peripheral in Normal Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 116(1), 23–30, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.00208.x>
- Bieber T. Atopic dermatitis: an expanding therapeutic pipeline for a complex disease. In *Nature Reviews Drug Discovery*, Vol. 21, Issue 1, pp. 21–40, 2022. Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41573-021-00266-6>
- Bouwstra JA, & Ponec M. The skin barrier in healthy and diseased state. In *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*, Vol. 1758, Issue 12, pp. 2080–2095, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.06.021>
- Budach SC, & Mueller RS. Reproducibility of a semiquantitative method to assess cutaneous cytology. *Veterinary Dermatology*, 23(5), 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01075.x>
- Calessa, J. R., Marques V. S., Bicalho, A. P. C. (2021). Profile of the canine population with atopic dermatitis at the dermatology service of the Veterinary Hospital from Federal University of Minas Gerais. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 11. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i11.19645>
- Chermprapai S, Broere F, Gooris G, Schlotter YM, Rutten VPMG, & Bouwstra JA. Altered lipid properties of the stratum corneum in Canine Atopic Dermatitis. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1860(2), 526–533, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.11.013>
- Choi WJ, Konkit M, Kim Y, Kim MK, & Kim W. Oral administration of *Lactococcus chungangensis* inhibits 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic-like dermatitis in NC/Nga mice. *Journal of Dairy Science*, 99(9), 6889–6901, 2016. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11301>
- Combarros D, Goudounèche D, Cadiergues MC, & Simon M. The upper epidermis of atopic dogs is altered at the functional and structural levels. *Veterinary Dermatology*, 32(6), 2021. <https://doi.org/10.1111/vde.13024>
- Deraison C, Bonnart C, Lopez F, Besson C, Robinson R, Jayakumar A, Wagberg F, Brattsand M, Hachem JP, Leonardsson G, & Hovnanian A. LEKTI Fragments Specifically Inhibit KLK5, KLK7, and KLK14 and Control Desquamation through a pH-dependent Interaction. *Molecular Biology of the Cell*, 18(9), 3607–3619, 2007. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-02-0124>

- Ehrenfeld P, Figueroa CD, Molina L, Koning T, Velasco M, Bustamente-Barrientos FA, Ortloff A. Expression and Distribution of Kallikrein - related Peptidases 5, 7, 8 and 10 in normal Apocrine Gland of Canine Skin. *Int. J. Morphol.*, 40(1):210-215, 2023. http://www.intjmorphol.com/wp-content/uploads/2023/02/Art_29_411_2023.pdf
- Ekholm E, & Egelrud T. Stratum corneum chymotryptic enzyme in psoriasis. *Archives of Dermatological Research*, 291(4), 195–200, 1999. <https://doi.org/10.1007/s004030050393>
- Ekholm EI, Brattsand M, & Egelrud T. Stratum Corneum Tryptic Enzyme in Normal Epidermis: a Missing Link in the Desquamation Process? *Journal of investigative dermatology*, v. 114, n. 1, p. 56-63, 2000. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00820.x>
- Fanton N, Santoro D, Cornegliani L, & Marsella R. Increased filaggrin-metabolizing enzyme activity in atopic skin: a pilot study using a canine model of atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 28(5), 479-e111, 2017. <https://doi.org/10.1111/vde.12443>
- Favrot C, Fischer N, Olivry T, Zwickl L, Audergon S, & Rostaher A. Atopic dermatitis in West Highland white terriers – part I: natural history of atopic dermatitis in the first three years of life. *Veterinary Dermatology*, 31(2), 106–110, 2020. <https://doi.org/10.1111/vde.12801>
- Favrot C, Steffan J, Seewald W, & Picco F. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*, 21(1), 23–31, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2009.00758.x>
- Fischer J, & Meyer-Hoffert U. Regulation of kallikrein-related peptidases in the skin - From physiology to diseases to therapeutic options. *Thrombosis and Haemostasis*, 110(3), 442–449, 2013. <https://doi.org/10.1160/TH12-11-0836>
- Gedon NKY, & Mueller RS. (2018). Atopic dermatitis in cats and dogs: A difficult disease for animals and owners. In Clinical and Translational Allergy. BioMed Central Ltd, Vol. 8, Issue 1, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13601-018-0228-5>
- Ghadially R, Williams ML, Hou SYE, & Elias PM. Membrane Structural Abnormalities in the Stratum Corneum of the Autosomal Recessive Ichthyoses. *Journal of Investigative Dermatology*, 99(6), 755–763, 1992. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12614489>
- Hensel P, Santoro D, Favrot C, Hill P, & Griffin C. Canine atopic dermatitis: Detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Veterinary Research*, 11(1), 2015. <https://doi.org/10.1186/s12917-015-0515-5>
- Holleran WM, Takagi Y, & Uchida Y. Epidermal sphingolipids: Metabolism, function, and roles in skin disorders. In *FEBS Letters*, Vol. 580, Issue 23, pp. 5456–5466, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.039>
- Irvine AD, Mclean WHI, & Leung DYM. (2011). Mechanisms of Disease Filaggrin Mutations Associated with Skin and Allergic Diseases. In *n engl j med*, Vol. 364, Issue 6, 2011. <https://doi.org/10.1056/nejmra1011040>
- <http://dx.doi.org/10.5380/avs.v29i2.94493>
- Ishida-Yamamoto A, Deraison C, Bonnart C, Bitoun E, Robinson R, O'Brien TJ, Wakamatsu K, Ohtsubo S, Takahashi H, Hashimoto Y, Dopping-Hepenstal PJC, McGrath JA, Iizuka H, Richard G, & Hovnanian A. LEKTI is localized in lamellar granules, separated from KLK5 and KLK7, and is secreted in the extracellular spaces of the superficial stratum granulosum. *Journal of Investigative Dermatology*, 124(2), 360–366, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.23583.x>
- Ishida-Yamamoto A, Simon M, Kishibe M, Miyauchi Y, Takahashi H, Yoshida S, O'brien TJ, Serre G, & Iizuka H. Epidermal Lamellar Granules Transport Different Cargoes as Distinct Aggregates. *Journal of investigative dermatology*, v. 122, n. 5, p. 1137-1144, 2004. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2004.22515.x>
- Johnson B, Horn T, Sander C, Kohler S, Smoller BR, & Smoller B. Expression of stratum corneum chymotryptic enzyme in ichthyoses and squamoproliferative processes. *Journal of cutaneous pathology*, v. 30, n. 6, p. 358-362, 2003. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0560.2003.00070.x>
- King SB, Doucette KP, Seewald W, & Forster SL. A randomized, controlled, single-blinded, multicenter evaluation of the efficacy and safety of a once weekly two dose otic gel containing flufenicol, terbinafine and betamethasone administered for the treatment of canine otitis externa. *BMC Veterinary Research*, 14(1), 2018. <https://doi.org/10.1186/s12917-018-1627-5>
- Kobayashi T, & Imanishi I. Epithelial–immune crosstalk with the skin microbiota in homeostasis and atopic dermatitis – a mini review. In *Veterinary Dermatology*, Vol. 32, Issue 6, pp. 533-e147, 2021. <https://doi.org/10.1111/vde.13007>
- Komatsu N, Saijoh K, Kuk C, Liu AC, Khan S, Shirasaki F, Takehara K, & Diamandis EP. Human tissue kallikrein expression in the stratum corneum and serum of atopic dermatitis patients. *Experimental Dermatology*, 16(6), 513–519, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2007.00562.x>
- Langan SM, Irvine AD, & Weidinger S. Atopic dermatitis. *The Lancet*, 396(10247), 345–360, 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31286-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31286-1)
- Laureano AFS, Zani MB, Sant'Ana AM, Tognato RC, Lombello CB, do Nascimento MHM, Helmsing S, Fühner V, Hust M, Puzer L. Generation of recombinant antibodies against human tissue Kallikrein 7 to treat skin diseases. *Bioorganic Med Chem Lett*, 30 (23):127626, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2020.127626>
- Laureano AFS. (2020). Seleção de anticorpos recombinantes (scFv-Fc) anti-KLK7 humana e caracterização de um sistema de hidrogel polimérico para drug delivery na pele. Tese doutorado em biotecnociência. Universidade Federal do ABC, São Bernardo do Campo, 2020. http://biblioteca.ufabc.edu.br/index.php?codigo_sophia=122080
- Lee, T, Nair P, & Corrigan CJ. Review of monoclonal antibody therapies in asthma and allergic diseases-a new paradigm for precision medicine. In *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*, Vol. 38, Issue 2, pp. 78–90, 2020.

2020. Allergy and Immunology Society of Thailand. <https://doi.org/10.12932/ap-020220-0752>
- Léonard C, Taminiau B, Ngo J, Fantini O, Daube G, & Fontaine J. Preventive use of a topical anti-inflammatory glucocorticoid in atopic dogs without clinical sign of otitis does not affect ear canal microbiota and mycobiota. *Veterinary Dermatology*, 32(4), 355-e98, 2021. <https://doi.org/10.1111/vde.12977>
- Lundwall Å, & Brattsand M. 2008. Kallikrein-related peptidases. In *Cellular and Molecular Life Sciences*, Vol. 65, Issue 13, pp. 2019–2038, 2008. <https://doi.org/10.1007/s0018-008-8024-3>
- Marsella R, & de Benedetto A. Atopic dermatitis in animals and people: An update and comparative review. In *Veterinary Sciences*, Vol. 4, Issue 3, 2017. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute. <https://doi.org/10.3390/vetsci4030037>
- Marsella R, Olivry T, Carlotti DN. Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 22(3), 239–248, 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2011.00967.x>
- Marsella R. Fixing the skin barrier: Past, present and future - man and dog compared. *Veterinary Dermatology*, 24(1), 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01073.x>
- Matsui T, & Amagai M. Dissecting the formation, structure and barrier function of the stratum corneum. *International Immunology*, 27(6), 269–280, 2015. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxv013>
- McLean WHI. Filaggrin failure – from ichthyosis vulgaris to atopic eczema and beyond. In *British Journal of Dermatology*, Vol. 175, pp. 4–7, 2016. <https://doi.org/10.1111/bjd.14997>
- Michels GM, Ramsey DS, Walsh KF, Martinon OM, Mahabir SP, Hoevers JD, Walters RR, & Dunham SA. A blinded, randomized, placebo-controlled, dose determination trial of lokivetmab (ZTS-00103289), a caninized, anti-canine IL-31 monoclonal antibody in client owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 27(6), 478-e129, 2016. <https://doi.org/10.1111/vde.12376>
- Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. *Small Animal Dermatology*, 7th Edition, 2012.
- Moreau ME, Garbacki N, Molinaro G, Brown NJ, Marceau F, Adam A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. *J. Pharmacol. Sci.* 99, 6–38, 2005. <https://doi.org/10.1254/jphs.SRJ05001X>
- Moyaert, H., van Brussel, L., Borowski, S., Escalada, M., Mahabir, S. P., Walters, R. R., & Stegemann, M. R. (2017). A blinded, randomized clinical trial evaluating the efficacy and safety of lokivetmab compared to ciclosporin in client-owned dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 28(6), 593-e145. <https://doi.org/10.1111/vde.12478>
- Murphy, K. (Kenneth M.), Weaver, C., & Janeway, C. (2017). Janeway's immunobiology.
- Nauroy P, & Nyström A. Kallikreins: Essential epidermal messengers for regulation of the skin microenvironment during homeostasis, repair and disease. *Matrix Biology*
- Plus, 6–7, 100019, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mgbplus.2019.100019>
- Nishifumi K, & Yoon JS. The stratum corneum: The rampart of the mammalian body. *Veterinary Dermatology*, 24(1), 2013. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3164.2012.01090.x>
- Nishifumi K. Skin barrier and its role in the pathophysiology of atopic dermatitis. *Veterinary allergy*, p. 42-50, 2013. <https://doi.org/10.1002/9781118738818.ch6>
- Nuttall T, & Bensignor E. A pilot study to develop an objective clinical score for canine otitis externa. *Veterinary Dermatology*, 25(6), 530-e92, 2014. <https://doi.org/10.1111/vde.12163>
- Nuttall T. Successful management of otitis externa. In *Practice*, v. 38, p. 17-21, 2016. <https://doi.org/10.1136/inp.i1951>
- Olivry T, Paps JS, & Amalric N. Transient and reversible reduction of stratum corneum filaggrin degradation products after allergen challenge in experimentally mite-sensitised atopic dogs. *Veterinary Dermatology*, 33(1), 62-e20, 2022. <https://doi.org/10.1111/vde.13026>
- Olivry T. What can dogs bring to atopic dermatitis research? *New Trends in Allergy and Atopic Eczema*, Vol 96, p. 61-72, 2012. <https://doi.org/10.1159/000331884>
- Ovaere P, Lippens S, Vandenabeele P, & Declercq W. The emerging roles of serine protease cascades in the epidermis. In *Trends in Biochemical Sciences*, Vol. 34, Issue 9, pp. 453–463, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.08.001>
- Pierezan F, Olivry T, Paps JS, Lawhon SD, Wu J, Steiner JM, Suchodolski JS, & Hoffmann AR. The skin microbiome in allergen-induced canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 27(5), 2016. <https://doi.org/10.1111/vde.12366>
- Proksch, E. pH in nature, humans and skin. *The Journal of Dermatology*, 45(9), 1044–1052, 2018. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.14489>
- Rigaut, D, Sanquer A, Maynard L, Rème, CA. Efficacy of a Topical Ear Formulation with a Pump Delivery System for the Treatment of Infectious Otitis Externa in Dogs: A Randomized Controlled Trial. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, v. 9, n. 1, 2011. https://www.semanticscholar.org/paper/Efficacy-of-a-Topical-Ear-Formulation-with-a-Pump-a-Rigaut-Maynard/a54868bccca93aed4f29ba9dbe5999cd6f6c8a3#citing-papers?utm_source=direct_link
- Rose H, Golan E. Farmacodinâmica. 2:18-27, 2015. <https://anestesiologia.pginas.ufsc.br/2015/02/Farmacodinamica-texto.pdf>
- Santoro D, & Rodrigues Hoffmann A. Canine and Human Atopic Dermatitis: Two Faces of the Same Host-Microbe Interaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(6), 1087–1089, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.03.015>
- Santoro D, Hoffmann, AR. Canine and Human Atopic Dermatitis: Two Faces of the Same Host-Microbe Interaction. *Journal of Investigative Dermatology*, 136(6), 1087–1089, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.03.015>

Santoro D, Marsella R, Pucheu-Haston CM, Eisenschenk MNC, Nuttall T, & Bizikova P. Review: Pathogenesis of canine atopic dermatitis: Skin barrier and host-microorganism interaction. In *Veterinary Dermatology*, Vol. 26, Issue 2, pp. 84-e25, 2015. <https://doi.org/10.1111/vde.12197>

Seppänen RTK, Kaimio M, Schildt KJM, Lilja-Maula L, Hyytiäinen HK, Mölsä S, Morelius M, Rajamäki MM, Lappalainen AK, & Rantala M. (2019). Skin and ear health in a group of English bulldogs in Finland – a descriptive study with special reference to owner perceptions. *Veterinary Dermatology*, 30(4), 307-e85, 2019. <https://doi.org/10.1111/vde.12752>

Sondell B, Thornell LE, Egelrud T. Evidence That Stratum Corneum Chymotryptic Enzyme Is Transported to the Stratum Corneum Extracellular Space Via Lamellar Bodies. *Journal of Investigative Dermatology*, 104(5), 819–823, 1995. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12607007>

Souza RF. O que é um estudo clínico randomizado?. *Medicina (Ribeirão Preto)*, v. 42, n. 1, p. 3-8, 2009. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v42i1p3-8>

Stenshamn K. Evaluation of kallikrein 7 (KLK7) and serine protease inhibitor kazal-type 5 precursor (SPINK5) as candidate genes in canine atopic dermatitis in boxer and west highland white terrier, Vol 277, 2006. <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:slu:epsilon-s-7291>

Szajewska H, Nowak-Wegrzyn A. (2017). Allergic and Immunologic Disorders. In *The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology*, pp. 285–298, 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804024-9.00032-X>

Tintle S, Shemer A, Suárez-Fariñas M, Fujita H, Gilleaudeau P, Sullivan-Whalen M, Johnson-Huang L, Chiricozzi A, Cardinale I, Duan S, Bowcock A, Krueger JG, Guttman-Yassky E. Reversal of atopic dermatitis with narrow-band UVB phototherapy and biomarkers for therapeutic response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(3), 2011. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.05.042>

Voegeli R, Rawlings AV, Breternitz M, Doppler S, Schreier T, Fluhr JW. Increased stratum corneum serine protease activity in acute eczematous atopic skin. *British Journal of Dermatology*, 161(1), 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09142.x>

Zar, J. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, 5ed., 2009. ISBN 01310084639780131008465