

JÚLIA SÓ SEVERO

“Avaliação da Proteína C Reativa como marcador inflamatório e de seu potencial para monitoração terapêutica em casos de pênfigo foliáceo e de piodermite superficial na espécie canina”



São Paulo
2015

JÚLIA SÓ SEVERO

Avaliação da Proteína C Reativa como marcador inflamatório e de seu potencial para monitoração terapêutica em casos de pênfigo foliáceo e de piodermite superficial na espécie canina

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:
Clínica Médica

Área de Concentração:
Clínica Veterinária

Orientador:
Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson

São Paulo
2015

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3185
FMVZ

Severo, Júlia Só

Avaliação da Proteína C Reativa como marcador inflamatório e de seu potencial para monitoração terapêutica em casos de pênfigo foliáceo e de piodermite superficial na espécie canina / Júlia Só Severo. -- 2015.

100 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento Clínica Médica, São Paulo, 2015.

Programa de Pós-Graduação: Clínica Veterinária.

Área de concentração: Clínica Veterinária.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson.

1 Pênfigo foliáceo. 2. Piodermite superficial. 3. Imunofluorescência. 4. Proteína C Reativa. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da Proteína C Reativa como marcador inflamatório e de seu potencial para monitoração terapêutica em casos de pênfigo foliáceo e de piodermite superficial na espécie canina", protocolado sob o nº 2930/2013, utilizando 30 (trinta) cães, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 15/5/2013.

We certify that the Research "Evaluation of C-Reactive Protein as inflammatory marker and its potential for therapeutic monitoring in cases of pemphigus foliaceus and superficial pyoderma in dogs", protocol number 2930/2013, utilizing 30 (thirty) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Carlos Eduardo Larsson, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 5/15/2013.

São Paulo, 6 de julho de 2015.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SEVERO, Júlia Só

Título: “ Avaliação da Proteína C Reativa como marcador inflamatório e de seu potencial para monitoração terapêutica em casos de pênfigo foliáceo e de piodermite superficial na espécie canina”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À minha mãe Jacqueline, ao meu pai Joel e as
minhas irmãs Juliana e Renata por estarem
sempre ao meu lado, pela amizade, exemplos de
caráter e honestidade. Obrigada por todo apoio e
incentivo. Eu os amo profundamente.

Ao meu marido Pedro Henrique, meu
companheiro e amor da minha vida. Muito
obrigada pela paciência e incentivo que sempre
teve comigo. Te amo muito.

Ao Prof. Carlos Eduardo Larsson pela confiança e exemplo de profissional capaz de me orientar e direcionar profissionalmente. Muito obrigada pela amizade e oportunidade de acompanhá-lo e aprender muito com o senhor.

À Profa. Valéria Aoki pela calma e tranquilidade de sempre em poder me ensinar e, também, iniciar-me na imunopatologia. Agradeço por me aceitar em seu laboratório e por todos os ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

As minhas avós Eluza e Neusa, todas as minhas tias, tios e primos, Dulcinéa, Orlando, Christina, Mário, Pammela e Lucas por fazerem parte da minha vida e me darem todo suporte necessário ao longo desses anos.

Aos meus amigos e companheiros de pós-graduação Aline, Juliana e Cláudio pela amizade e auxílio no atendimento dermatológico. A convivência com vocês foi maravilhosa.

As médicas veterinárias Raquel, Mariana e Cristina pela ajuda no desenvolvimento desse projeto e pela amizade adquirida.

Ao veterinário Carlos pela amizade, ensinamentos e pelo incentivo no ingresso do mundo dermatológico e posteriormente acadêmico.

Ao patologista Nílceo Michalany pelo suporte e ajuda na realização dos exames histopatológicos no Laboratório Paulista de Dermatopatologia.

À equipe do Laboratório de Imunopatologia, Lígia, Alexandre e Eliete pelo convívio e sem dúvida nenhuma pela paciência em me ensinar tudo. Grande parte deste trabalho é fruto da dedicação e ajuda fundamental de vocês. Lígia o meu agradecimento especial pela sua capacidade de ensinar e seu bom humor sempre presentes, você foi essencial para a confecção deste trabalho.

À Médica Veterinária Samantha pelo auxílio e paciência para me ensinar a técnica de ELISA, fundamental para a execução do projeto.

Aos meus outros amigos de pós-graduação, Jacqueline, André, Matheus, Caio, Paula, Mariana e Sylvia pelo apoio e auxílio na confecção desta dissertação. Matheus muito obrigada pela grande ajuda estatística.

As veterinárias contratadas (Khadine, Denise, Andrea, Bruna e Vera), os residentes, os estagiários e os enfermeiros (Antônio, Carlito, Gilberto e Milton) pela contribuição e convivência ao longo desses anos de pós-graduação.

As Professoras Denise Schwartz, Maria Helena Larsson, Márcia M. Kogika Mitika Hagiwara e Silvia Ricci pela ajuda na confecção e desenvolvimento desse projeto.

A todos os funcionários do VCM e HOVET-FMVZ-USP pela ajuda.

A todos os cães que participaram deste estudo pela grande colaboração para a pesquisa.

RESUMO

SEVERO, J. S. **Avaliação da Proteína C Reativa como marcador inflamatório e de seu potencial para monitoração terapêutica em casos de pênfigo foliáceo e de piodermite superficial na espécie canina.** [Evaluation of C- Reactive Protein as an inflammatory marker and its potential for therapeutic monitoring in cases of canine pemphigus foliaceus and superficial pyoderma in dogs]. 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O pênfigo foliáceo inclui-se em um grupo de dermatoses autoimunes vesículo-bolhosas da pele e mucosas reconhecido em alguns mamíferos, incluindo os cães. Muitos autores acreditam que o pênfigo foliáceo (PF) é a dermatopatia autoimune mais frequentemente observada em caninos. Muitas podem ser as enfermidades caninas que devem ser incluídas no diagnóstico diferencial do pênfigo foliáceo, principalmente, a piodermite superficial (PS). A Proteína C Reativa (PCr) é conhecida como a principal proteína de fase aguda em cães. Nesses espécimes, a elevação da PCr tem sido observada em ampla variedade de condições mórbidas. A determinação da PCr tem sido proposta como um marcador inflamatório de algumas doenças autoimunes. O objetivo deste estudo foi determinar se a Proteína C Reativa pode ser utilizada como um marcador biológico precoce para diferenciar o pênfigo foliáceo da piodermite superficial em cães. Esta pesquisa constituiu um estudo clínico observacional prospectivo longitudinal, realizada em cães acometidos pelo PF ou PS. Foram incluídos 59 cães divididos em três Grupos I (Controle) com 31 animais, II (PF) e III (PS), cada um constituído por 14 cães. Submeteram-se, respectivamente, fragmentos cutâneos e soros de caninos, acometidos por PF ou PS, a exames histopatológicos e imunofluorescência direta (IFD) e à determinação de PCr e, também, a imunofluorescência indireta (IFI), utilizando-se para essa última coxins palmo-plantares a título de substrato. O grau de acometimento dos pacientes penfigosos (Grupo II) foi avaliado pelo PEFESI, durante período de até 90 dias, em diferentes momentos em que se realizou a IFI e a avaliação da PCr. Comparando-se os valores de IFD com aqueles da histopatologia obtiveram-se valores geral de concordância de 75% (9/12) e Índice Kappa de 0,77 ($p < 0,001$) e, também, concordância dita substancial entre os dois métodos. Já, na IFI o valor de

concordância foi de 100% (14/14), o de Kappa de 1,0 ($p < 0,001$), com concordância considerada perfeita entre a IFI e a histopatologia. O Grupo II apresentou maior valor de mediana de PCr (37,4 $\mu\text{g/mL}$) quando comparado aos Grupos I, com 2,9 $\mu\text{g/mL}$ ($p < 0,0001$) e III, com 3,8 $\mu\text{g/mL}$ ($p = 0,008$). Não houve diferença entre os Grupos I e III ($p = 0,178$). Considerando-se como ponto de corte um valor de PCr $> 10,6 \mu\text{g/mL}$, a chance de um animal estar acometido pelo PF é 5,5 vezes maior àquela de um cão não afetado, o que equivale a uma probabilidade pós-teste de 84,6%, conferindo um acréscimo de 34,6% na capacidade de diagnóstico do PF. Conclui-se que determinação de PCr é de inequívoca valia para o estabelecimento de diferenciação diagnóstica entre a casuística da contumaz piodermite superficial com quadros do pênfigo foliáceo canino.

Palavras-chave: Pênfigo foliáceo. Piodermite superficial. Imunofluorescência.
Proteína C Reativa.

ABSTRACT

SEVERO, J. S. **Evaluation of C- Reactive Protein as an inflammatory marker and its potential for therapeutic monitoring in cases of canine pemphigus foliaceus and superficial pyoderma in dogs.** [Avaliação da Proteína C Reativa como marcador inflamatório e de seu potencial para monitoração terapêutica em casos de pênfigo foliáceo e de piodermite superficial na espécie canina]. 2015. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Pemphigus is included in a group of skin and mucous autoimmune vesicobullous dermatoses recognized in some mammals, including dogs. Many authors believe that pemphigus foliaceus (PF) is the autoimmune skin disease most often observed in dogs. Many must be the canine diseases considered in the pemphigus foliaceus differential diagnosis, especially the superficial pyoderma (SP). The C-Reactive Protein (CRP) is known as a major acute phase protein in dogs. The CRP increase has been observed in a wide variety of morbid conditions in dogs. The determination of CRP has been proposed as an inflammatory marker of some autoimmune diseases. This study aimed to determine whether C-Reactive Protein can be used as an early biomarker to differentiate pemphigus foliaceus of superficial pyoderma in dogs. An observational prospective longitudinal clinical study was undertaken including dogs affected by PF or PS. Fifty nine dogs were divided into three groups: Group I (Control) with 31 animals and II (PF) and III (SP), consisting of 14 dogs each. Dogs affected by PF or SP had skin fragments submitted to histopathological examination and direct immunofluorescent reaction (DIF). The blood sera were used to determine the CRP concentration, and also to perform the indirect immunofluorescent reaction (IIF) using canine footpad as substrate. The pemphigus patients (Group II) clinical involvement degree was evaluated by PEFESI, over a period of 90 days, moments in which IFI and evaluation of CRP took place. Comparing the DIF values with the histopathology there was an agreement of 75% (9/12) with a Kappa index of 0.77 ($p < 0.001$) which means a degree of substantial arrangement between the two methods. Considering IIF, the agreement value was 100% (14/14) with Kappa index of 1.0 ($p < 0.001$), showing perfect arrangement between the IIF and the histopathology. Group II showed higher CRP median (37.4

mg / mL) compared to Groups I, with 2.9 mg / mL ($p < 0.0001$) and III with 3.8 mg / mL ($p = 0.008$). There was no statistical difference between groups I and III ($p = 0.178$). Considering CRP $> 10,6\mu\text{g} / \text{mL}$ as a cutoff value, the chance of an animal having PF is 5.5 times higher than not to be, which is equivalent to a post-test probability of 84,6%, giving a 34.6% increase in the PF diagnostic capability. It concludes that determination of CRP is unequivocal asset for the establishment of diagnostic differentiation between the common superficial pyoderma to canine pemphigus foliaceus.

Keywords: Pemphigus foliaceus. Superficial pyoderma. Immunofluorescent. C-Reactive Protein.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Presença de bactérias, de configuração cocóide, em processo de fagocitose por neutrófilos e, ainda, bactérias dispostas no meio extracelular, de exame direto obtido de conteúdo pustular de cão com piodermite superficial. Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----45
- Figura 2 - Células acantolíticas entremeadas por neutrófilos, observadas no exame citológico de pústula de cão com pênfigo foliáceo. Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015-----45
- Figura 3 - Cão 36 (“Luna”) com pênfigo foliáceo. a) Eritema, pústulas e lesões em colarinho em região abdominal; b) Detalhe das lesões pustulares e em colarinho em região abdominal. Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----57
- Figura 4 - Animal 46 (“Costelinha”) com piodermite superficial. a) Pápulas eritematosas e pústulas em região abdominal ventral. b) Crostas melicéricas, eritema e pústulas em região tóraco-abdominal ventral. Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----58
- Figura 5 - Animal 41 (“Nega”) com pênfigo foliáceo. a) Edema, eritema encimados por crostas em região vulvar; b) Edema, crostas melicéricas perioculares e em ponte nasal, c e d) Crostas e pústulas em região medial de pavilhões auriculares. Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----58
- Figura 6 - Animal 42(“Nyna”) acometido pelo pênfigo foliáceo em diferentes momentos: a) dia 0, com lesões alopecicas, crostas, colarinhos epidérmicos, pápulas e pústulas disseminados; b) 30 dias após início da imunossupressão com prednisona, flagrante melhora do quadro com remissão das lesões; c) 90 dias após início da terapia com recidiva e agravamento do quadro penfigoso. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015-----66
- Figura 7 - Animal 34 (“Nina”) acometido pelo pênfigo foliáceo em quatro diferentes momentos: a) dia 0, quando do diagnóstico, com alopecia, eritema e encimados por crostas melicéricas em plano e ponte nasal, concomitante leucodermia, em espelho nasal; b) 15 dias após início da imunossupressão com prednisona, melhora do quadro com remissão parcial das lesões; c) 30 dias com dose imunossupressora de prednisona, evidente involução lesional; d) 60 dias de terapia, após redução da corticoterapia, surgimento de eritema encimado por algumas crostas. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----67
- Figura 8 - Animal 44(“Luna”) acometido pelo pênfigo foliáceo em dois diferentes momentos: a) dia 0, quando do diagnóstico, com alopecia, crostas melicéricas e colarinhos epidérmicos em região lombo-sacra e cervical

- ventral; b) 90 dias após início da imunossupressão com prednisona, melhora evidente do quadro com resolução das lesões. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----67
- Figura 9 - Animal 57 (“Meg”) com piodermite superficial em dois diferentes momentos: a) dia 0, quando do diagnóstico, com áreas circulares de alopecia, colarinhos epidérmicos disseminados e escamas furfuráceas e micáceas; b) 30 dias após início da antibioticoterapia, com resolução plena do quadro lesional. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----68
- Figura 10 - Animal 58 (“Polly”) com piodermite superficial em dois diferentes momentos: a) dia 0, quando do diagnóstico, com hipotricose, colarinhos epidérmicos, pápulas e crostas melicéricas em região abdominal; b) 30 dias após início da antibioticoterapia, com resolução plena do quadro lesional. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----68
- Figura 11 - Animal 52 (“Toby”) com piodermite superficial em dois diferentes momentos: a) dia 0, quando do diagnóstico, com eritema, rarefação pilosa e colarinhos epidérmicos encimados por crostas melicéricas em região medio-caudal de membro pélvico esquerdo; b) 30 dias após início da antibioticoterapia, com total resolução do quadro. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----69
- Figura 12 - Fluorescência de moderada intensidade, homogênea, evidenciada nas regiões intraepitelial e intercelular, quanto a presença de anticorpo anti-IgG, em paciente canino 34 (“Nina”) com PF. Aumento 40x. Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP (2013-2015) - São Paulo - 2015-----73
- Figura 13 - Fluorescência intensa evidenciada nas regiões intraepitelial e intercelular, pela reação de IFI, em paciente canino 35 (“Cherrie”) com PF. Aumento 40x. Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----73
- Figura 14 - Fluorescência moderada intensidade evidenciada nas regiões intraepitelial e intercelular, pela reação de IFI, em paciente canino 43 (“Tavinho”) com PF. Aumento 40x. Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP (2013-2015) - São Paulo - 2015-----74
- Figura 15 - Controle negativo – inexistência de fluorescência nas regiões intraepitelial e intercelular, pela reação de IFI. Aumento 40x. Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP (2013-2015) - São Paulo - 2015-----74

Figura 16 - Box Plot (mediana, P25 e P75, mínimo e máximo) dos valores de Proteína C Reativa dos cães nos Grupos: I (controle), II (pênfigo foliáceo) e III (piodermite superficial). Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015-----76

Figura 17 - Curva Roc para o diagnóstico de pênfigo foliáceo canino de acordo com valores de Proteína C Reativa. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015-----77

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Variáveis (idade, em anos, e sexo) dos 59 cães distribuídos segundo o Grupo, quais sejam o Grupo I (controle), Grupo II (pênfigo foliáceo) e Grupo III (piodermite superficial). HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo – 2015-----55
- Tabela 2 - Casuística dos Grupos pênfigo foliáceo (II) e piodermite superficial (III) segundo o quadro lesional tegumentar e a topografia. Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015-----56
- Tabela 3 - Resultados da reação de imunofluorescência indireta de soros caninos com pênfigo foliáceo. Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia da FM-USP (2014-2015) - São Paulo - 2015-----72
- Tabela 4 - Coeficientes (%) de variação intra e interensaio para kit ELISA para Proteína C Reativa. Serviço de Laboratório Clínico do VCM do HOVET-FMVZ/USP (2013-2015) - São Paulo - 2015-----75
- Tabela 5 - Valores de mediana de Proteína C Reativa nos Grupos I (controle), II (pênfigo foliáceo) e III (piodermite superficial). Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015-----76
- Tabela 6 - Valia da Proteína C Reativa para o diagnóstico diferencial de cães acometidos pelo pênfigo foliáceo perante a piodermite superficial canina. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015-----79
- Tabela 7 - Valores de Proteína C Reativa nos animais portadores de pênfigo foliáceo nos tempos: momento do diagnóstico, quinze, trinta, sessenta e noventa dias pós início da terapia imunossupressora. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----80

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Intensidade (%) do prurido nos animais com pênfigo foliáceo (Grupoll) e piodermite superficial (Grupolll). Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----56
- Gráfico 2 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 32 (Cherry), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----61
- Gráfico 3 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 33 (Bisteca), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----61
- Gráfico 4- Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 34 (Nina), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----62
- Gráfico 5 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 35 (Cherrie), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----62
- Gráfico 6 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 36 (Luna), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----62
- Gráfico 7 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 37 (Lilica), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----63
- Gráfico 8 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 38 (Bob), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----63
- Gráfico 9 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 39 (Jully), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015), São Paulo -2015. -----63
- Gráfico 10 -Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 40 (Lessy), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----64
- Gráfico 11 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 41 (Nega),

	pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----	64
Gráfico 12	- Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g}/\text{mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 42 (Nyna), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----	64
Gráfico 13	- Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g}/\text{mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 43 (Tavinho), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015-----	65
Gráfico 14	- Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g}/\text{mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n°44 (Luna), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----	65
Gráfico 15	- Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr no decorrer do seguimento clínico do animal n° 45 (Thor), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Escala de concordância do índice Kappa-----	51
Quadro 2 – Animais incluídos no estudo, contituíntes dos Grupos I (controle), II (pênfigo foliáceo) e III (piodermite superficial) segundo os dados de identificação, de definição racial, do sexo e de faixa etária. HOVET/FMVZ-USP (2013-2015). São Paulo – 2015 -----	52
Quadro 3 – Caracterização dos animais incluídos no Grupo II (pênfigo foliáceo), segundo os respectivos números de reavaliações, escore do PEFESI, títulos séricos obtidos na IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$). Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----	59
Quadro 4 - Resultados da reação de imunofluorescência direta em biópsia cutânea perilesional de caninos com pênfigo foliáceo. Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia da FM-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015 -----	71

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A - PEFESI - Pemphigus foliaceus extent severity index	99
Apêndice B - Caracterização dos resultados obtidos nos animais incluídos no Grupo III (Piodermite superficial), segundo os resultados de PCr ($\mu\text{g/mL}$), nos dias 0, 15, 30 e 60 e das reações de IFD e IFI. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015.....	100

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PF	Pênfigo foliáceo
FB	Foliculite bacteriana
PS	Piodermite superficial
PFA	Proteína de fase aguda
IL	Interleucina
PCr	Proteína C Reativa
PV	Pênfigo vulgar
PPN	Pênfigo paraneoplásico
PVE	Pênfigo vegetante
DSC1	Desmocolina 1
Ig	Imunoglobulina
IFD	Imunofluorescência direta
IFI	Imunofluorescência indireta
SIG	<i>Staphilococcus intermedius group</i>
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
USP	Universidade São Paulo
HOVET	Hospital Veterinário
FM	Faculdade de Medicina
VCM	Departamento de Clínica Médica
PEFESI	Pemphigus foliaceus extent severity index
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
pH	Potencial hidrogeniônico
TBS	Tampão prisma base
K	Índice Kappa
p	Valor de significância

ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
ZMB	Zona de membrana basal
SRD	Sem raça definida
P ₂₅	percentil 25
P ₇₅	percentil 75
CV	Coeficiente de variação
EIC	Espaço intercelular

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
-	negativo
>	maior
...	dado inexistente
g	grama
mg	miligrama
kg	quilograma
µg	micrograma
mL	mililitro
ng	nanograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
3	HIPÓTESE	38
4	OBJETIVOS	39
4.1	OBJETIVO GERAL	39
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
5	MATERIAL E MÉTODOS	40
5.1	ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS	40
5.2	ESTABELECIMENTO DO DIAGNÓSTICO	41
5.3	ESTABELECIMENTO DO ESCORE LESIONAL	42
5.4	COLETA DO MATERIAL	43
5.5	TÉCNICAS LABORATORIAIS	43
5.6	CITOLOGIA E BACTERIOSCOPIA	44
5.7	EXAME PARASITOLÓGICO DO RASPADO CUTÂNEO	46
5.8	COLETA DE MATERIAL PARA CULTURA E ANTIBIOGRAMA	46
5.9	BIÓPSIA E HISTOPATOLOGIA	47
6	RESULTADOS	52
7	DISCUSSÃO	81
8	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	92

1 INTRODUÇÃO

O termo pênfigo relaciona-se a uma das modalidades de enfermidades cutâneas de caráter autoimune traduzida pela presença de lesões vésico-bolho-pustulares sediadas intraepidemicamente.

O pênfigo foliáceo (PF) é considerado, por muitos autores, como uma das doenças tegumentares autoimunes mais frequentes dentre os pacientes caninos, sobrepujando, na dependência do autor consultado, os casos de lupus eritematoso cutâneo. Clinicamente, observam-se, nos quadros iniciais, lesões caracterizadas como perdas teciduais, mormente pústulas efêmeras, por sobre áreas eritematosas ou eritrodérmicas. Já, em casos de evolução tardia, surgem lesões caducas representadas por colarinhos epidérmicos e intensa deposição escamo-crostosa. Histologicamente, o PF caracteriza-se pela acantólise subcórnea, decorrente da ação de autoanticorpos voltados à superfície queratinocitaria (ACKERMAN, 1985; OLIVRY, 2006).

Tanto o fenômeno acantolítico como a consequente perda de coesão celular podem, também, ser evidenciados em quadros de foliculite bacteriana (FB) decorrendo da migração leucocitária epidérmica e folicular, com a liberação de enzimas proteolíticas que agem rompendo a ligação intercelular. Tal dermatopatia, assaz frequente, caracteriza-se, igualmente, por lesões em muito similares àquelas evidenciadas em cães penfigosos (KUHL; SHOFER; GOLDSCHMIDT, 1994).

As proteínas de fase aguda (PFAs) estão envolvidas em reação sistêmica complexa que ocorre rapidamente após uma injúria tecidual. AS PFAs traduzem-se em resposta inespecífica do sistema de defesa inato do hospedeiro perante distintas causas, tais como: infecções, neoplasias, doenças autoimunes ou processos traumáticos. São mediadas por citocinas pró-inflamatórias, incluindo as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL-6) e o fator de necrose tumoral, secretados por células inflamatórias locais como monócitos e macrófagos (CECILIANI; GIORDANO; SPAGNOLO, 2002). Esse processo induz a produção, principalmente pelo fígado, de proteínas plasmáticas chamadas de proteínas de fase aguda. Em cães, a Proteína C Reativa (PCr) é considerada uma das principais PFAs (CERON; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). A concentração sérica da PCr é baixa em animais hígdos, porém

aumenta rapidamente após inúmeras noxas. A PCr tem-se mostrado útil para diferenciar distintas enfermidades (MATÍNEZ-SUBIELA et al., 2002; NIELSEN et al., 2007; KOCATURK et al., 2014).

O pênfigo foliáceo pode ser considerado como uma dermatopatia rara, frente a magnitude de ocorrência da piodermite superficial (PS), uma das doenças mais comumente diagnosticadas na prática da clínica dermatológica canina. No entanto, estas duas enfermidades cutâneas apresentam quadro lesional bastante similar, que gera dificuldades e retardo para o estabelecimento do cabal diagnóstico. Em muitos casos, faz-se necessário recorrer a exames complementares, tais como a histopatologia de biópsias cutâneas, que, em alguns casos, também, se mostra ineficaz na precisa diferenciação entre os quadros (KUHL; SHOFER; GOLDSCHMIDT, 1994). Um diagnóstico precoce é bastante importante para que o início de terapia adequada seja instituído, uma vez que o PF e a PS requerem terapias antagônicas, respectivamente, o uso de glicorticóides ou de antimicrobianos.

Trabalhos descrevendo a avaliação da concentração de PCr em dermatopatias caninas são escassos (TERADA et al., 2012), e, portanto, a proposta deste estudo é a de investigar a concentração da PCr em cães com PF ou PS e verificar se a PCr pode ser utilizada como um marcador biológico e até de seguimento clínico para doenças autoimunes, tais como o PF.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O pênfigo inclui-se em uma das modalidades arroladas no grupo de dermatoses autoimunes vésico-bolhosas da pele e mucosas reconhecido em alguns mamíferos, incluindo os seres humanos, espécimes: caninos, felinos, equinos e, mais raramente, ovinos (OLIVRY, 2006; MONTEIRO et al., 2007). Classicamente, segundo Nishifuji e colaboradores em 2009, existem dois subtipos principais de pênfigo descritos, pênfigo foliáceo (PF) e pênfigo vulgar (PV), embora algumas formas pouco frequentes ou, até mesmo raras, tenham sido evidenciadas, a exemplo dos pênfigos paraneoplásico (PPN), eritematoso (PE) e o, controverso PVE, em medicina veterinária, ou seja o pênfigo vegetante (LARSSON et al., 1993; OLIVRY, 2006; RECHE JUNIOR et al., 2012). Etimologicamente o termo pênfigo, com sua latinização por François Salvage, no século XIX, deriva de expressões helênicas: “pemphis”, “pompholix”, “pomphos” com significado literal de lacuna, vesícula ou bolha. Médicos nos primórdios da medicina chinesa, denominavam-no de “tiao-pao”, termo relativo aos nichos onde se colocavam imagens de deuses cultuados, pelo aspecto similar com as lesões cutâneas evidenciadas. Também, em hebraico antigo, conheciam-no como “ababuoth”. Já, a expressão foliáceo, derivação do latim, “foliaceus”, bem caracteriza o frequente aspecto descamativo que se deposita por sobre a pele agredida, mimético a folhas vegetais desprendidas (BALDA et al., 2008).

Com grande controvérsia querem alguns autores considerar o PF, como a dermatopatia autoimune mais corriqueira dentre pacientes caninos e felinos (ACKERMAN, 1985), todavia autores estadunidenses (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013) e brasileiros, de São Paulo (LARSSON, 2015 no prelo) reputam sua prevalência como sendo inferior ou no máximo similar àquela do lupus eritematoso cutâneo crônico canino.

A casuística paulistana acumulada (ODAGUIRI et al., 2012) de caninos penfigosos destaca-se no contexto internacional, suplantando em magnitude numérica estudos multicêntricos envolvendo casos estadunidenses e australianos (MUELLER et al., 2006).

Em serviço especializado em atendimento dermatológico do Hospital Veterinário da Universidade de São Paulo se tem diagnosticado, em série histórica entre os anos de 2000 e 2008, cerca de 0,72 casos mensais, suplantando os 0,18 casos atendidos mensalmente em interregno de 15 anos, ou seja, entre 1986 e 2000 (BALDA et al., 2002, 2008).

Desde o final dos anos de 1970, a partir de sua primo descrição em 1977, muito se tem estudado e investigado acerca das características clínicas, histopatológicas e imunológicas inerentes a esta enfermidade (BIZIKOVA et al., 2012).

No pêfingo anticorpos do tipo IgG (IgG1 e IgG4) voltados a componentes desmossômicos interrompem a conexão celular entre os queratinócitos, resultando na formação de vesículas, bolhas ou pústulas intraepidérmicas (IDE et al., 2010). As lesões são eliciadas pela separação das junções celulares em processo designado de acantólise (LÓPEZ-ROBLES et al., 2001), magistralmente caracterizado há mais de cem anos por Heinrich Auspitz, na Áustria. A ligação dos auto-anticorpos com os antígenos do pêfingo leva a internalização e fusão com lisossomos intracelulares e resulta na liberação e ativação do fator de ativação (uroquinase) do plasminogênio que converte o plasminogênio em plasmina. A plasmina é a grande responsável pela hidrólise das moléculas de adesão intercelular, que resulta na perda da coesão entre os queratinócitos e na formação de lacunas intraepidérmicas. A acantólise, nesta enfermidade, ocorre nas camadas mais superficiais da epiderme, o que resulta em grande fragilidade à noxas mecânicas e assim facilita o rompimento das vésicobolhas ou pústulas e a subsequente formação de lesões crostosas caducas (LARSSON, 2015 no prelo).

O alvo destes autoanticorpos, em pacientes humanos, é a desmogleína, que compõe normalmente o desmossomo, estrutura envolvida na manutenção da junção intercelular. No entanto, o que gera eliciação desse processo não está, ainda, devidamente esclarecido (LÓPEZ-ROBLES et al., 2001). No PF humano sabe-se que o principal antígeno envolvido é a desmogleína I, glicoproteína transmembrânica de 150 Kd, do grupo das caderinas, que compõem as moléculas de adesão (STEEVES et al., 2002).

Desmossomos são complexas estruturas de adesão das células que contém muitos alvos em potencial de serem autoantígenos do PF, a exemplo das várias

caderinas transmembrânicas (desmogleínas e desmocollinas) e as proteínas de conexão desmoplâquinas, placoglobinas e placofilinas que, conectam as caderinas aos filamentos intermediários de queratina, formando o citoesqueleto queratinocitário (BIZIKOVA et al., 2012).

Bizikova et al. (2012), há não muito tempo, caracterizaram a desmocollina 1 (DSC1) variante “b” como uma caderina desmossômica canina necessária à adesão dos queratinócitos da epiderme. Além disso, demonstraram que a maioria dos cães acometidos pelo PF possuem anticorpos circulantes anti-IgG anti DSC1, e, portanto, segundo aqueles autores, esta proteína representaria um autoantígeno importante na patofisiologia do pênfigo foliáceo canino.

As manifestações clínicas do PF são bastante similares dentre as diferentes espécies de animais domésticos (OLIVRY et al., 2006). Esta doença, clinicamente, é caracterizada como uma dermatite esfoliativa generalizada. Frequentemente, inicia-se em região cefálica e de pavilhões auriculares, porém estende-se para o restante da superfície corpórea. Contrariamente ao evidenciado no PV, o envolvimento de mucosas e de regiões de transição mucocutâneas não são características proeminentes (ACKERMAN, 1985). Na maioria dos cães acometidos, as lesões se iniciam na face, principalmente, no plano e ponte nasal, região periocular e pavilhões auriculares. Nestas áreas o padrão é, usualmente, simétrico e bilateral (OLIVRY, 2006; LARSSON, 2015 no prelo).

Com certa frequência observa-se o envolvimento dos coxins palmo-plantares, dos membros locomotores, da região abdominal ventral e em cerca de 60% dos animais, as lesões tornam-se multifocais ou generalizadas em período de seis meses. Pode, ainda, haver o comprometimento ungueal, mormente entre os felinos, o que torna o quadro onicopático um forte indicativo da enfermidade juntamente com a telite das fêmeas felinas penfigosas (LARSSON, 2015 no prelo). Os cães com diagnóstico estabelecido de PF apresentam, de início, lesões pustulares e, a seguir, aquelas secundárias quase sempre representadas por lesões pápulo-crostosas e em colarinho epidérmico, essas últimas decorrentes da ruptura das coleções líquidas. Alopecia e eritrodermia são, também, frequentemente observadas. O prurido está presente em cerca de metade dos casos de PF. Anorexia, depressão, pirexia e perda de peso são encontradas em animais com lesões erosivas disseminadas em fase já bem avançada do decurso evolutivo (OLIVRY et al., 2006).

O diagnóstico da enfermidade autoimune baseia-se nos dados coligidos na anamnese, nos seus aspectos sintomáticos, tipos e localização das lesões tegumentares, somados aos resultados de exames complementares.

Dentre esses últimos, no PF o exame citológico pode auxiliar, e em muito, quando da evidenciação da presença de células acantolíticas (Células de Tzanck), em material provindo do conteúdo pustular colhido.

As denominadas Células de Tzanck são aquelas das camadas espinhosa ou granulosa que, devido a lise das pontes intercelulares, perderam sua conexão e se encontram “soltas” no interior das formações vésico-bolho-pustulares intraepidérmicas (MARSELLA, 2000). A técnica citológica, no entanto, apresenta algumas limitações e não pode ser utilizada como método único para o diagnóstico do PF. As lesões pustulares são habitualmente efêmeras e muitas vezes não são evidenciadas no momento da coleta do material. Ainda mais, a presença de células acantolíticas não é um achado patognomônico do pênfigo foliáceo (MUELLER et al., 2006), embora em número muito menor podem estar presentes na foliculite bacteriana, na dermatofitose pustular e em algumas farmacodermias (OLIVRY et al., 2006). Outras técnicas diagnósticas são necessárias para a confirmação da enfermidade nos cães.

No histopatológico, tido como exame complementar de eleição para a diagnose do PF, que sucede o procedimento de biópsia, é possível a evidenciação de acantólise, subcorneal ou intragranulosa, que resulta na formação de verdadeiras fendas que são clinicamente retratadas pelo surgimento de lesões vésico-bolho-pustulares e, também, pela presença de acantócitos (LARSSON, 2015 no prelo). As pústulas, que comumente invadem o epitélio e/ou o lúmen infundíbular dos folículos, são grandes e confluentes, englobando vários folículos pilosos, fato que diferencia tais lesões daquelas de foliculite bacteriana. Mesmo que os queratinócitos acantolíticos possam ser vistos em quadros de infecção bacteriana cutânea e naqueles de dermatofitose pustular, a presença de um número elevado de células epidérmicas livres, muitas vezes observadas em grupos, podem ser mais sugestivas de PF relativamente a dermatoses infecciosas (OLIVRY et al., 2006).

A imunofluorescência, direta ou indireta, e a imunoistoquímica podem ser utilizados para fins de diagnóstico, porém, ainda, são pouco empregados, na rotina da clínica dermatológica veterinária, mormente pela escassez de laboratórios

especializados e pelo alto custo de sua execução. A técnica imunoistoquímica para a detecção da desmogleína-1 tem sido utilizado para demonstrar um padrão alterado de expressão desmogleínica na região perilesional da pele de pacientes com pêfigo foliáceo. Em indivíduos hígidos, a desmogleína-1 apresenta um padrão uniformemente distribuído, finamente pontilhada, na periferia dos queratinócitos. Em contraste, áreas lesadas ou mesmo íntegras de pacientes com PF apresentam impregnação irregular da coloração pericitoplasmática associada à coloração citoplasmática das células acantolíticas (STEEVES et al., 2002).

A imunofluorescência direta (IFD) e a imunoperoxidase têm sido, também, utilizadas para detecção de autoanticorpos anti-queratinócitos, depositados na pele de cães penfigosos, pertencentes as classes IgG1 e/ou IgG4, destarte por vezes com resultados falso-positivos (LENNON et al., 2006). Já, a identificação de autoanticorpos circulantes, nos casos de pêfigo, historicamente, tem sido executada por meio da imunofluorescência indireta (IFI), testando soros de pacientes animais ou humanos. Sabe-se que os resultados da IFI variam de acordo com o substrato utilizado para detecção de autoanticorpos. Ao se utilizar o coxim canino como substrato para a IFI, em animais acometidos pelo PF, pode-se observar positividade em 71% a 84% dos casos, com evidente fluorescência, percentis esses já evidenciados em trabalhos desenvolvidos com casuística estadunidense e paulistana (OLIVRY, 2006; LUCARTS, 2010). A titulação sequencial de anticorpos séricos poderia ser utilizada não só para o diagnóstico, mas também para monitoração da atividade da doença (NISHIFUJI; YOSHIDA-YAMAKITA; IWASAKI, 2005).

Muitas podem ser as enfermidades que devem ser incluídas no diagnóstico diferencial do pêfigo foliáceo, principalmente, a contumaz piodermite superficial. As infecções bacterianas do tegumento, denominadas piodermites, são classificadas, segundo aspectos clínicos, em superficiais ou profundas. Em medicina veterinária, as piodermites assumem grande importância, na espécie canina, notadamente as ditas superficiais. As piodermites superficiais englobam o impetigo, a piodermite muco-cutânea, a dermatofilose, a foliculite bacteriana e a piodermite esfoliativa, sendo a FB a mais frequentemente diagnosticada (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

No cotidiano do atendimento dermatológico de hospitais, clínicas e ambulatórios veterinários brasileiros chega a ser monótono, pela frequência de ocorrência, o estabelecimento do diagnóstico das dermatopatias bacterianas, retratadas pelas piodermites, ditas superficiais que, corriqueiramente, secundam quadros de endocrinopatias, acarioses, genodermatoses, disqueratinizações e alergopatias tegumentares (dermatites: atópica, trofoalérgica, por picada de sifonápteros e ixodídeos). Tais dermatites alérgicas consideradas como as “enfermidades do último vintênio”, mormente em países desenvolvidos, cursam com infecções secundárias decorrentes da presença de bactérias do grupo denominado SIG – *Staphylococcus intermedius group* (LARSSON JÚNIOR, 2015 no prelo).

Historicamente, o *Staphylococcus intermedius*, um coco coagulase positivo que foi descrito, inicialmente, como uma espécie distinta de *S.aureus*, foi o patógeno mais usualmente isolado dos cães com PS. Todavia, microbiologistas provaram que os patógenos identificados preteritamente como *S.intermedius* eram, na verdade, da espécie *S.pseudintermedius*, e, mais recentemente, denominaram-nos como do Grupo SIG, que incluem *S.intermedius*, *S.delphini* e *S.pseudintermedius*, sendo este último o mais incriminado agente causal das piodermites caninas (BLOOM, 2014).

Clinicamente, a PS pode ser observada em diversas raças caninas, não havendo evidente predisposição racial. Muitos cães apresentam áreas de alopecia multifocal, colarinhos epidérmicos, pápulas eritematosas, pústulas e, frequentemente, crostas melicéricas, encimando as lesões, distribuídas em região tóraco-dorsal, abdominal e axilar. O prurido nos cães varia de inexistente à intenso (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

O PF, com lesões primárias, compostas por pápulas eritematosas e pústulas, e, secundariamente, por crostas, pode confundir-se, clinicamente, com quadros de foliculite bacteriana, piodermite esfoliativa ou impetigo bolhoso, notadamente quando o PF apresenta lesões disseminadas que acometem toda a região dorsal torácica do animal (LARSSON JÚNIOR, 2008).

Em vários casos, o PF acomete áreas que são consideradas incomuns nas infecções causadas por *Staphylococcus spp.*, tais como: plano nasal, face, pavilhões auriculares e coxins palmo-plantares. No entanto, quando estas áreas não estão afetadas pela enfermidade a consecução de seu diagnóstico torna-se bem mais trabalhosa. A aparência das lesões, nestas enfermidades, pode ser sutilmente

diferente entre si, com colarinhos epidérmicos e lesões “em alvo” típicas de infecções bacterianas e menos comuns no PF. Achados citológicos e histopatológicos são importantes na determinação do correto diagnóstico. O PF é caracterizado por lesões pustulares assépticas plenas de neutrófilos e células acantolíticas. Em contraposição, nos casos de infecções bacterianas nas pústulas consideradas sépticas, além dos neutrófilos é possível encontrar variada quantidade de bactérias cocóides. O exame histopatológico é útil para diferenciar lesões de infecção bacteriana daquelas de gênese autoimune, crostosas ou pustulares. No entanto, muitas vezes, a sua diferenciação pode ser bastante desafiadora (GORTEL, 2013). O diagnóstico da PS baseia-se, muitas vezes, nas manifestações clínicas somados aos achados de citobacterioscopia e, principalmente, naqueles provindos de cultura bacteriana, com a caracterização de bactérias do Grupo SIG (BLOOM, 2014).

A terapia ortodoxa clássica, dita de eleição, para as enfermidades cutâneas autoimunes, é o da utilização dos glicocorticóides sistêmicos, em doses imunossupressoras. Têm-se observado, muitas vezes, que a terapia isolada com glicocorticóides não gera a remissão ansiada, nos casos de PF. Nestes, necessita-se de protocolos heterodoxos através da associação de glicocorticóides com drogas citostáticas e, em especial, a azatioprina (LARSSON, 2015 no prelo). A ciclofosfamida e o clorambucil seriam outros ativos indicados em associação aos glicocorticóides. O tratamento do PF tem resultados variáveis, em função dos diferentes protocolos empregados, da evolução e gravidade da enfermidade (OLIVRY, 2006).

O tratamento exitoso de casos de foliculite bacteriana requer o uso de antimicrobianos cefalosporínicos ou β -lactâmicos, mormente a cefalexina ou a amoxicilina potencializada, por período variável de três a oito semanas, na dependência da extensão das lesões. Atualmente, quadros de *Staphylococcus spp.* meticilina resistentes têm sido, cada vez mais, identificados como causas de infecções tegumentares em cães. Nestes casos, o uso de β -lactâmicos se mostra ineficaz, sendo necessário outros ativos antibióticos, tais como a doxicilina ou, mesmo, o cloranfenicol. Sendo, então, imprescindível a realização de cultura bacteriana, seguida de antibiograma para a escolha do protocolo de terapia adequada (BLOOM, 2014).

Pelo fato da terapia preconizada ser completamente distinta e até antagônica entre os casos de PF e de piodermite superficial, é necessário estabelecer o diagnóstico diferencial entre essas enfermidades de forma precisa e o mais rapidamente possível. Resultados obtidos por outros exames laboratoriais podem somar se às observações clínicas no estabelecimento do diagnóstico diferencial dessas enfermidades.

A Proteína C Reativa (PCr) é conhecida como a principal proteína de fase aguda em cães, primatas, coelhos e hamsters. A PCr é uma pentraxina, com peso molecular de 100kD, possuindo estrutura pentamérica de 20kD cada, tendo sido a primeira proteína de fase aguda (PFA) descrita. Sua denominação, originalmente proveio da propriedade dela ligar-se e precipitar o polissacarídeo C do *Streptococcus pneumoniae* (VOLANAKIS, 2001; PEPYS; HIRSCHFIELD, 2003). Sua estrutura possui duas faces, aquela que se liga a fosfocolina, que é uma cadeia lateral comum, encontrada em todas as membranas celulares, em muitas bactérias e protozoários. A outra face, por sua vez, é responsável pela ligação aos neutrófilos, por meio de receptores de anticorpos FcγRI e FcγRIIa e do componente C1q do Complemento. Assim, a PCr promove opsonização, fagocitose e a remoção das células danificadas, mortas, bem como de patógenos. A PCr pode ligar-se aos polissacarídeos e glicolipídeos bacterianos, às células saudáveis ou danificadas, ativando a via clássica do sistema complementar, via componente C1q. A PCr apresenta papel antiinflamatório, ainda, por inibir a quimiotaxia, a produção de superóxido, a degranulação de neutrófilos e por bloquear a agregação plaquetária (TIZARD, 2009). Assim, a PCr pode, também, promover a reparação tecidual. Suas funções variam segundo a espécie animal. Nos cães, a elevação de PCr tem sido observada em ampla variedade de condições mórbidas, incluindo doenças infecciosas, imunemediadas, neoplásicas, inflamatórias, gastrintestinais, nos procedimentos cirúrgicos e após injúrias experimentalmente induzidas (CERON; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

Quando da avaliação, por microscopia eletrônica, verificou-se que a PCr canina assemelha-se a humana, no entanto, a grande diferença entre elas se prende ao fato de duas das cinco subunidade da PCr canina serem glicosiladas, o que pode explicar, em parte, a dificuldade de se utilizar anticorpos voltados à PCr humana

para sua mensuração em pacientes caninos (CERON; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

A PCr pode ser aferida por diferentes métodos, utilizando anticorpos específicos caninos, nos quais se incluem ensaios de imunodifusão e imunofluorimetria tempo-resolvido, testes de: capilaridade ou de aglutinação reversa passiva em látex, ELISA e ensaio imunoturbidimétrico humano automatizado (CERON; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005; KLENNER; BAUER; MORITZ, 2010).

Alguns fatores pré analíticos interferem nos resultados das mensurações da PCr. Assim, a PCr é estável, a 10° C negativos, por três meses e é inativada quando submetida à temperatura de 70° C por 30 minutos. Os seus valores são menores quando da utilização do anticoagulante citrato, no entanto, considera-se que as PFAs sofram baixa interferência dos efeitos dos anticoagulantes de forma a interferirem na interpretação clínica dos resultados. A hemólise e a lipemia elevam as concentrações de PCr quando se utiliza o método ELISA para sua mensuração, por outro lado, a bilirrubinemia reduz as concentrações de PCr (CERON; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005).

A concentração de referência de PCr para cães adultos hígdos varia dependendo das condições analíticas. Variação das concentrações dependendo da raça do cão podem ocorrer, embora não haja consenso firmado sobre isto. Não há significativa interferência da idade nas determinações de PFAs (CERON; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005) e, tampouco, diferenças quanto ao gênero, destarte há elevação das PFAs durante a prenhez (KURIBAYASHI et al., 2003). As condições ambientais podem interferir nas concentrações devido a maior exposição a fatores que estimulem o sistema imune. Merece destacar que as concentrações de PCr não se alteram em cães sob terapia com glicocorticosteróides (MARTÍNEZ-SUBIELA; GINEL; CERÓN, 2004).

A PCr vem sendo amplamente estudada e empregada em medicina humana e se tem demonstrado correlação entre diversas enfermidades e níveis elevados de PCr sérica. A PCr tem sido sugerida como sendo um marcador inflamatório de enfermidades autoimunes, tais como psoríase e artrite reumatóide, além de cardiomiopatias, doenças neoplásicas ou infecciosas humanas. Acredita-se que um dos papéis principais da PCr é o de reconhecer substâncias autógenas,

possivelmente tóxicas, liberadas a partir de tecidos lesados e a elas ligar-se para detoxificá-las (ISHA; JAIN; LAL, 2011).

Na medicina humana as determinações de PFAs são utilizadas durante o acompanhamento da monitoração da resposta à terapia de inúmeras condições mórbidas. Quando o tratamento se mostra efetivo, as PFAs retornam aos valores basais mais rapidamente que outros indicadores de regressão de doença (PALTRINIERI, 2007). Em cães com anemia hemolítica imunemediada as concentrações séricas de PCr diminuem de maneira significativa no pós terapia (GRIEBSCH et al., 2009).

O nível da PCr pode estar alterada em situações decorrentes de diferentes noxas, tendo baixa especificidade diagnóstica para detectar a causa, não podendo ser, portanto, usada como método de eleição para o diagnóstico de uma determinada doença em particular. Inúmeras são as enfermidades infecciosas, degenerativas, neoplásicas, oclusivas, referidas na bibliografia que levam ao aumento dos níveis séricos de PCr (CERON; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005; GRIEBSCH et al., 2009; TECLES et al., 2009). Ainda, é sabido que a concentração de PCr é útil para monitorar a evolução clínica, avaliar a resposta do organismo frente a terapia escolhida e, até mesmo, prestar-se para substituí-la quando do insucesso. Na medicina veterinária, as concentrações de PCr não têm sido o bastante avaliadas, em testes de rotina e, ainda, carece-se de mais estudos relacionando suas concentrações em distintas enfermidades (NAKAMURA et al., 2008).

A patofisiologia do processo inflamatório do pênfigo tem sido estudada, porém seus exatos mecanismos ainda continuam incertos (CHRIGUER; ROSELINO; DE CASTRO, 2012).

Considera-se, de há muito, que a etiologia do pênfigo esteja relacionada à produção inadequada de autoanticorpos que exibem especificidade para algum antígeno epidérmico (THOMPSON, 1993), no entanto ainda não se sabe ao certo o que eliciaria a a formação destes anticorpos no pênfigo canino (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). A ligação dos auto-anticorpos ao antígeno alvo leva a ocorrência de acantólise e a ativação da cascata do complemento. Muitos produtos são formados durante a ativação do complemento, principalmente o C3a e C5a, que são capazes de induzir a degranulação de mastócitos, liberação de aminas vasoativas e

do fator quimiotático de eosinófilos (THOMPSON, 1993; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). O C5a também é fator quimiotático de neutrófilos, que permite a observação destas células no interior das lesões pustulares do pêfingo foliáceo canino (ROSENKRANTZ, 1993).

Em trabalho desenvolvido no Japão e, recentemente, divulgado, caracterizou-se que a determinação sérica de proteínas de fase aguda, como PCr, seria um marcador de valia para os casos de PF, afora de outras enfermidades bacterianas, neoplásicas, acarianas e fungicas (TERADA et al., 2012).

Diante da crescente ocorrência de casos de pêfingo foliáceo e de piodermite superficial em cães, na rotina da clínica dermatológica, em suas distintas formas, cada vez mais corriqueiras, busca-se, na atualidade, identificar outras ferramentas que possibilitem estabelecer o diagnóstico diferencial entre as duas entidades nosológicas e, principalmente, para determinar, de modo rápido e menos invasivo, a resposta ao tratamento, as evidencias de recidiva, em curso, e até a prognose. Como o tratamento do PF e da PS requer abordagem terapêutica distinta, o diagnóstico diferencial entre ambos auxiliará a instituição mais rápida da terapia correta obtendo-se, dessa forma, uma melhora clínica mais precoce.

3 HIPÓTESE

A hipótese basilar deste estudo é a de que os cães, acometidos por pênfigo foliáceo, apresentem concentrações mais elevadas de Proteína C Reativa perante os animais hígidos ou acometidos pela piodermite superficial.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Determinar se a Proteína C Reativa pode ser utilizada como um marcador biológico precoce para diferenciar o pênfigo foliáceo da piodermite superficial em cães.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a utilidade da Proteína C Reativa no diagnóstico diferencial do pênfigo foliáceo relativamente à piodermite superficial.
- 2) Correlacionar os níveis séricos de PCr com a melhora clínica, dos pacientes acometidos por PF, visando o acompanhamento evolutivo na trans e pós terapia dessa enfermidade.
- 3) Estimar a correlação entre os achados clínicos e histopatológicos com aqueles da Proteína C Reativa, imunofluorescência direta ou indireta no diagnóstico de pênfigo foliáceo ou da piodermite superficial.

5 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho constituiu-se em estudo clínico observacional, prospectivo e longitudinal, conduzido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, com aprovação das Comissões de Ética no uso de animais e de Ética Hospitalar da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP) e após prévia autorização dos proprietários dos cães incluídos na pesquisa, conforme o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido disponibilizado e firmado.

5.1 ANIMAIS E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Constituíram-se três grupos de estudos, todos compostos por animais da espécie canina, machos ou fêmeas de diferentes idades, sendo um Grupo controle (I), um Grupo de cães com pênfigo foliáceo (II) e, finalmente, um Grupo de animais com piodermite superficial (III).

Consideraram-se como critérios de seleção, cães acometidos pelo pênfigo foliáceo ou piodermite superficial, machos ou fêmeas e com faixa etária variada que não apresentassem co-morbidades graves, tais como enfermidade renal ou hepática, endocrinopatias e neoplasias.

No Grupo I, tido como controle, englobaram-se 31 cães hígidos, provenientes de canis ou residências, com a finalidade de se estabelecer os valores normais de concentração sérica de Proteína C Reativa, que foram utilizados para cotejar com aqueles dos animais doentes. Escolheram-se cães clinicamente hígidos, devidamente vermifugados e vacinados e, sem qualquer alteração tegumentar ou sistêmica, indicativa de processos inflamatórios, infecciosos ou neoplásicos, aos exames físicos. A inclusão, ainda, baseou-se nos resultados obtidos em exames complementares realizados em todos os animais (hemograma, contagem plaquetária, determinação sérica de ureia, creatinina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, bilirrubinas, proteínas totais, albumina, globulinas e glicemia).

Os Grupos II e III, por sua vez, foram compostos por animais atendidos na rotina do Serviço de Dermatologia do Departamento de Clínica Médica (VCM) e do Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (HOVET/FMVZ-USP) que eram trazidos por apresentarem quadro clínico compatível com aqueles de pênfigo foliáceo ou de piodermite superficial. Após minuciosa anamnese todos os animais foram submetidos a criterioso exame físico e à coleta de sangue para execução de exames laboratoriais (glicemia, hemograma, contagem plaquetária, determinação sérica de ureia, creatinina, fosfatase alcalina, alanina aminotransferase, bilirrubinas, proteínas totais, albumina e globulinas) e de exsudato cutâneo para exames citobacterioscópico, cultura e antibiograma. No Grupo II incluíram-se 14 animais com pênfigo foliáceo e no Grupo III 14 outros cães com piodermite superficial.

5.2 ESTABELECIMENTO DO DIAGNÓSTICO

O diagnóstico estribou-se nos dados coligidos na anamnese, nos resultados dos exames físico e complementares. Na avaliação dermatológica, foram considerados como casos típicos de pênfigo foliáceo aqueles que se apresentaram com lesões, simétricas e bilaterais, na face (plano e ponte nasal, região periocular), pavilhões auriculares, nos membros e na região abdominal ventral, dos tipo vésico-bolho-pustulares, pápulo ou escamo-crostosas e/ou em colarinho epidérmico, distribuídas de forma multifocal ou generalizada. Foram, por sua vez, considerados casos de piodermite superficial aqueles que se apresentaram com pústulas, escamo-crostas e colarinhos epidérmicos distribuídos de forma generalizada.

Ao exame físico quando da presença de coleções líquidas procedia-se o exame citobacterioscópico do conteúdo pustular para evidenciação de células acantolíticas ou inflamatórias e/ou bactérias.

A confirmação do diagnóstico de pênfigo foliáceo se deu através do exame histopatológico, tido como padrão-ouro, na bibliografia nacional e internacional compulsada (OLIVRY, 2006; BALDA et al., 2008; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013; LARSSON, 2015 no prelo).

Estabelecido o diagnóstico de PF ou de PS, os cães foram submetidos ao tratamento específico para cada uma das condições mórbidas baseado, respectivamente, no uso de imunossupressores ou de antimicrobianos, de acordo com o protocolo terapêutico padrão utilizado no Serviço de Dermatologia do VCM e do HOVET/FMVZ-USP. Nesses protocolos, usualmente, preconiza-se o uso de prednisona ou prednisolona em dose imunossupressora, 2mg/kg, *per os*, a cada 24 horas, inicialmente, com posterior redução da medicação após reavaliação nos casos de caninos penfigosos. Em casos refratários de PF, quando do emprego isolado de glicocorticóide, associa-se a azatioprina (1,5-2,0mg/kg, a cada 24 horas), também por via oral, ou, ainda, o micofenolato de mofetila (10mg/kg, *per os*, a cada 12 horas). Nos quadros de PS, cefalosporínicos (cefalexina, na dose de 30mg/kg, a cada 12 horas por período de 21 a 60 dias) ou β -lactâmicos (amoxicilina potencializada com clavulanato de potássio na dose de 20mg/kg, também a cada 12 horas por, pelo menos, 21 dias) são os ativos antimicrobianos de primeira escolha para terapia oral. Após o início dos protocolos terapêuticos, os cães foram acompanhados clínica e periodicamente até a alta médica (PS) ou por um período de até noventa dias (PF).

5.3 ESTABELECIMENTO DO ESCORE LESIONAL

Estabelecido o diagnóstico de PF, os pacientes caninos foram tratados tal como retro referido. Após o início da terapia, os animais do Grupo II foram acompanhados, clinicamente, por quinze, trinta, sessenta e noventa dias após o início do tratamento. Em cada uma dessas avaliações, utilizou-se o PEFESI (*pemphigus foliaceus extent and severity index*), índice de extensão e gravidade do pênfigo foliáceo, disposto no apêndice A, para que fosse possível documentar o grau de acometimento dos cães penfigosos. O PEFESI foi estabelecido por pesquisadores norte-americanos (OLIVRY; RIVIERRE; MURPHY, 2003) com a finalidade de se conseguir quantificar três das lesões características do PF (pústulas, crostas e erosões) de forma mais objetiva.

Os animais do Grupo III, por sua vez, foram acompanhados por quinze, trinta e até sessenta dias após início da terapia, momentos nos quais foi avaliada a evolução clínica do processo, a saber:

- 1- “resolução” – quando da total ausência das lesões típicas de PS
- 2- “melhora” – quando da involução significativa (> 50%) da gravidade, do número e do aspecto das lesões previamente evidenciadas
- 3- “inalteração” – quando da ausência de melhora ou redução insuficiente (<50%) da intensidade, da gravidade, do número e aspecto das lesões primitivas

5.4 COLETA DO MATERIAL

Foram coletados aproximadamente 10 mL de sangue por meio da venipunção da jugular para mensuração da Proteína C Reativa e submissão a exames laboratoriais de todos os animais selecionados. Amostras hemolisadas e lipêmicas foram descartadas e coletadas novamente sob condições adequadas. As amostras foram alíquotadas em tubos de Eppendorf e, adequadamente, estocadas em freezer a 80°C negativos para a posterior dosagem da Proteína C Reativa.

A coleta de sangue foi realizada uma única vez nos animais do Grupo I. Naqueles dos Grupos II e III foram executadas múltiplas coletas. Nos animais do Grupo II (pênfigo foliáceo) as amostras sanguíneas foram obtidas nos momentos “antes da terapia” e 15, 30, 60 e 90 dias “após início do tratamento”. Já nos animais do Grupo III (piodermite superficial) a coleta se deu nos momentos “antes da terapia”, 15, 30 ou 60 dias “após tratamento”.

5.5 TÉCNICAS LABORATORIAIS

O hemograma e as provas bioquímicas foram realizados em equipamentos automatizados (HORIBA ABX®, modelo ABC VET e LABMAX®) imediatamente após a coleta, de acordo com as técnicas estabelecidas e utilizadas no Serviço de

Laboratório Clínico do VCM do HOVET-FMVZ/USP. Foram realizados os seguintes exames: hemograma (eritograma e leucograma), contagem de plaquetas, dosagem sérica de creatinina, ureia, proteínas totais, albumina e enzimas alaninoaminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FA). A glicemia foi mensurada por meio de glicosímetro (ACCU-CHECK®).

5.6 CITOLOGIA E BACTERIOSCOPIA

O material para a avaliação cito e bacteriológica, realizado nos cães dos Grupos II e III, foi obtido por aspiração, com agulha fina, de vesículas, bolhas ou pústulas, por decalque em lâmina, quando do rompimento das coleções líquidas ou, ainda, pela fricção de zaragatoas estéreis umedecidas em solução salina estéril, por sobre as lesões. As lâminas, a seguir elaboradas, foram coradas por corante pan-óptico e analisadas em microscópio óptico de luz com objetiva de imersão. Buscaram-se (Figura 1) células inflamatórias, íntegras ou degeneradas, bactérias livres ou no interior de neutrófilos e macrófagos (PS) e, principalmente, células acantolíticas (PF), figura 2.

Figura 1 - Presença de bactérias, de configuração cocóide, em processo de fagocitose por neutrófilos e, ainda, bactérias dispostas no meio extracelular, de exame direto obtido de conteúdo pustular de cão com piodermite superficial. Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

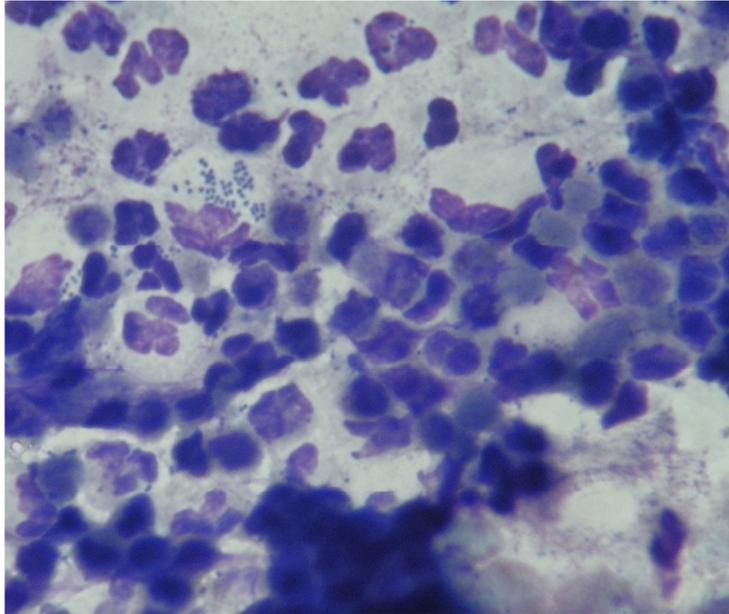
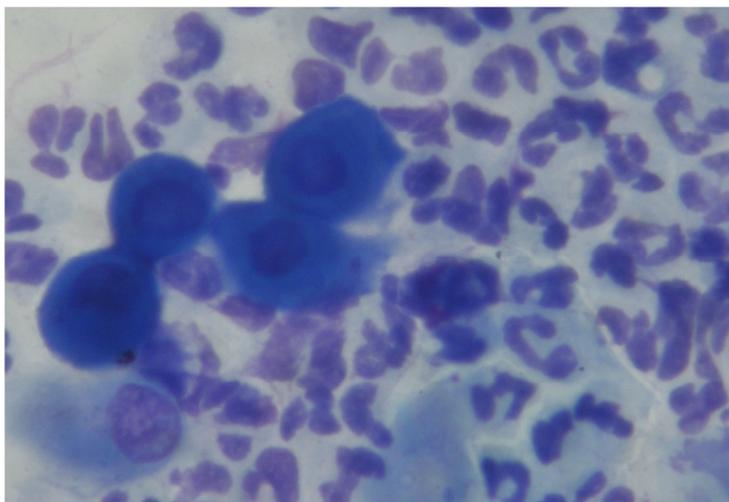


Figura 2 - Células acantolíticas entremeadas por neutrófilos, observadas no exame citológico de pústula de cão com pênfigo foliáceo. Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



5.7 EXAME PARASITOLÓGICO DO RASPADO CUTÂNEO

Todos os animais incluídos no projeto, nos Grupos II e III, foram, também, submetidos ao exame parasitológico de raspado cutâneo para descartarmos a eventual ocorrência de demodicose. O método consistiu na realização de raspado profundo de pele, até a ocorrência de sangramento capilar. O material coletado foi disposto em lâmina de microscopia acrescido de hidróxido de potássio 10%, recoberto por lamínula e posteriormente analisado em microscopia óptica de luz.

5.8 COLETA DE MATERIAL PARA CULTURA E ANTIBIOGRAMA

Nos animais, incluídos no Grupo III, procedeu-se a coleta de material para realização de cultura bacteriana, sucedida por antibiograma, segundo metodologia utilizada no Serviço de Laboratório Clínico do VCM do HOVET/FMVZ-USP, a partir de amostras obtidas das áreas lesadas, utilizando-se zaragatoas alginatadas estéreis que foram colocadas em embalagem contendo meio de transporte apropriado (Meio de Stuart).

As amostras foram semeadas em meios Ágar-sangue e Ágar-MacConkey, incubadas à 37°C por 24 horas, sucedida, então, pela leitura das placas. Os patógenos eventualmente presentes, nas placas, eram submetidos à provas específicas e, a seguir, realizada a identificação do gênero bacteriano.

O antibiograma foi procedido, de acordo com Método de Kirby-Bauer (MORRIS et al., 2006), utilizando-se discos com fármacos bactericidas (amoxicilina com clavulanato de potássio, ampicilina, cefalexina, cefovecina sódica, ceftiofur, enrofloxacina, gentamicina, norfloxacina) e bacteriostáticos (clindamicina, cloranfenicol, doxiciclina e sulfametoxazol com trimetoprim, também denominado cotrimoxazol), após a identificação do agente bacteriano.

5.9 BIÓPSIA E HISTOPATOLOGIA

Fragmentos de lesões tegumentares, dos animais incluídos nos Grupos II e III, foram obtidos por biópsia, incisional ou excisional, sob anestesia local ou geral. Os fragmentos colhidos foram acondicionados em solução aquosa de formaldeído a 10 % e encaminhados ao Laboratório Paulista de Dermatopatologia¹ para análise histopatológica. Foi colhido, ainda, um fragmento adicional de pele perilesional, a seguir acondicionado em Eppendorf, contendo meio de inclusão, congelado a 20°C negativos para posterior realização da IFD.

5.10 IMUNOFLUORESCÊNCIA DIRETA (IFD)

As reações da IFD dos animais, incluídos nos Grupos II e III, foram executadas no Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Nos animais com diagnose estabelecida de pêfigo foliáceo e piodermite superficial foi coletado, por meio de biópsia, um fragmento cutâneo perilesional, que serviu como substrato para a realização da IFD. Esse material foi armazenado em Eppendorf contendo meio de inclusão com ação crioprotetora² (álcool polivinil 10%, polietilenoglicol 5% e ingredientes não reativos 85%) em freezer a temperatura de 20°C negativos. O substrato congelado, em meio de inclusão crioprotetor, foi crio-seccionado à 20°C negativos, com espessura de quatro micras, em quadruplicata, dispostos sobre quatro lâminas silanizadas. Cada uma destas lâminas foi utilizada para avaliar, respectivamente, três diferentes classes de imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM) e um fator complemento canino (C3). Para cada corte, disposto nas lâminas, aplicavam-se os anticorpos primários anti-canino

¹ Laboratório Paulista de Dermatopatologia – Av. Brigadeiro Luís Antônio, 4315 – Jardim Paulista, São Paulo/SP – CEP:01401 002.

² Tissue-Tek O.C.T. Compound®. Frascos de 118 ml. Fabricado por Sakura Finetek U.S.A.

conjugados à fluoresceína FITC (anti-IgA, anti-C3 e anti-IgM, todos à diluição 1:40³ e anti-IgG⁴ à diluição de 1:20) em corante Azul de Evans, à diluição de 1:10. Os cortes permaneciam, então, com os seus respectivos conjugados durante um período correspondente a 30 minutos, em câmara úmida e escura, em temperatura ambiente, visando a formação dos imunocomplexos. Posteriormente, os cortes eram submetidos à lavagens com solução alcalina (pH= 7,5) TBS (tampão trisma base associada ao cloreto de cálcio), durante três ciclos de 10 minutos cada, visando maior exposição dos sítios antigênicos. Finalmente, uma gota de glicerina tamponada (pH= 9,0) foi instilada sobre cada corte do fragmento, com seus respectivos conjugados, objetivando aumentar a fluorescência da reação. Cobria-se o preparado com lamínula sendo submetido, finalmente, à leitura em microscópio de epiluminescência⁵.

5.11 IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)

Para a técnica de IFI utilizaram-se coxins palmo-plantares de caninos hígidos que vieram à óbito, no HOVET/FMVZ-USP, decorrente de acidente automobilístico ou por decurso natural de enfermidades sem caráter de quadro mórbido autoimune tegumentar ou sistêmico. O material foi coletado, logo após o óbito desses animais, com auxílio de *punch* de 5mm. Os coxins, que serviram de substrato para a reação de IFI, foram acondicionados em Eppendorf, com meio de Michel, armazenados à temperatura ambiente até o seu preparo, que não ultrapassou período de 48 horas. O substrato, em meio de Michel, foi lavado, em duas etapas sequenciais com duração de 15 minutos cada, com meio de lavagem. Após esse processo, o substrato foi preparado, em meio de inclusão, para ser a seguir crioseccionado à 20 graus negativos em criostato, tal como realizado na técnica de IFD. As etapas que compõem a metodologia da IFI são bastante similares àquelas da IFD, com apenas uma etapa inicial adicional que consiste na adição de soro dos cães penfigosos,

³ Anticorpos anti-IgA, anti-IgM e anti-C3 canino conjugado FITC, produzidos em cabra. Bethyl Laboratories, Inc. EUA.

⁴ Anticorpo anti-IgG canino conjugado FITC, produzido em coelho. Sigma-Aldrich. EUA.

⁵ Microscópio de epiluminescência da marca Zeiss, modelo HBO 50.

diluídos em solução tampão TBS, na diluição inicial de 1:10, seriada à razão dois, até sua total negatificação sobre as lâminas silanizadas contendo o substrato. Após um período de 30 minutos de incubação, procedia-se lavagem de 20 minutos em solução tampão TBS. Na sequência adicionava-se o conjugado (anti-imunoglobulina canina-IgG)⁶ aos substratos em concentração 1:25 (1µl conjugado para 25µl de corante Azul de Evans, diluído 1:20), as etapas subsequentes eram idênticas aquelas da metodologia da IFD.

5.12 AVALIAÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA

As concentrações de PCr nos Grupos I, II ou III foram determinadas, a partir de soros congelados a 80°C negativos, utilizando-se teste comercial, desenvolvido na Irlanda (PHASETM RANGE Canine C-Reactive Protein Assay, Tridelta Development Limited).

Trata-se de um imunoenensaio, pela técnica de ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), que permite analisar 42 amostras, afora seis controles, por placa, contendo 96 micropoços revestidos, todos em duplicata.

O soro dos animais, incluídos no projeto, eram previamente descongelados em temperatura ambiente e diluídos na proporção 1:500 (10µL de soro homogeneizado em 5 mL de tampão diluente). Após a diluição, alíquotas de 100µL desta solução eram aplicadas em cada poço da placa e incubadas em 37°C por 15 minutos. Removia-se o excesso de amostra com solução tampão de lavagem, em lavadora automática (quatro ciclos de lavagem). Acrescia-se, então, 100µL de conjugado (anticorpo anti-proteína-C-reativa canina marcado com *Horse Radish Peroxydase* – HRP), sucedendo-se nova incubação por 15 minutos à 37°C. Uma nova lavagem era realizada e após isso, 100µL de substrato tetrametilbenzidina (TMB) era colocado em cada um dos poços para promover reação colorimétrica com

⁶ Fluorescein-Labeled Antidog To Dog IgG (H+L). Kirkegaard& Perry Laboratories, Inc. USA.

peroxidase, à temperatura ambiente, também por 15 minutos. Por fim, 100 μ L de solução de bloqueio era disposta em cada poço com o fito de encerrar a reação.

Procedia-se a leitura da absorbância das amostras à 450nm em leitora ELISA Biotek ELX808, associada ao *software* de análise Gen5 (Biotek). A média entre as absorbâncias, proporcionadas por cada amostra, era obtida e subtraía-se o valor de absorbância encontrado pela amostra dita controle nulo, desprovida de Proteína C Reativa. Um gráfico de dispersão com as absorbâncias dos controles e a respectiva concentração de Proteína C Reativa (nulo, 7,5ng/mL, 15ng/mL, 30ng/mL, 60ng/mL e 120ng/mL) permitiu delinear uma curva de calibração para interpor as absorbâncias das amostras. Para cada placa utilizada construía-se uma curva de calibração, não havendo o emprego da mesma curva para ensaios realizados em dias diferentes.

Finalmente, multiplicava-se o valor oriundo do gráfico pelo fator de diluição da amostra, ou seja, por 500. As amostras que excediam o valor do controle máximo sofriam nova diluição e posterior reanálise na diluição de 1:2000 ou 1:4000. Aquelas amostras que tornavam-se indetectáveis eram, também, novamente diluídas e reanalisadas nas proporções de 1:20 ou 1:100, no intuito de atingirem absorbância detectável pelo teste. Do valor obtido pela multiplicação pelo fator de diluição fez-se uma divisão por 1000 para converter ng/mL para μ g/mL.

5.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Realizou-se análise estatística descritiva, com medidas de posição e dispersão. Determinou-se frequências para variáveis categóricas, média, mediana, moda e os percentis 25 (P_{25}) e 75 (P_{75}) para variáveis contínuas. Os dados foram testados para normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk ($p \geq 0,05$). Utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis para comparações da PCr nos Grupos controle (I), PF(II) e PS(III), com pós teste de Dunn. Realizou-se o teste de análise de variância (Friedman) para medidas repetidas de PCr ao longo do tempo nos animais com PF, com pós teste de Dunn. Foram consideradas diferenças quando $p < 0,05$.

Uma curva ROC (*receive operator characteristic curve*) foi construída para determinar qual valor de corte de Proteína C Reativa poderia ser utilizado para diagnóstico de cães com pênfigo foliáceo.

Com a finalidade de avaliar a validade do teste na identificação dos cães penfigosos, foram calculados: probabilidade pré-teste, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN), a razão de verossimilhança, chances pré-teste e pós-teste, probabilidade pós-teste e acréscimo na capacidade diagnóstica (%) com a utilização da Proteína C Reativa. Considerou-se os valores de corte de PCr com base nos valores obtidos pela curva ROC.

Utilizou-se o Teste exato de Fisher para comparar a sensibilidade e especificidade da IFD, em relação ao exame histopatológico (padrão-ouro) e da IFI também perante a histopatologia. Foi utilizado, ainda, o Índice Kappa (*k*) para expressar o grau de concordância dos resultados da IFD com a histopatologia e os da IFI, também, com a histopatologia, com valor de significância $p < 0,05$. O quadro 1 representa os valores do *k* e suas respectivas interpretações

Quadro 1 - Escala de concordância do índice Kappa

Valores do Kappa	Concordância
-1-0	Nenhuma
0-0,19	Insignificante
0,20-0,39	Fraca
0,40-0,59	Moderada
0,60-0,79	Substancial
0,80-1,00	Perfeita

Fonte: LANDIS; KOCH, 1977

O *software* utilizado para as análises estatísticas foi o Graphpad versão 5.0 para Windows (San Diego, California, USA).

6 RESULTADOS

Os 61 cães recrutados provieram tanto de canis, de residências, como do atendimento clínico rotineiro do Serviço de Dermatologia do VCM e HOVET da FMVZ/USP. Desta amostragem dois dos animais foram excluídos, o primeiro dentre os casos de pressuposta piodermite superficial, em face ao resultado da histopatologia cutânea, confirmado como quadro bacteriano mas secundário à mastocitoma cutâneo. O outro, de início com indícios de tratar-se de PF, não se obteve a necessária confirmação histológica, exame esse, como já referido, reputado como padrão-ouro. Portanto, incluíram-se 59 casos distribuídos nos respectivos grupos, ou seja, Grupo I (controle), composto por 31 animais hígidos, Grupos II (PF) e III (PS), com 14 cães cada. No quadro 2, dispõe-se os 59 animais incluídos no estudo nos Grupos I (controle), II (PF) e III (PS), segundo a identificação, definição racial e faixa etária.

Quadro 2 – Animais incluídos no estudo, contituíntes dos Grupos I (controle), II (pênfigo foliáceo) e III (piodermite superficial) segundo os dados de identificação, de definição racial, do sexo e de faixa etária. HOVET/FMVZ-USP (2013-2015). São Paulo – 2015

(continua)

Número	Prontuário	Nome	Definição Racial	Sexo	Idade (anos)	Grupo
1	223887	Nina	Poodle	F	7	I
2	234818	Fifi	Yorkshire	F	6	I
3	194289	Toddy	SRD	M	5	I
4	189394	Vicky	Poodle	F	9	I
5	235107	Angel	Yorkshire	F	7	I
6	235182	Kate	Poodle	F	5	I
7	234496	Calvin	Podle	M	5	I
8	235966	Zurich	SRD	M	5	I
9	235965	Cleo	SRD	F	5	I
10	235967	Nero	SRD	M	5	I
11	236355	Marie	Shih-Tzu	F	5	I
12	236687	Quatro	SRD	F	7	I
13	236688	Cinco	SRD	F	8	I

(continua)

Número	Prontuário	Nome	Definição Racial	Sexo	Idade (anos)	Grupo
14	236689	Seis	SRD	F	7	I
15	236684	Um	SRD	F	6	I
16	236813	Sete	SRD	F	7	I
17	236815	Oito	SRD	M	7	I
18	236816	Nove	SRD	F	7	I
19	236818	Décimo	SRD	F	8	I
20	237082	Quatorze	SRD	M	5	I
21	237083	Quinze	SRD	F	8	I
22	237080	Doze	SRD	F	7	I
23	235689	Bernardo	Poodle	M	7	I
24	238814	Charlie	Cairn terrier	M	5	I
25	238812	James 2	Cairn terrier	M	5	I
26	224417	Preto	Teckel	M	12	I
27	239563	Artemis	Whippet	F	6	I
28	239508	Luna	SRD	F	6	I
29	233435	Lillica	Poodle	F	11	I
30	239930	Mel	Teckel	F	8	I
31	240048	Abby	Yorkshire	F	6	I
32	233357	Cherry	Teckel	F	6	II
33	229971	Bisteca	SRD	M	3	II
34	239949	Nina	Poodle	F	5	II
35	236798	Cherrie	Poodle	F	12	II
36	236099	Luna	SRD	F	9	II
37	228625	Lilica	SRD	F	7	II
38	230150	Bob	Poodle	M	3	II
39	241509	Jully	PitBull	F	12	II
40	234534	Lessy	Cocker Spaniel	F	7	II
41	238404	Nega	SRD	F	2	II
42	240948	Nyna	Teckel	F	9	II
43	215559	Tavinho	SRD	M	11	II

(conclusão)

Número	Prontuário	Nome	Definição Racial	Sexo	Idade (anos)	Grupo
44	239706	Luna	Teckel	F	9	II
45	238544	Thor	Shih-Tzu	M	14	II
46	221935	Costelinha	Maltês	F	4	III
47	240806	Koda	SRD	M	1	III
48	244846	Amora	Pug	F	2	III
49	244803	Ana Julia	Buldogue Francês	F	2	III
50	240182	Jackie	Scottish Terrier	M	2	III
51	211634	Magoo	Shar-pei	M	5	III
52	243890	Toby	SRD	M	5	III
53	243353	Gaia	SRD	F	1	III
54	236893	Meg	Pug	F	6	III
55	244580	Fox	Yorkshire	M	8	III
56	244086	Kelly	Teckel	F	9	III
57	240637	Meg	SRD	F	8	III
58	234802	Polly	Poodle	F	10	III
59	243020	Francesca	Buldogue Francês	F	1	III

M: macho, F: fêmea, SRD: sem raça definida

Todos os animais incluídos no Grupo I (controle) não apresentaram quaisquer manifestações clínicas que pudessem ser evidenciadas por meio dos exames físico e complementares, desta maneira, não foram, por óbvio, evidenciadas lesões tegumentares e alterações no hemograma e provas bioquímicas. Os cães do Grupo III (PS) também não apresentaram alterações hematológicas e bioquímicas. No Grupo II (PF) pôde-se evidenciar leucocitose em 35% (5/14) dos animais e anemia, normocítica e normocrômica, em 43% (6/14) dos cães. O exame parasitológico do raspado cutâneo, dos 28 animais incluídos nos Grupos II e III, foi negativo, descartando-se uma possível demodicose associada aos quadros de PF e PS.

Dos 59 cães incluídos no estudo, 40 eram fêmeas (67,8%) e 19 machos (32,2%), com idade média de seis anos ($\pm 2,8$). Os cães, sem raça definida (SRD),

representaram 42,4% do total. Já, daqueles com perfeita definição racial, evidenciou-se que o Poodle foi o mais prevalente (16,9%), seguida do Teckel (10,1%), Yorkshire (6,8%), Buldogue Francês, Cairn Terrier, Pug, Shih-Tzu (3,4% cada) e Whippet, PitBull, Maltês, Cocker, Scottish Terrier e Sharpei (1,7% cada).

Houve diferença estatística entre o Grupo III (PS) e os Grupos I (controle) e II (PF) quanto a idade, no entanto, não houve tal diferença com relação ao gênero. As variáveis, idade e sexo, dos animais encontram-se resumidos na tabela 1. A casuística referente ao quadro lesional e a topografia das lesões, nos animais dos Grupos pênfigo foliáceo e piodermite superficial, estão apresentados na tabela 2. O gráfico 1 representa a ocorrência de prurido nos dois Grupos (II e III) segundo dados de anamnese.

Tabela 1 – Variáveis (idade, em anos, e sexo) dos 59 cães distribuídos segundo o Grupo, quais sejam o Grupo I (controle), Grupo II (pênfigo foliáceo) e Grupo III (piodermite superficial). HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo – 2015

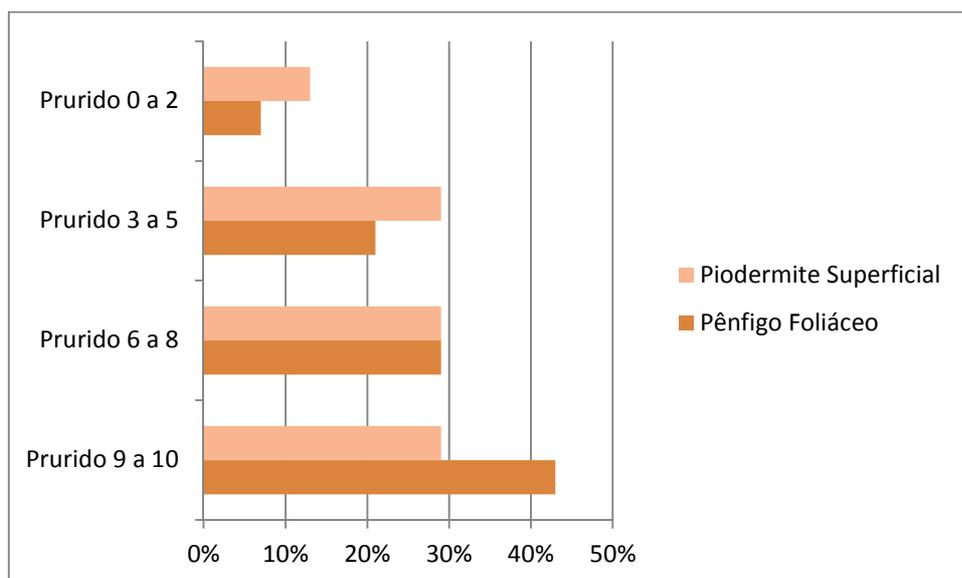
	I CONTROLE	II PÊNFIGO FOLIÁCEO	III PIODERMITE SUPERFICIAL
Nº	31	14	14
Idade	6,5 (\pm 1,7)	8,0 (\pm 3,7)	4,5(\pm 3,2)
Idade mínima	5	2	1
Idade máxima	12	14	10
Sexo (F:M)	21:10	10:4	9:5

F: fêmea; M:macho

Tabela 2 - Casuística dos Grupos pênfigo foliáceo (II) e piodermite superficial (III) segundo o quadro lesional tegumentar e a topografia. Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

	PÊNFIGO FOLIÁCEO	PIODERMITE SUPERFICIAL
Total	14	14
Lesões		
Alopecia	4 (28%)	1 (7%)
Colarinhos epidérmicos	12 (85%)	13 (92%)
Crostas melicéricas	14 (100%)	10 (71%)
Eritema	8 (57%)	4 (28%)
Escamas	6 (42%)	4 (28%)
Hiperqueratose	4 (28%)	-
Pústulas	11 (78%)	11 (78%)
Topografia		
Abdominal	11 (78%)	13 (92%)
Axilar	11 (78%)	3 (21%)
Cervical	4 (28%)	4 (28%)
Coxins	4 (28%)	-
Dorsal	11 (78%)	14(100%)
Pavilhão auricular	9 (64%)	-
Periocular	5 (35%)	-
Ponte nasal	4 (28%)	-
Vulva/prepúcio	2 14%)	-

Gráfico 1 - Intensidade (%) do prurido nos animais com pênfigo foliáceo (Grupoll) e piodermite superficial (Grupolll). Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



Dentre as lesões cutâneas elementares apresentadas, quando do diagnóstico nos animais com PF e PS, destacam-se aquelas relacionadas as perdas e reparações teciduais (crostas e colarinhos epidérmicos) e as coleções líquidas (pústulas). As pústulas, consideradas que são lesões características destas duas enfermidades, foram encontradas em 78% dos animais com PF e PS (Figuras 3 e 4). Já, as crostas, de aspecto no geral melicérico, foram aquelas observadas em todos os animais penfigosos e em 71% daqueles com piodermite (Figura 5).

Figura 3 - Cão 36 ("Luna") com pênfigo foliáceo. a) Eritema, pústulas e lesões em colarinho em região abdominal; b) Detalhe das lesões pustulares e em colarinho em região abdominal. Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

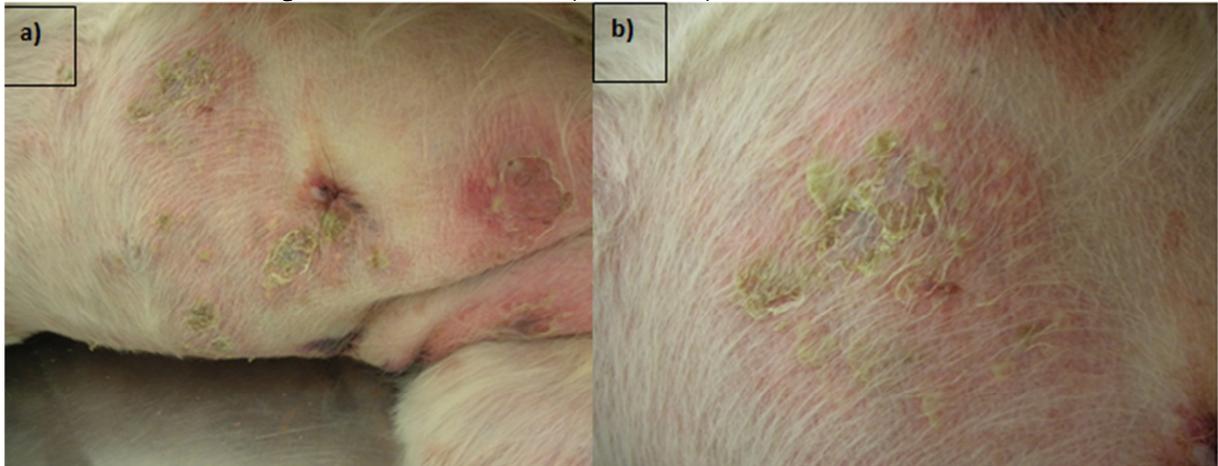
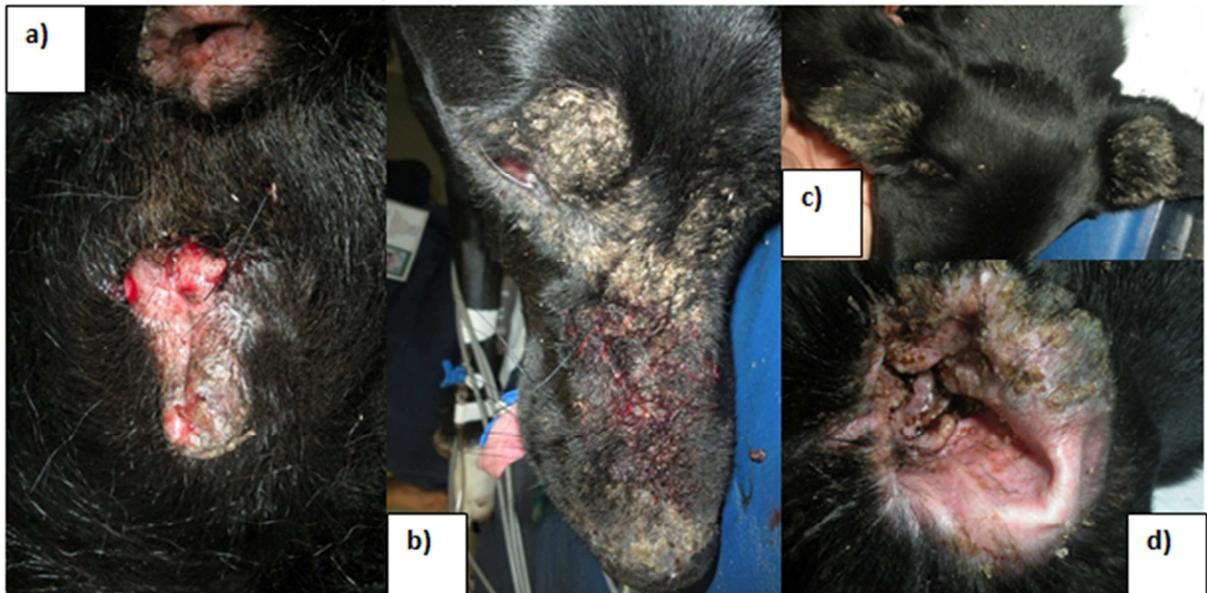


Figura 4 - Animal 46 ("Costelinha") com piодermite superficial. a) Pápulas eritematosas e pústulas em região abdominal ventral. b) Crostas melicéricas, eritema e pústulas em região tóraco-abdominal ventral. Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



Figura 5 - Animal 41 ("Nega") com pênfigo foliáceo. a) Edema, eritema encimados por crostas em região vulvar; b) Edema, crostas melicéricas perioculares e em ponte nasal, c e d) Crostas e pústulas em região medial de pavilhões auriculares. Serviço de Dermatologia HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



Para acompanhamento dos casos penfigosos e avaliação de sua evolução clínica, com observação da piora ou melhora das lesões cutâneas, utilizou-se o PEFESI. Os dados obtidos pela avaliação clínica por meio do PEFESI, os títulos da imunofluorescência indireta e os valores de Proteína C Reativa obtidos, para cada um dos 14 animais do Grupo II (PF), nos retornos aprazados, estão dispostos no quadro 3 e nos gráficos de 2 a 15. Infelizmente, alguns animais não compareceram, em todos os retornos agendados e, portanto, não dispõe da totalidade dos dados.

Todos os cães, incluídos no Grupo III (PS), foram devidamente avaliados por escala numérica variando de 1 e 3, para aferir a evolução sintômato lesional após instituição da terapia. Considerou-se: 1- como resolução; 2- como melhora e 3- como inalteração do quadro. No primeiro retorno, aos 15 dias, pós início de antibioticoterapia, todos os animais apresentaram evidente melhora. Todos, com exceção feita ao animal de número 54 (Meg), evoluíram com resolução completa do quadro, em 30 dias. O cão 54, aos 30 dias de terapia apresentou melhora do quadro, porém apenas com 60 dias houve plena remissão das lesões tegumentares. As figuras 6 a 11 permitem evidenciar a evolução clínica de alguns dos animais dos Grupos II e III após instituição de protocolo de terapêutico.

Quadro 3 – Caracterização dos animais incluídos no Grupo II (pênfigo foliáceo), segundo os respectivos números de reavaliações, escore do PEFESI, títulos séricos obtidos na IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$). Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

(continua)

	Dia				
	0	15	30	60	90
N° 32(Cherry)					
PEFESI	78	20	25	40	22
Título da IFI	640	80	-	-	-
PCr	35,5	1,9	7,2	11,4	3,3
N° 33 (Bisteca)					
PEFESI	34	20	5	5	13
Título da IFI	160	40	20	-	-
PCr	41,1	4,9	1,5	1,9	4,0
N° 34(Nina)					
PEFESI	14	2	0	5	...
Título da IFI	160	40	20	40	...
PCr	8,1	0,2	0,2	0,2	...

(continuação)

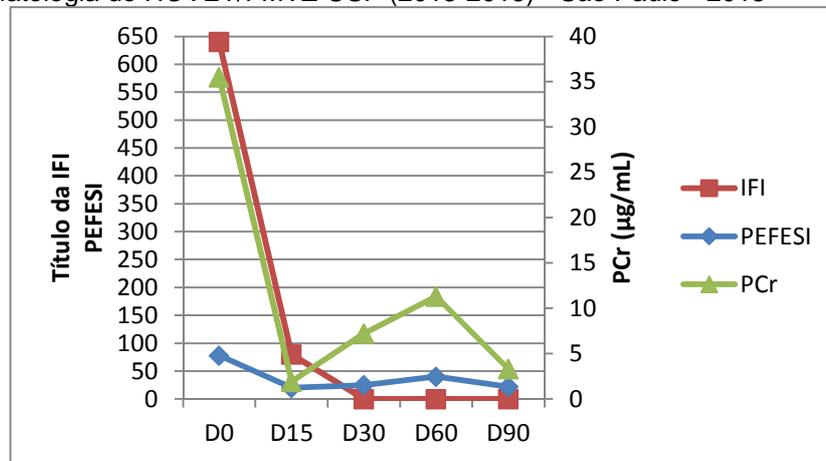
	Dia				
	0	15	30	60	90
N° 35 (Cherrie)					
PEFESI	36	10	10	10	...
Título da IFI	320	40	40	80	...
PCr	16,3	0,5	0,5	0,5	...
N°36 (Luna)					
PEFESI	97	39	20	10	5
Título da IFI	40	20	-	-	-
PCr	139,9	0,3	0,3	0,3	0,7
N°37 (Lilica)					
PEFESI	54	5	...
Título da IFI	80	-	...
PCr	28,7	0,3	...
N°38 (Bob)					
PEFESI	65	20	40	10	...
Título da IFI	80	-	10	0	...
PCr	124,1	2,4	105,5	1,8	...
N°39 (Jully)					
PEFESI	210	200	190
Título da IFI	320	10	10
PCr	144,8	180,8	99,7
N°40 (Lessy)					
PEFESI	41	12	5	0	0
Título da IFI	80	20	-	-	-
PCr	3,7	0,4	0,2	0,2	0,3
N°41(Nega)					
PEFESI	60	22	15	9	6
Título da IFI	320	80	40	20	40
PCr	176,8	4,8	0,5	0,7	0,2
N°42 (Nyna)					
PEFESI	104	30	10	30	160
Título da IFI	160	40	20	-	40
PCr	29,7	0,9	0,3	1,4	24,6
N°43 (Tavinho)					
PEFESI	42	13	9	0	0
Título da IFI	80	80	-	-	40
PCr	6,8	1,6	1,6	1,8	1,7
N°44 (Luna)					
PEFESI	52	9	2	0	0
Título da IFI	80	40	-	-	-
PCr	39,3	0,1	0,08	0,08	0,1

(conclusão)

	Dia					
	0	15	0	15	0	15
N°45 (Thor)						
PEFESI	90	12	15	14	30	
Título da IFI	40	10	-	-	-	
PCr	54,7	1,5	4,7	4,9	149,9	

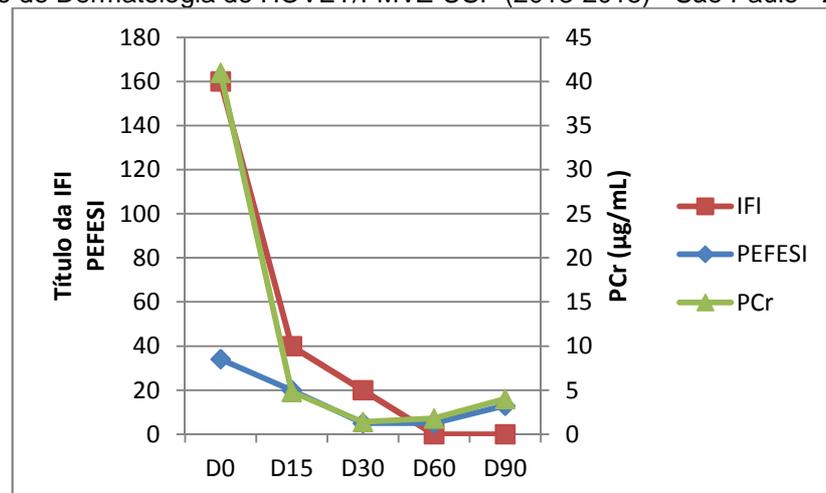
-:negativo; ... dado inexistente

Gráfico 2 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr (µg/mL) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 32 (Cherry), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



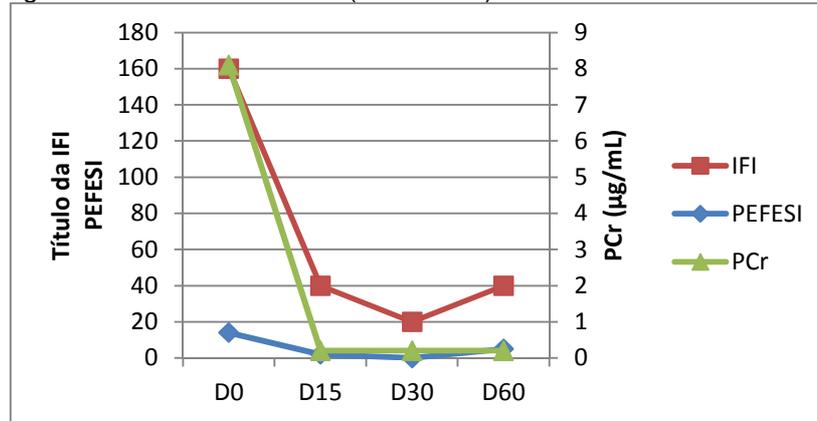
D: dia

Gráfico 3 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr (µg/mL) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 33 (Bisteca), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



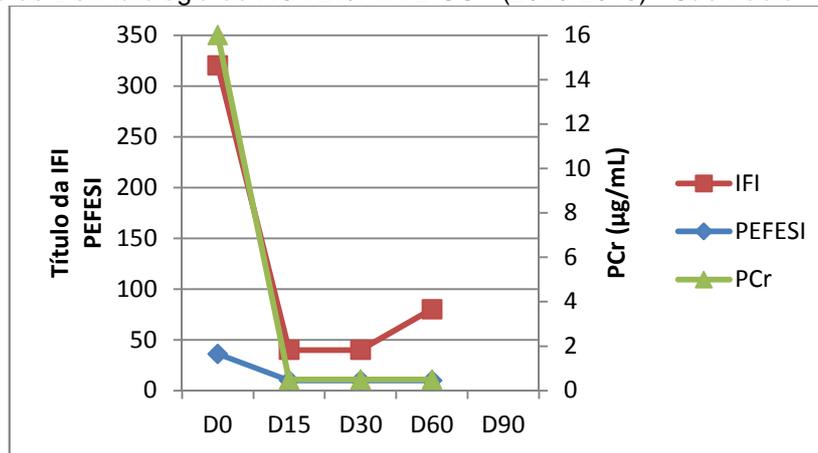
D: dia

Gráfico 4- Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 34 (Nina), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



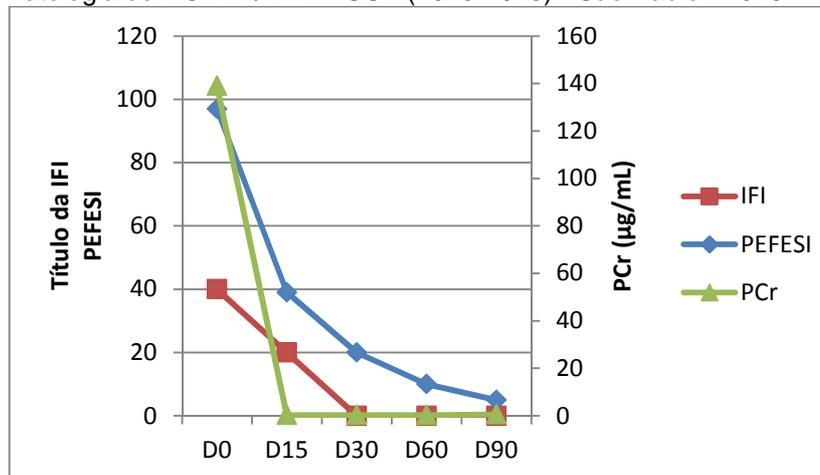
D: dia

Gráfico 5 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 35 (Cherrie), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



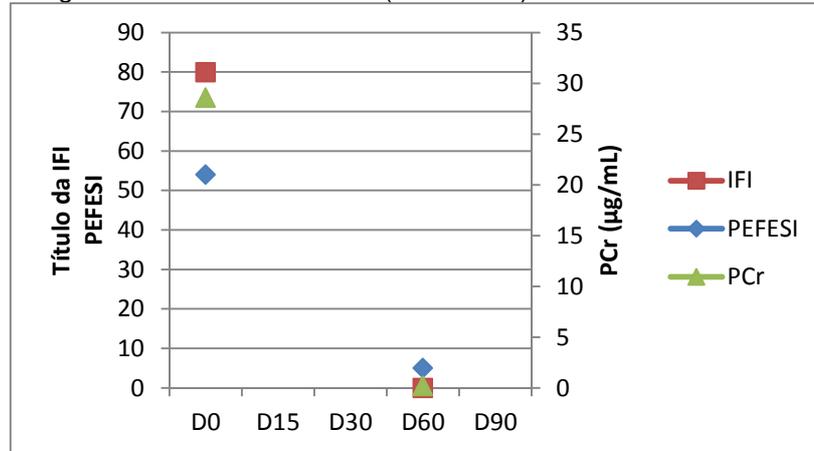
D: Dia

Gráfico 6 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 36 (Luna), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



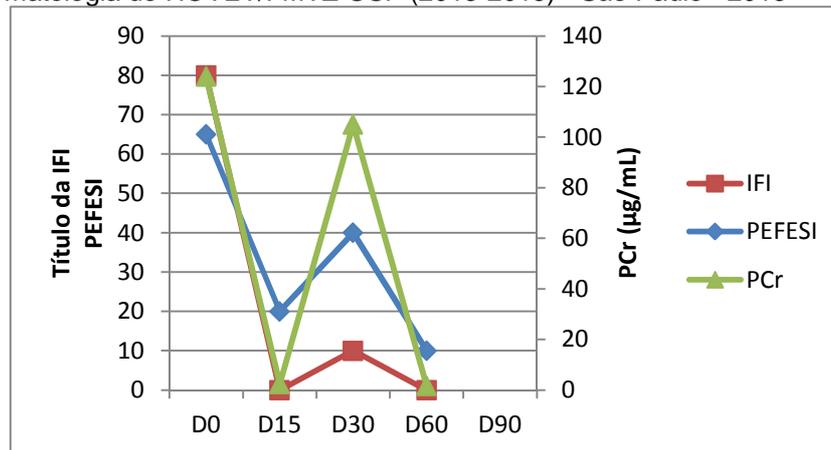
D: Dia

Gráfico 7 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 37 (Lilica), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



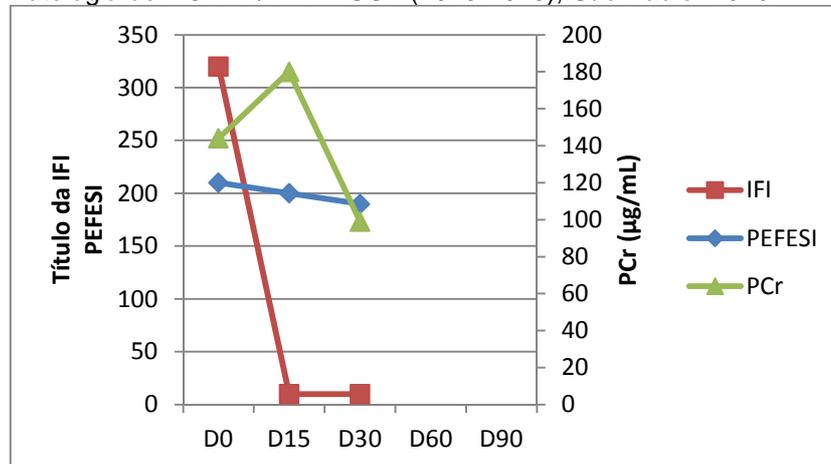
D: Dia

Gráfico 8 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 38 (Bob), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



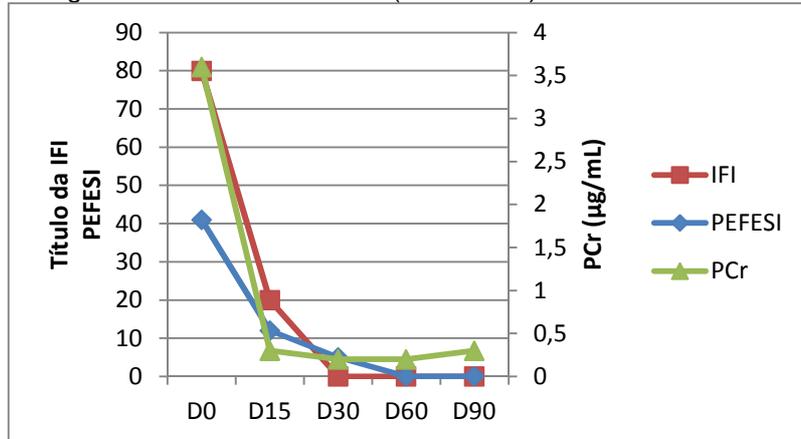
D: Dia

Gráfico 9 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 39 (Jully), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015), São Paulo - 2015.



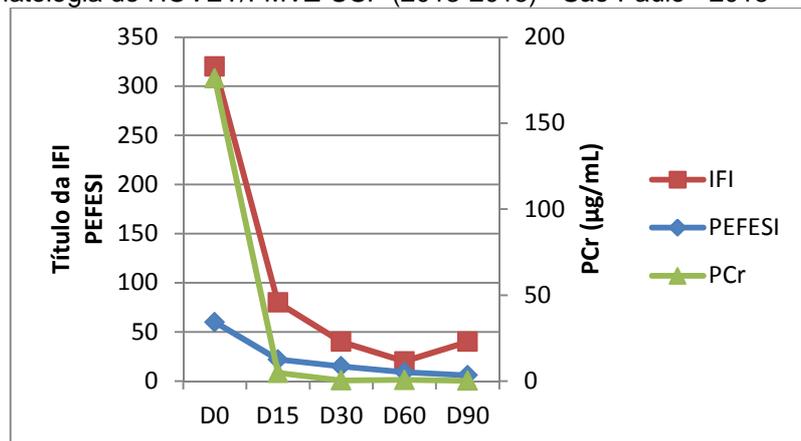
D: Dia

Gráfico 10 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 40 (Lessy), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



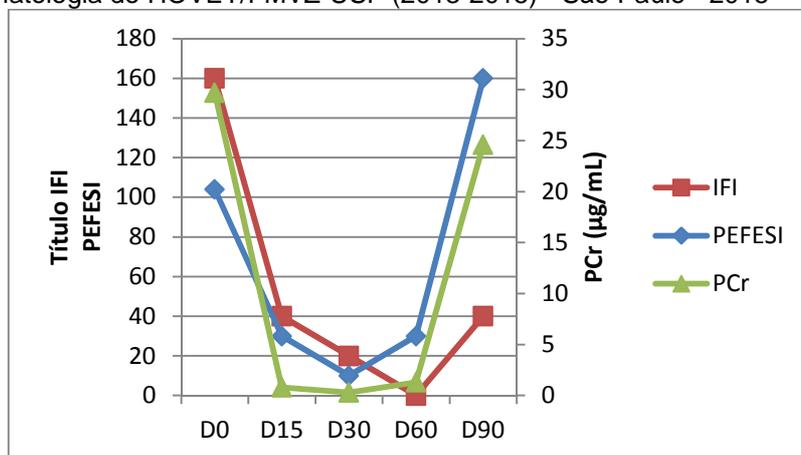
D: Dia

Gráfico 11 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 41 (Nega), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



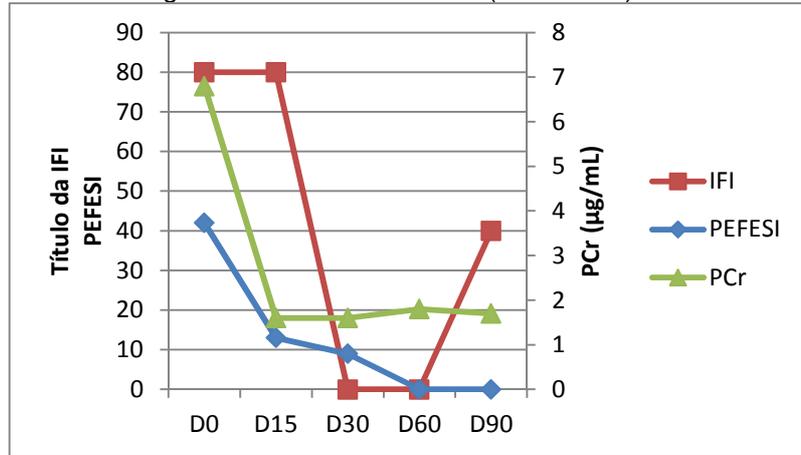
D: Dia

Gráfico 12 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 42 (Nyna), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



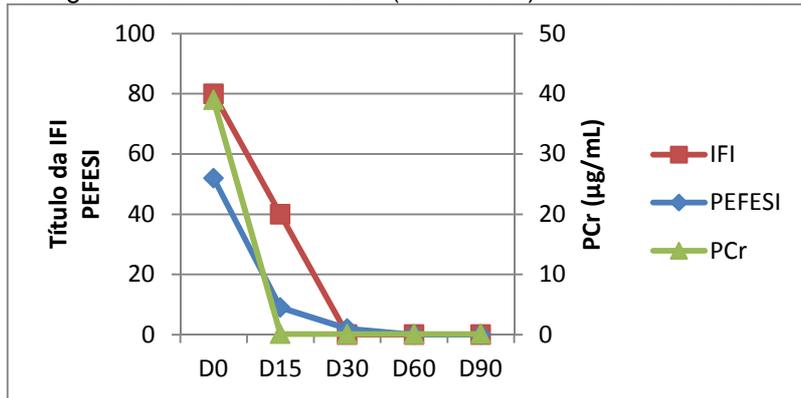
D: Dia

Gráfico 13 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n° 43 (Tavinho), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



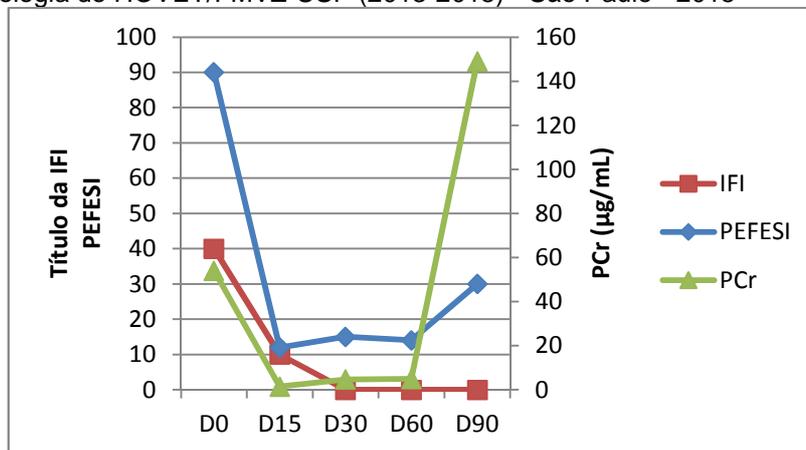
D: Dia

Gráfico 14 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr ($\mu\text{g/mL}$) no decorrer do seguimento clínico do animal n°44 (Luna), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



D: Dia

Gráfico 15 - Nível de atividade do PF segundo o PEFESI, títulos da IFI e valores de PCr no decorrer do seguimento clínico do animal n° 45 (Thor), pertencente ao Grupo II. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



D: Dia

Figura 6 - Animal 42("Nyna") acometido pelo pênfigo foliáceo em diferentes momentos: a) dia 0, com lesões alopecicas, crostas, colarinhos epidérmicos, pápulas e pústulas disseminados; b) 30 dias após início da imunossupressão com prednisona, flagrante melhora do quadro com remissão das lesões; c) 90 dias após início da terapia com recidiva e agravamento do quadro penfigoso. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

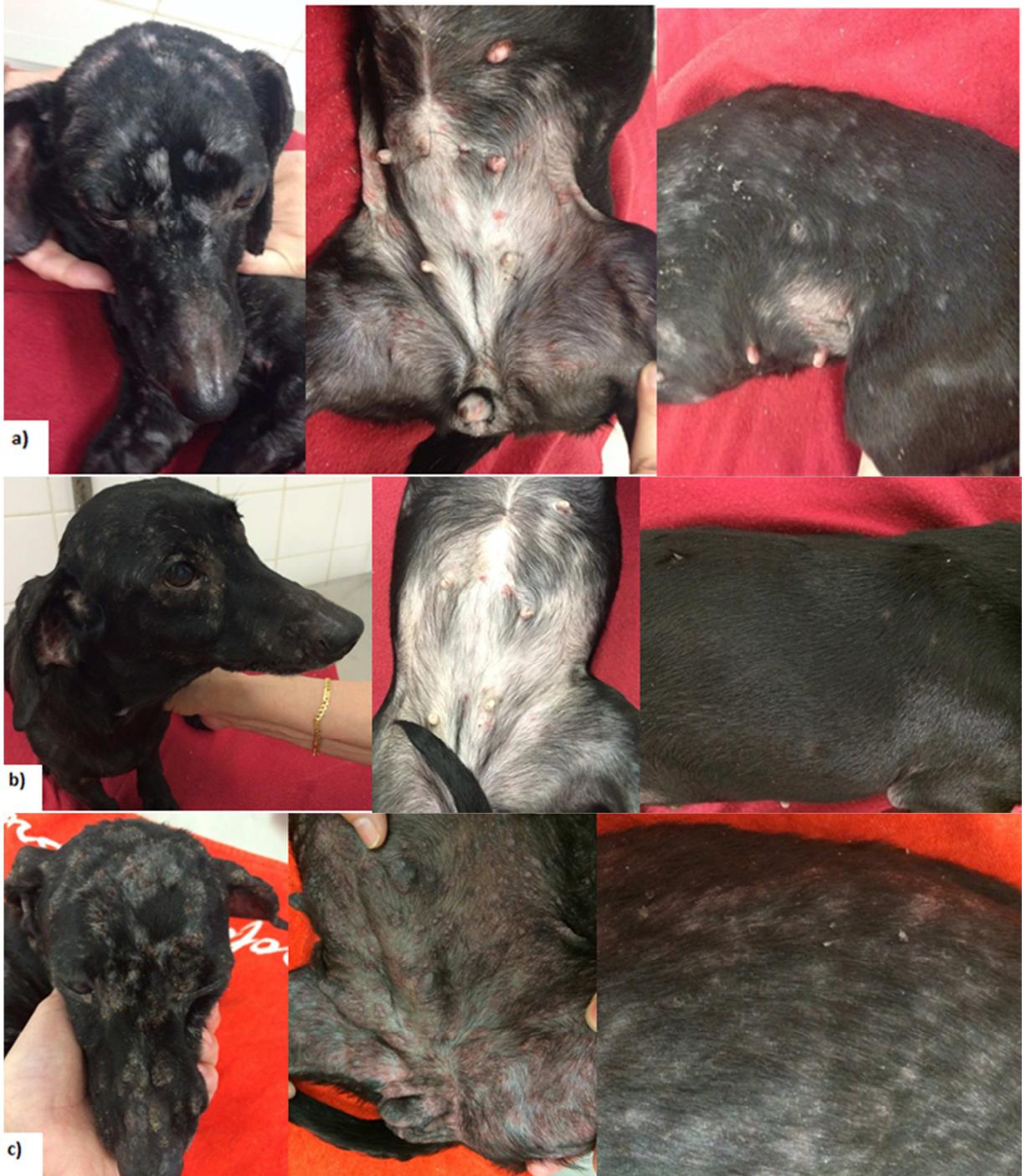


Figura 7 - Animal 34 ("Nina") acometido pelo pênfigo foliáceo em quatro diferentes momentos: a) dia 0, quando do diagnóstico, com alopecia, eritema e encimados por crostas melicéricas em plano e ponte nasal, concomitante leucodermia, em espelho nasal; b) 15 dias após início da imunossupressão com prednisona, melhora do quadro com remissão parcial das lesões; c) 30 dias com dose imunossupressora de prednisona, evidente involução lesional; d) 60 dias de terapia, após redução da corticoterapia, surgimento de eritema encimado por algumas crostas. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



Figura 8 - Animal 44("Luna") acometido pelo pênfigo foliáceo em dois diferentes momentos: a) dia 0, quando do diagnóstico, com alopecia, crostas melicéricas e colarinhos epidérmicos em região lombo-sacra e cervical ventral; b) 90 dias após início da imunossupressão com prednisona, melhora evidente do quadro com resolução das lesões. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

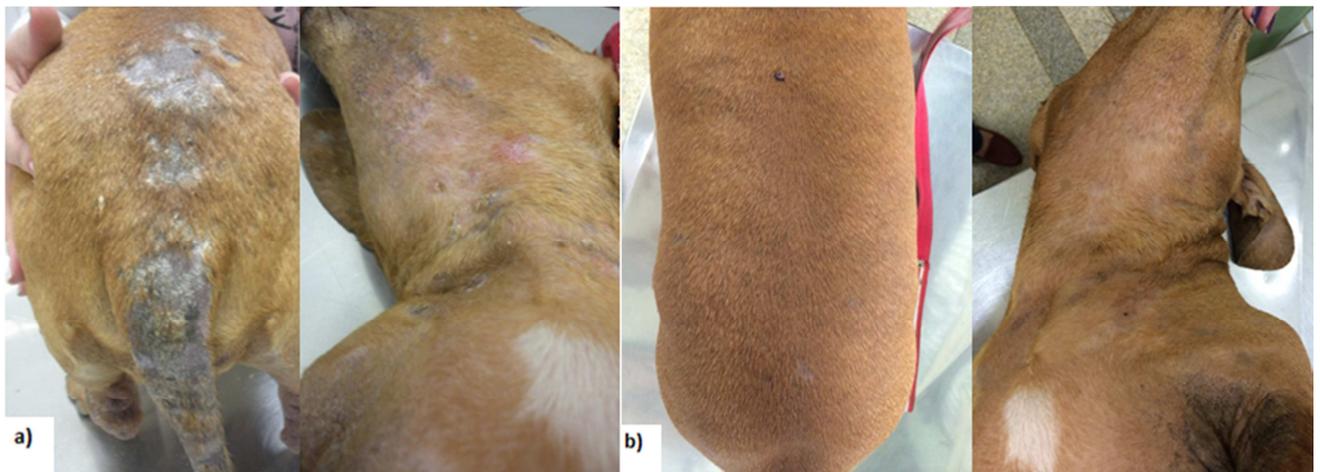


Figura 9 - Animal 57 ("Meg") com piodermite superficial em dois diferentes momentos: a) dia 0, quando do diagnóstico, com áreas circulares de alopecia, colarinhos epidérmicos disseminados e escamas furfuráceas e micáceas; b) 30 dias após início da antibioticoterapia, com resolução plena do quadro lesional. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

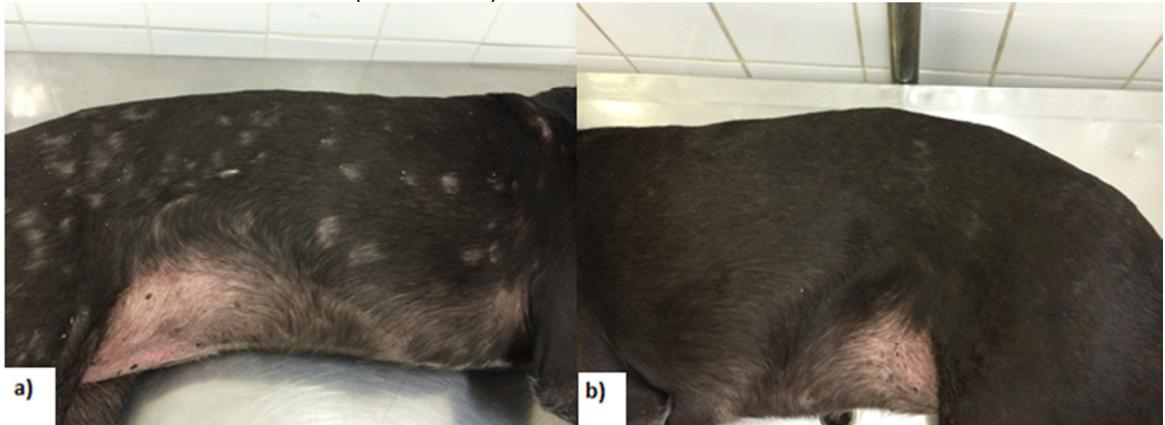


Figura 10 - Animal 58 ("Polly") com piodermite superficial em dois diferentes momentos: a) dia 0, quando do diagnóstico, com hipotricose, colarinhos epidérmicos, pápulas e crostas melicéricas em região abdominal; b) 30 dias após início da antibioticoterapia, com resolução plena do quadro lesional. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

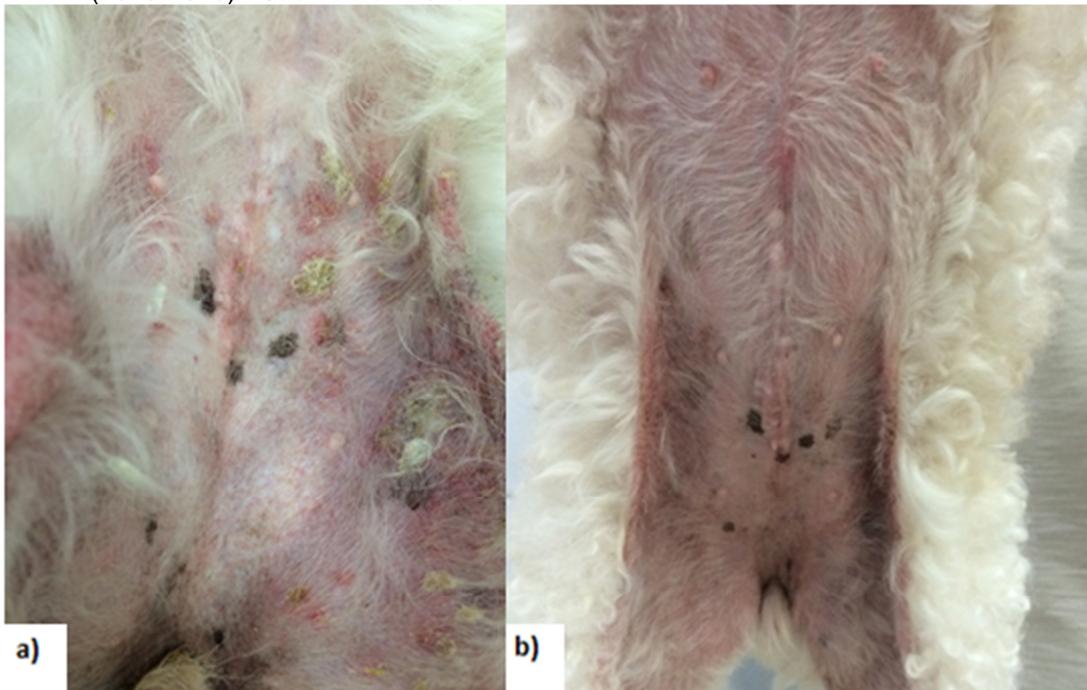
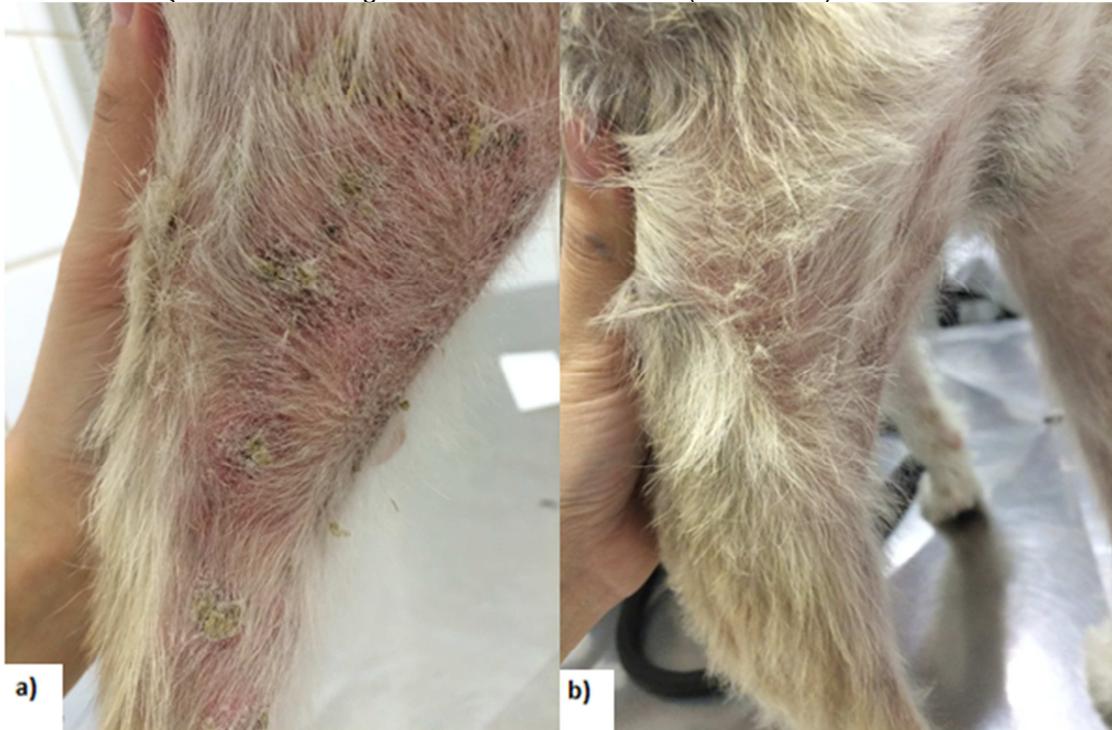


Figura 11 - Animal 52 (“Toby”) com piodermite superficial em dois diferentes momentos: a) dia 0, quando do diagnóstico, com eritema, rarefação pilosa e colarinhos epidérmicos encimados por crostas melicéricas em região medio-caudal de membro pélvico esquerdo; b) 30 dias após início da antibioticoterapia, com total resolução do quadro. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



O cabal diagnóstico, dos animais incluídos nos Grupos II e III, foi estabelecido pela somatória e análise dos dados de resenha, anamnese, exame físico e dermatológico e, confirmado pelos resultados do histopatológico. Desta forma, os 14 animais do Grupo II, com PF, apresentaram acantólise subcórnea, presença de grande quantidade de leucócitos neutrófilos, células acantolíticas e ausência de bactérias. Já, os cães com piodermite superficial apresentaram, em sua maioria, epiderme dissociada por espongiose com exocitose de leucócitos neutrófilos, ausência de células acantolíticas e, eventualmente, evidenciaram-se colônias bacterianas cocóides em alguns dos exames realizados. Além do exame histopatológico todos os animais do Grupo III (PS) foram submetidos à cultura bacteriana sucedida pelo antibiograma. Em todos os caninos desse Grupo III houve crescimento de bactérias do gênero *Staphylococcus spp.*, que se mostraram sensíveis tanto à cefalexina como à amoxicilina com clavulanato de potássio ao antibiograma.

Os cães, incluídos nos Grupos II e III, foram submetidos à avaliação imunopatológica a partir de fragmentos cutâneos de material biopsiado (IFD) e de

soros sanguíneos colhidos (IFI). Aqueles animais com piodermite superficial (Grupo III) apresentaram valores negativos tanto na IFD, para todos os anticorpos testados, quais sejam imunoglobulinas (IgA, IgG, IgM) e um fator complemento canino (C3), quanto na IFI. Os resultados dos cães penfigosos encontram-se, resumidamente, dispostos no quadro 4 e tabela 3. Não foi possível realizar a IFD dos animais acometidos pelo PF de números 37 (“Lilica”) e 38 (“Bob”), pois não foram coletados fragmentos cutâneos adequados.

Os valores de PCr, os resultados da IFD e IFI dos animais incluídos no Grupo III (piodermite superficial) encontram-se dispostos no apêndice B.

Quadro 4 - Resultados da reação de imunofluorescência direta em biópsia cutânea perilesional de caninos com pênis foliáceo. Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia da FM-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

N°	Nome	anti-IgA	anti-C3	anti-IgM	anti-IgG
32	Cherry	Negativo	Negativo	Negativo	Fluorescência intercelular fraca e não homogênea
33	Bisteca	Negativo	Fluorescência intercelular moderada	Negativo	Fluorescência intercelular fraca e não homogênea
34	Nina	Negativo	Fluorescência intercelular intensa e focal ZMB: fluorescência moderada e homogênea	ZMB: fluorescência focal fraca e homogênea	Fluorescência intercelular moderada e homogênea
35	Cherrie	Negativo	Negativo	Negativo	Fluorescência intercelular fraca e focal
36	Luna	Negativo	ZMB: fluorescência homogênea e contínua	ZMB: fluorescência homogênea e contínua	Negativo
37	Lilica
38	Bob
39	Jully	Negativo	Negativo	Negativo	Fluorescência intercelular fraca e focal Folículos pilosos com fluorescência fraca.
40	Lessy	Negativo	Negativo	ZMB: fluorescência homogênea e contínua	Negativo
41	Nega	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
42	Nyna	Negativo	Negativo	Negativo	Fluorescência intercelular fraca e focal
43	Tavinho	Negativo	Negativo	Negativo	Fluorescência intercelular intensa e homogênea
44	Luna	Negativo	Negativo	Negativo	Fluorescência intercelular fraca e não homogênea
45	Thor	Negativo	ZMB: fluorescência homogênea e ao redor anexos cutâneos	Negativo	Fluorescência intercelular fraca e focal

ZMB- zona da membrana basal, Ig- Imunoglobulina, C₃- fator 3 do complemento

Tabela 3 - Resultados da reação de imunofluorescência indireta de soros caninos com pêfigo foliáceo. Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia da FM-USP (2014-2015) - São Paulo - 2015

N°	Nome	D0	D15	D30	D60	D90
32	Cherry	640	80	-	-	-
33	Bisteca	160	40	20	-	-
34	Nina	160	40	20	40	...
35	Cherrie	320	40	40	80	...
36	Luna	40	20	-	-	-
37	Lilica	80	-	...
38	Bob	80	-	10	-	...
39	Jully	320	10	10
40	Lessy	80	20	-	-	-
41	Nega	320	80	40	20	40
42	Nyna	160	10	20	-	40
43	Tavinho	80	80	-	-	40
44	Luna	80	40	-	-	-
45	Thor	40	10	-	-	-

... dado inexistente; - negativo; D dia

No presente trabalho, o diagnóstico imunopatológico do pêfigo foliáceo, caracterizado pela fluorescência intercelular epidérmica (Figura 12), foi estabelecido em nove (75%) dos doze cães cuja IFD foi realizada. Evidenciou-se pela IFD distintos padrões e intensidades de fluorescência intercelular (Quadro 4).

A reação de imunofluorescência indireta, por sua vez, mostrou-se positiva em todos os 14 animais penfigosos acompanhados, perfazendo 100% de positividade, conforme disposto na tabela 3. Considerou-se como positivo o padrão de fluorescência intercelular intraepitelial, que se deu em todas as camadas da epiderme, com exceção da córnea (Figuras 13 e 14). Nos animais com piodermite superficial não foi evidenciado este padrão intercelular, não havendo, portanto, resultados falso-positivos (Figura 15).

Figura 12 - Fluorescência de moderada intensidade, homogênea, evidenciada nas regiões intraepitelial e intercelular, quanto a presença de anticorpo anti-IgG, em paciente canino 34 ("Nina") com PF. Aumento 40x. Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

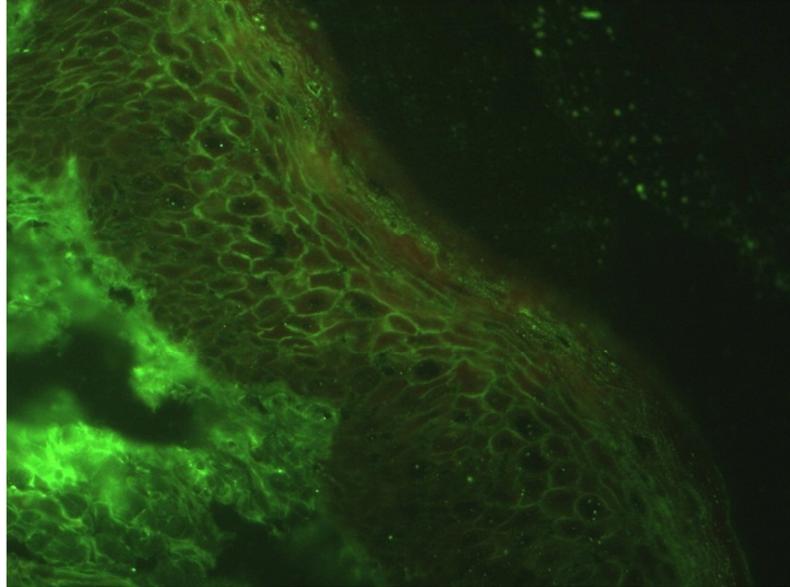


Figura 13 - Fluorescência intensa evidenciada nas regiões intraepitelial e intercelular, pela reação de IFI, em paciente canino 35 ("Cherrie") com PF. Aumento 40x. Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

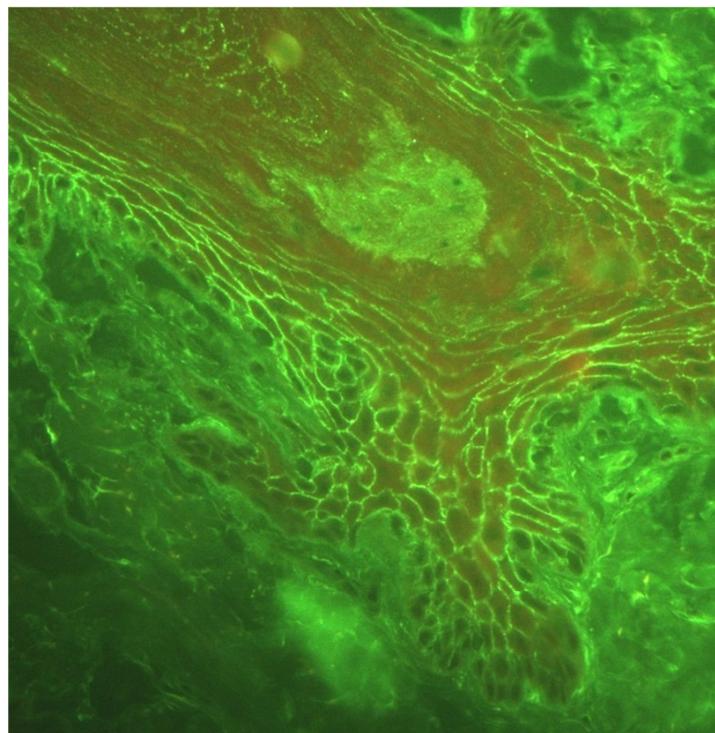


Figura 14 - Fluorescência moderada intensidade evidenciada nas regiões intraepitelial e intercelular, pela reação de IFI, em paciente canino 43 ("Tavinho") com PF. Aumento 40x. Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

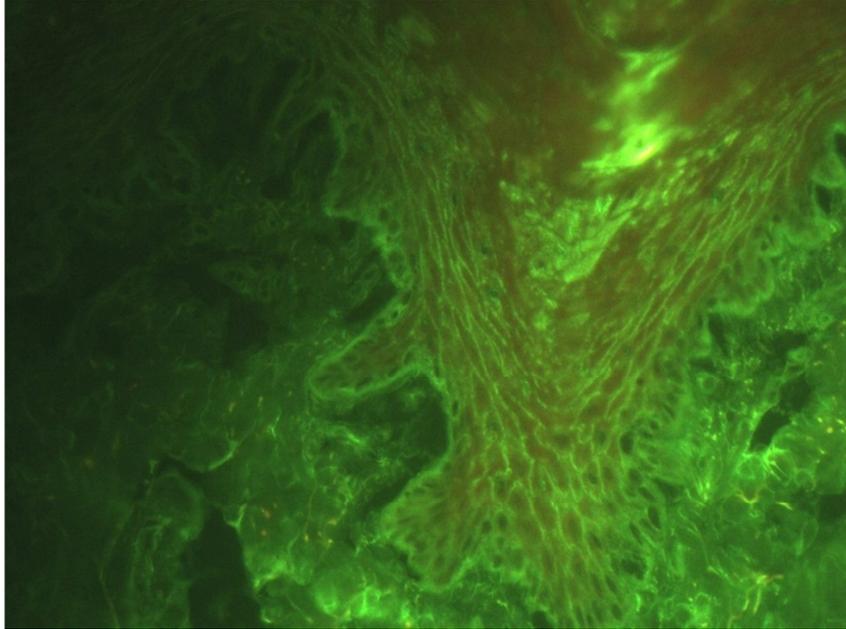
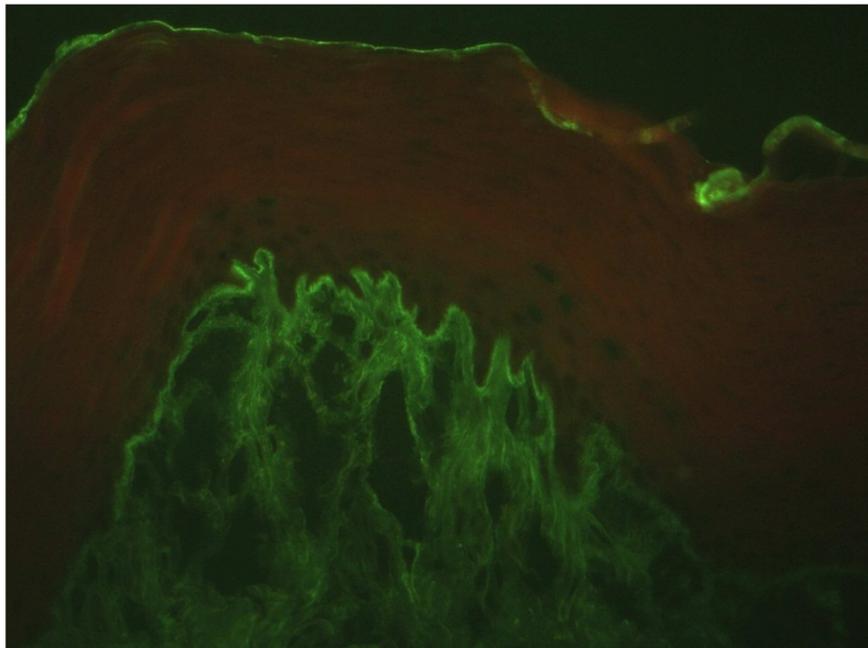


Figura 15 - Controle negativo – inexistência de fluorescência nas regiões intraepitelial e intercelular, pela reação de IFI. Aumento 40x. Laboratório de Imunopatologia Cutânea do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina da USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



Uma tabela de contingência 2x2 foi elaborada para, através do Teste Exato de Fisher, comparar a sensibilidade e a especificidade da IFD em relação ao exame histopatológico (padrão-ouro) e, também, da IFI com a histopatologia. Obteve-se sensibilidade de 75% e especificidade de 100% na IFD e de 100% quanto à sensibilidade e especificidade na IFI.

Foi utilizado, ainda, o Índice kappa (*k*) para expressar o grau de concordância dos resultados da IFD com a histopatologia e aqueles da IFI, também, com a histopatologia, adotando-se valor de significância $p < 0,05$. Comparando-se os valores de IFD com aqueles da histopatologia obteve-se um valor geral de concordância de 75% (9/12) e valor $k=0,772$ ($p < 0,001$) e, já, na IFI o valor de concordância foi de 100% (14/14) e valor $k=1,00$ ($p < 0,001$) em relação a histopatologia.

A precisão de um método analítico pode ser expressa por meio do coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo intraensaio (condição de repetibilidade) e interensaio (precisão intermediária). Desta forma, foi realizada validação inter e intraensaio para o teste ELISA para Proteína C Reativa (Tridelta) para este experimento, apesar do kit comercial já estar validado na espécie canina.

O coeficiente de variação (CV) intraensaio foi determinado, por meio da análise, em duplicata, em um mesmo dia, de valores de PCr de um dos pacientes de cada Grupo (I-controle, II-PF, III-PS), que apresentavam concentrações, respectivamente, baixa, alta e intermediária de PCr. O CV interensaio, por sua vez, foi estabelecido utilizando-se soros dos mesmo pacientes em três experimentos que ocorreram em dias diferentes (Tabela 4).

Tabela 4 - Coeficientes (%) de variação intra e interensaio para kit ELISA para Proteína C Reativa. Serviço de Laboratório Clínico do VCM do HOVET-FMVZ/USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

Grupo	N°	PCr µg/mL média	CV% inter ensaio	CV% intra ensaio
I-Controle	1 (Nina)	0,6	8,3	5,2
II- Pênfigo Foliáceo	36 (Luna)	126,4	9,3	8,0
III- Piodermite Superficial	49 (Ana Júlia)	10,2	7,3	6,0

() nome do animal

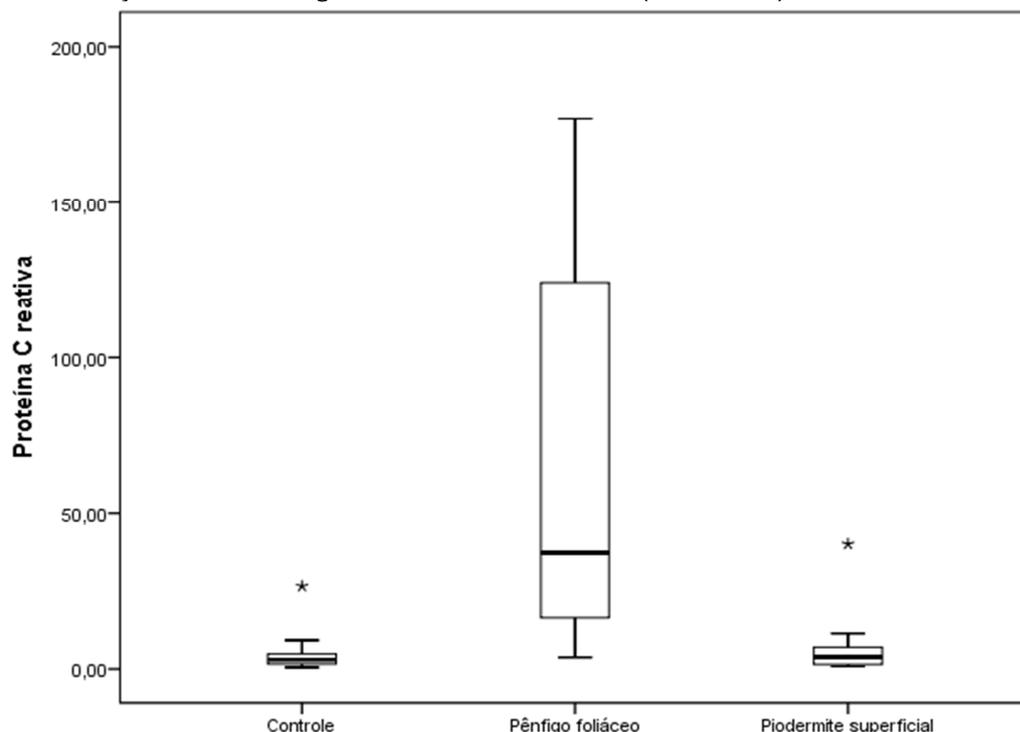
O Grupo II apresentou maior valor de PCr (Tabela 5) quando comparados aos Grupos I ($p < 0,0001$) e III ($p = 0,008$). Não houve diferença entre os Grupos I e III ($p = 0,178$).

Tabela 5 - Valores de mediana de Proteína C Reativa nos Grupos I (controle), II (pênfigo foliáceo) e III (piodermite superficial). Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

Variável	Controle	Pênfigo Foliáceo	Piodermite Superficial
PCr (µg/mL)	2,9 (1,6 – 4,9) ^b	37,4 (14,3– 128,0) ^a	3,8 (1,4 – 7,7) ^b
Valor PCr Mínimo (µg/mL)	0,5	3,7	0,9
Valor PCr Máximo (µg/mL)	26,7	176,8	40,2

Medianas (P_{25} - P_{75}). Medianas seguidas por letras sobrescritas distintas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Dunn ($P < 0,05$).

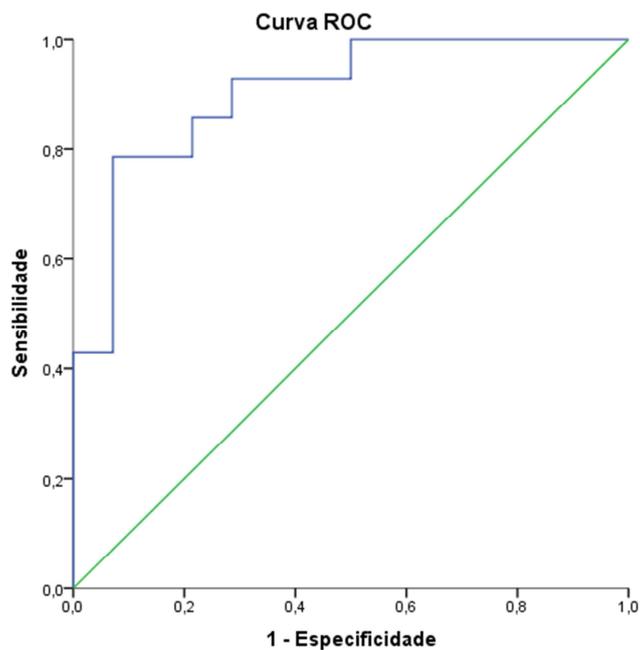
Figura 16 - Box Plot (mediana, P25 e P75, mínimo e máximo) dos valores de Proteína C Reativa dos cães nos Grupos: I (controle), II (pênfigo foliáceo) e III (piodermite superficial). Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



Para determinar a partir de qual valor de Proteína C Reativa haveria representatividade clínica visando o diagnóstico de pênfigo foliáceo, foi construída a Curva ROC (*Receive Operator Characteristic Curve*). Tal curva é definida como a descrição gráfica do desempenho de um teste, representado pela relação entre a taxa de verdadeiro-positivos e taxa de falso-positivos. Esta curva é construída a

partir dos diferentes índices de sensibilidade e especificidade e obtida com distintos valores de ponto-de-corte. Para cada ponto de decisão são colocados os índices de verdadeiro-positivos, que estarão representados no eixo das ordenadas, e os índices de falso-positivos, que estarão representados no eixo das abscissas, mostrando as variações ponto-a-ponto para cada ponto de corte possível (Figura 17). A curva ROC para os valores de PCr tem área de 0,9 (Intervalo de confiança de 95%: 0,7-1,0).

Figura 17 - Curva Roc para o diagnóstico de pêfingo foliáceo canino de acordo com valores de Proteína C Reativa. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015



A partir dos dados dispostos da Curva ROC diferentes pontos de corte para PCr foram estabelecidos e, na sequência, tabelas de contingência foram criadas para verificar-se probabilidades pós teste e qual seria o possível acréscimo para o diagnóstico do PF canino quando do uso da Proteína C Reativa.

A probabilidade pré-teste, inerente ao estudo, corresponde à prevalência de 50%. Para PCr > 6,1µg/mL como ponto-de-corte, há três vezes mais chance do paciente estar acometido por pêfingo relativamente à piodermite. Além disso, a probabilidade pós-teste, deste paciente, ascende para 75% havendo, portanto, um acréscimo de 25% na capacidade diagnóstica com a obtenção da PCr maior. Considerando-se como ponto de corte PCr>10,6µg/mL, a chance de estar acometido

pelo PF é de 5,5 vezes maior relativamente a não estar acometido, o que equivale a uma probabilidade pós-teste de 84,6%, conferindo um acréscimo de 34,6% na capacidade de diagnóstico do PF (Tabela 6).

Tabela 6 - Valia da Proteína C Reativa para o diagnóstico diferencial de cães acometidos pelo pêntigo foliáceo perante a piodermite superficial canina. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

Variável	PF		Probabilidade pre-teste (%)	S (%)	E(%)	VPP (%)	VPN (%)	Razão de Verossimilhança		Chance pre-teste PF	Chance pós- teste PF	Probabilidade pós-teste (%)	Acréscimo na capacidade diagnóstica (%)
	+	-						(+)	(-)				
>6,1	13	4	50	91,7	71,4	73,3	90,9	3,2	0,1	1	3,0	75,0	25,0
	1	10											
>7,5	12	3	50	85,7	78,6	80,0	84,6	4,0	0,1	1	4,0	80,0	30,0
	2	11											
PCR	11	3	50	78,6	78,6	78,6	78,6	3,7	0,2	1	3,7	78,3	28,3
	3	11											
>10,6	11	2	50	78,6	85,7	84,6	80,0	5,5	0,2	1	5,5	84,6	34,6
	3	12											

S: sensibilidade, E: especificidade, VPP: valor preditivo positivo, VPN: valor preditivo negativo, PF: pêntigo foliáceo. PCr: proteína C reativa Valores de PCR expressos em µg/mL.

Para análise de variância para medidas repetidas de PCr nos animais do Grupo II (PF), nos tempos 0,15, 30, 60 e 90 dias, foi aplicado o Teste de Friedman, seguido da aplicação do Teste de Dunn. As diferenças nesses Testes foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de p foi menor do que 0,05 (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores de Proteína C Reativa nos animais portadores de pêfigo foliáceo nos tempos: momento do diagnóstico, quinze, trinta, sessenta e noventa dias pós início da terapia imunossupressora. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015

Variável	Dia 0	Dia 15	Dia 30	Dia 60	Dia 90	Valor de p
PCr ($\mu\text{g/mL}$)	39,3 ^a (18,27-97,32)	1,49 ^b (0,35-3,37)	0,49 ^b (0,26-4,42)	1,39 ^b (0,27-3,41)	1,76 ^b (0,29-14,35)	0,0005

Medianas (P_{25} - P_{75}). Medianas seguidas por letras sobrescritas distintas, na mesma linha, diferem entre si pelo teste de Dunn ($p < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

O pênfigo foliáceo (PF), pressupostamente, segundo boa parte dos trabalhos compilados, é a doença vésico-bolhosa autoimune mais comumente observada na clínica dermatológica, notadamente na espécie canina (OLIVRY et al., 2006). Trata-se de enfermidade na qual há a produção de anticorpos anti-desmossômicos, ou seja voltado às caderinas responsáveis pela adesão celular. O depósito de imunoglobulinas entre as células gera o desencadeamento do processo de acantólise. Em pacientes caninos acometidos pelo pênfigo foliáceo, raramente pode-se evidenciar vesículas ou bolhas superficiais, efêmeras, classicamente observadas no paciente humano, segundo disposto em clássico tratado dermatológico brasileiro (SAMPAIO; RIVITTI, 2007). No canino penfigoso, dificilmente se detectam vesículas ou bolhas, mesmo quando de atendimento precoce do paciente. O que é contumaz é o achado de lesões pustulares, erosivas, encimadas por escamo-crosta (MUELLER et al, 2006;. OLIVRY, 2006; YABUZOE et al., 2008).

Já, a piodermite superficial está entre as mais comumente encontradas condições dermatopáticas de cães. Apesar da sua prevalência e aparência clínica, na maioria das vezes bastante típica, alguns casos tornam-se um verdadeiro desafio em termos de diagnóstico, até mesmo para clínicos experientes. Estas dificuldades decorrem do desenvolvimento de lesões únicas, na presença de um patógeno não habitual ou pela grande similaridade com outras enfermidades bem mais graves, tais como o pênfigo foliáceo. Isso ocorre pelo fato de o processo de acantólise, também, ser observado em casos de piodermite superficial, o que pode dificultar a diferenciação histopatológica com o PF e, por óbvio, a consequente correta preconização do protocolo de terapia (GORTEL, 2013).

Devido a terapia distinta entre estas duas enfermidades, o diagnóstico precoce se faz necessário. Trabalhos descrevendo a avaliação da concentração de proteínas de fase aguda em dermatopatias caninas são extremamente escassos, dispondo-se na bibliografia compulsada de, praticamente, apenas um, disposto em anais de evento mundial desse decênio (TERADA et al., 2012). Portanto, o fulcro deste estudo foi o de determinar os valores de Proteína C Reativa em cães com PF ou PS e na caracterização da PCr como um marcador biológico que possa auxiliar no diagnóstico diferencial dessas enfermidades vésico-bolhosas.

No presente estudo a média de idade dos animais apresentando PF foi de oito anos, com valor mínimo de dois e máximo de quatorze anos. Aproximadamente 64% (9/14) dos animais tinham idade que ultrapassava os sete anos. Fato esse que corrobora o referido na bibliografia internacional, onde se dispõe que a enfermidade se desenvolve em cães ditos de meia idade a senectos. No entanto, observa-se que a idade de surgimento da doença é assaz variável, com início das manifestações clínicas antes do primeiro ano e até, cerca, dos dezesseis anos de vida (MUELLER et al., 2006; BALDA et al., 2008; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Nos animais com piodermite superficial a média de idade foi de 4,5 anos, variando entre um e dez anos. Havendo, portanto, diferença estatística em relação aos cães dos Grupos (I e II), respectivamente, controle e PF ($p < 0,005$). Desta forma, pôde-se, também, bem caracterizar que o surgimento do quadro sintômatológico-lesional, desta enfermidade, ocorre em animais adultos. Dados compulsados na bibliografia caracterizam como idade média de ocorrência de cerca de cinco anos (CURTIS; LAMPORT; LLOYD, 2006; LARSSON JÚNIOR, 2015).

Da totalidade dos animais, incluídos no Grupo II (PF), dez eram fêmeas e quatro machos, com percentuais de, respectivamente, 71% e 29%. No Grupo III (PS) reuniram-se nove fêmeas (64%) e cinco machos (36%). Apesar de aparentemente, em ambos os Grupos, existir maior percentual de fêmeas não houve diferença nestas distribuições sob o ponto de vista estatístico. Segundo Miller, Griffin e Campbell (2013) inexistem trabalhos que documentam evidente predisposição sexual no quadro de pênfigo ou de piodermite.

Trabalhos dispostos na bibliografia especializada que relacionem a predisposição racial ao PF nem sempre são comparados a populações de magnitude relevante, no entanto, as raças Akita e Chow Chow parecem ter maior predisposição à doença, juntamente ao Cocker, Teckel, Labrador e Buldogue Americano (BALDA et al., 2008; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). No presente estudo, os animais sem raça definida compuseram cerca de um terço da amostragem, ou seja, cinco (35%) dos quatorze cães. Os remanescentes 65% (9/14) casos eram de animais de raça definida, sendo as mais frequentes Teckel e Poodle (em percentis de 22% cada uma dessas raças), seguidas pelo Cocker, PitBull e Shih-Tzu (7% cada).

Quanto aos animais com PS verificou-se que 28% (4/14) deles não tinham precisa definição racial, enquanto que dentre os 72% (10/14) com raça definida, aquelas mais prevalentes foram Pug e Buldogue Francês (15% cada) seguidas pelo Poodle, Maltês, Terrier Escocês, Shar-pei, Yorkshire e Teckel (com 7% cada). Esses percentis destoam daqueles evidenciados por Curtis; Lamport e LLOYD (2006) que afirmaram que todos os cães acometidos pela enfermidade têm raça definida sendo a Cocker a raça com maior número de acometidos. Entretanto, a predisposição racial ora verificada deve ser avaliada com extremo cuidado, uma vez que neste trabalho reuniu-se número relativamente reduzido de cães, afora o fato de considerar de que os modismos regionais podem levar a maior magnitude populacional de animais de determinadas raças.

Com referência ao padrão lesional, as lesões mais comumente observadas (tabela 2) nos 14 cães penfigosos foram: crostas melicéricas (100%), colarinhos epidérmicos (85%) e pústulas (78%). No que tange aos animais com PS essas mesmas lesões, também, foram praticamente as mais frequentemente observadas. Isso denota a grande semelhança lesional que existe entre essas duas, distintas, entidades nosológicas. Com relação ao prurido os animais com PF apresentaram intensidade máxima de prurido relativamente àqueles com PS. A bibliografia refere que cerca de 50% dos cães penfigosos têm quadro pruriginoso, já, nos animais com PS o prurido pode variar de ausente a intenso, pois esse sintoma está bem relacionado à causa de base (MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013).

Em São Paulo e muito provavelmente no restante do País, infelizmente, provas imunológicas destinadas ao diagnóstico de enfermidades autoimunes, em pacientes animais, são bem pouco solicitadas e executadas, pelo escasso número de laboratórios dispostos e preparados a executá-las. A fim de caracterizar a exequibilidade e a valia de provas como IFD e a IFI, a título de ferramenta de diagnóstico de enfermidades autoimunes e de diferenciação entre o PF e a PS realizaram-se tais provas entre os animais ora considerados.

A imunofluorescência é um importante meio auxiliar ao diagnóstico das dermatoses véscico-bolhosas autoimunes, isso porque muitas vezes os achados clínicos e histopatológicos de per si não permitem seu cabal diagnóstico. Trata-se, segundo Aoki et al. (2010), de método laboratorial factível, capaz de detectar

imunocomplexos, *in situ* ou circulantes, que podem estar envolvidos na patogênese de tais enfermidades cutâneas.

A adequada interpretação da IFD leva em consideração algumas características tais como morfologia, local de deposição, tipos, quantidade e intensidade da deposição dos imunorreagentes (MORRISON, 1999). Nos pacientes humanos e em caninos penfigosos a IFD revela fluorescência intercelular e intraepidérmica, de padrão linear. Nos primeiros, encontram-se depósitos de IgG e C3 intercelulares ao longo de toda a epiderme em 100% dos casos de doença em atividade (MIHAI; SITARU, 2007).

A deposição de imunorreagentes no espaço intercelular (EIC) ocorre, frequentemente, nas dermatopatias do grupo pêfigo e é deveras importante identificar a classe de imunoglobulinas depositadas, sua ligação preferencial em distintos níveis da epiderme bem como qualquer deposição em outros locais. Estes aspectos da imunofluorescência podem ser evidenciados em 100% dos pacientes humanos com a doença ativa, quando de coleta adequada de fragmento cutâneo (RANI; HUSSAIN, 2003; AOKI et al., 2010).

As IgG detectadas pertencem as subclasses IgG1 e IgG4. O padrão de fluorescência linear depositado, tipicamente na superfície dos queratinócitos, assemelha-se ao denominado, em inglês, "chicken-wire" ou aspecto em tela de galinheiro. A deposição nos EIC visto tanto no pêfigo vulgar como foliáceo pode ser idêntica, mas, muitas vezes, limita-se a presença da fluorescência na área suprabasal, no PV, e nas camadas mais superficiais no PF. No entanto, a diferenciação entre o PV e o PF pelo padrão de imunofluorescência não é totalmente adequada para ser utilizada para a diferenciação entre essas duas enfermidades do paciente humano (RANI; HUSSAIN, 2003).

Neste estudo a IFD mostrou positividade em 75% (9/12) dos animais com diagnóstico histológico de PF, percentual esse similar ao observado por outros autores que obtiveram positividade variando entre 66 até 80% dos animais (OLIVRY et al., 2006). Essa positividade pode variar conforme o fragmento utilizado para a realização da reação de IFD. Pôde-se observar que alguns dos fragmentos colhidos apresentavam-se friáveis e difíceis de serem cortados em criostato e, ainda, parte deles foram obtidos de regiões perilesionais em abdômen onde a pele é habitualmente mais delgada, fato este que pode influenciar e dificultar a eficácia de

detecção dos imunocomplexos em pacientes caninos. A coleta adequada de fragmentos é assaz importante para o adequado exame de IFD.

A deposição de imunocomplexos na zona de membrana basal (ZMB), afora a deposição de IgG no EIC, é visto, também, nos pênfigos eritematoso e paraneoplásico. Esse aspecto foi observado em dois dos pacientes penfigosos (Quadro 4), que apresentaram deposição de IgM e C3 na ZMB afora a IgG no EIC. Fato este, também, observado em pacientes humanos com pênfigo foliáceo endêmico, com lesões refratárias à terapia esteroidal, que tiveram deposição de IgM e C3 na junção dermo-epidérmica (DOS REIS; CUCÉ; RIVITTI, 1991). Para muitos autores, o pênfigo eritematoso, ou Síndrome de Senear-Usher, é considerado um estágio inicial do pênfigo foliáceo e, portanto, trata-se de uma mesma enfermidade (MAIZE; GREEN; PROVOST, 1982; MILLER; GRIFFIN; CAMPBELL, 2013). Um dos animais 34 ("Nina"), incluídos no Grupo II, apresentava lesões restritas ao plano e ponte nasal com aspecto semelhante àquele do pênfigo eritematoso, modalidade da enfermidade já descrita em pacientes caninos (LARSSON et al., 1993; OLIVRY, 2006).

Oktarina et al. (2012) demonstraram, em alguns casos de pênfigo eritematoso, a deposição de IgG na ZMB em locais expostos à radiação UV. A evidenciação de C3 é, ocasionalmente, observada, também, em casos de PF de pacientes humanos.

Neste estudo, ainda, na IFD de cães acometidos pelo pênfigo foi possível evidenciar a deposição de imunocomplexos IgM e fator de complemento C3 em, respectivamente, dois e três casos (Quadro 4).

Em pacientes humanos, a deposição descontínua ou interrompida de imunocomplexos na ZMB é menos específica e pode ser observada em distintas enfermidades, tais como queratose actínica, rosácea, erupção polimórfica, porfíria e em pele normal exposta à luz solar (MEHTA; SARDA; BALACHANDRAN, 2010). Depósitos lineares ou focais de IgM ou C3 podem ser evidenciados na ZMB em decorrência de grande variedade de doenças inflamatórias, sendo muito frequente quando proveniente de fragmentos colhidos da face ou de locais expostos a radiação solar. Em contrapartida, depósitos contínuos e lineares de IgG na junção dermo-epidérmica não são usualmente presenciados nestes casos e assim são fortemente sugestivos de quadros de lupus eritematoso (DAHL, 1983).

Utilizando-se o coxim canino como substrato, as reações de IFI realizadas, também, evidenciaram fluorescência nos espaços intercelulares dos queratinócitos, nas distintas camadas da epiderme, com exceção do estrato córneo. A IFI, neste estudo, propiciou a constatação de positividade em 100% dos animais penfigosos e sem que houvesse reações falso-positivos relativas aos animais com piodermite superficial (Grupo III). Sabe-se que os resultados da IFI variam de acordo com o substrato utilizado, com 65% de positividade quando do emprego de esôfago bovino (IWASAKI et al., 1996) e de 71 a 84% com coxim canino (LENNON et al., 2006; LUCARTS, 2010). Assim como o já observado em outros trabalhos (NISHIFUJI et al., 2005; LENNON et al., 2006; LUCARTS, 2010) os animais com PF apresentaram títulos que variaram entre 40 e até 10.240. Valores esses que diminuíram drasticamente com a instituição da terapia imunossupressora. No entanto, os animais 34, 35, 41 e 43 (Gráficos 4, 5, 11 e 13) permaneceram com títulos positivos mesmo diante da melhora clínica, avaliada e caracterizada pelo PEFESI. Pôde-se observar que a magnitude dos títulos aumentaram em dois casos (38 e 42), gráficos 8 e 12, em momentos de recidiva do quadro penfigoso tal como o esperado. Tal tipo de achado, bastante interessante, pode ser utilizado, também, como forma de monitoração da doença, no entanto, estudos com maior amostragem de cães acometidos pelo PF e por períodos mais amplos de observação devem ser realizados para melhor entender a real oscilação nos títulos de anticorpos dos animais com PF ao longo da terapia.

A perpetuação dos títulos de IgG evidenciada em cães em plena remissão do quadro penfigoso pode sugerir o envolvimento da IgG da subclasse Ig1, subclasse esta que pode estar presente em pacientes com pênfigo foliáceo endêmico controlado ou indivíduos em estágio considerado pré-clínico (AOKI; RIVITTI; DIAZ, 2015). Infelizmente no presente estudo não se diferenciaram as subclasses da IgG para que se possa comprovar tal fato em pacientes caninos.

Comparando-se os valores de IFD com aqueles da histopatologia obtiveram-se valores geral de concordância de 75% (9/12) e Índice Kappa de 0,77, valores esses estatisticamente significativos ($p < 0,001$) e, também, concordância dita substancial entre os dois métodos. Já, na IFI o valor de concordância foi de 100% (14/14) e Kappa de 1,0, estatisticamente significativo ($p < 0,001$) e com concordância considerada perfeita entre a IFI e a histopatologia.

Conseguiu-se sensibilidade de 75% e especificidade de 100% na IFD e de 100% de sensibilidade e especificidade na IFI, demonstrando-se, portanto, serem boas ferramentas diagnósticas nos casos de pêfigo foliáceo canino. Podem, ambas as técnicas, ser utilizadas, também, para diferenciação com os quadros de piodermite superficial que mimetizam aqueles de pêfigo foliáceo canino, uma vez que não foram observados falso-positivos nos cães com PS.

São poucos os relatos que descrevem a relação entre a concentração de PCr, o assestamento e a evolução de doenças tegumentares em cães. Estudos levados a cabo com cães hígdos indicaram que a concentração de PCr é ligeiramente mais elevada do que aquela de indivíduos pressupostamente saudáveis, com valores que variam normalmente entre 1 e 5 mg/dL. Na prática da clínica veterinária, verifica-se que a concentração de PCr se eleva em processos inflamatórios, a exemplo da pancreatite, piometra, poliatrite, anemia hemolítica e pneumonia (NAKAMURA et al., 2008; GRIEBSCHE et al., 2009; ECKERSALL; BELL, 2010). Infelizmente, estudos que investigam o real papel da PCr nos quadros de pêfigo foliáceo e de piodermite superficial caninos não foram ainda publicados.

As concentrações séricas de Proteína C Reativa, pela técnica ELISA ora empregada, obtidas no Grupo I (controle), apresentaram valores semelhantes, com mínima de 0,5µg/mL e máxima de 26,7µg/mL, àqueles obtidos por outros autores com variação de 2,4 até 30,0µg/mL (YAMAMOTO et al., 1993), 0,8 à 22,0µg/mL (OTABE et al.,1998), 0 à 40 µg/mL (CARNEY et al., 2011) e com mediana de 2,9µg/mL bastante próximo ao observado, também, por outros pesquisadores que obtiveram valores de mediana oscilando entre 0,9 e 3,2 µg/mL (KJELGAARD-HANSEN; KRISTENSEN; JENSEN, 2003; PLANELLAS et al., 2009; TECLES et al., 2009; RAILA; SCHWEIGERT; KOHN, 2011). Pôde-se observar que a faixa de variação de PCr, nos animais hígdos, é bastante variável e ampla. Muito provavelmente mesmo caninos aparentemente sem manifestações mórbidas momentâneas evidentes tenham valores elevados de PCr por fenômeno constitucional próprio. Merece destacar que tão somente um animal, clinicamente hígido do Grupo I (cão 7), Poodle, macho, 5 anos de idade, que apresentou valor de PCr de 26,7 µg/mL, valor esse bem acima dos valores medianos de 2,9 (1,6 - 4,9 µg/mL) obtidos. A guisa de explicação para tal disparidade permite-se pressupor que por fenômeno constitucional tal magnitude seria característica intrínseca do animal

ou, talvez, que eventual enfermidade, ainda em fase pré clínica, evoluísse de forma silenciosa e indetectável pelos métodos de semiologia armada.

A avaliação sérica de PCr no Grupo II (PF) indicou valores superiores aos observados nos Grupos I (controle) ($P < 0,001$) e III (PS) ($P = 0,008$). E, ainda mais, não houve diferença estatística entre os Grupos I e III. Terada et al. (2012) apresentaram, utilizando-se de metodologia distinta ao ELISA, qual seja ensaio imunoturbidimétrico, concentração de PCr com mediana de $76 \mu\text{g/mL}$ (mínima de 52 e máxima de $159 \mu\text{g/mL}$) em três casos de PF. Valores esses compatíveis com os evidenciados nesta investigação com quatorze animais acometidos pelo PF, em que se constatou mediana de $37,4 \mu\text{g/mL}$, e valores mínimo de 3,7 e máximo de $176,8 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 5). Esses resultados sugerem que a ativação da resposta de fase aguda pode decorrer da própria patogênese do PF, porém ainda não estabelecido, necessitando, por óbvio, de elucidação.

Distintos clínicos e grupos de pesquisa avaliaram concentrações de PCr em diversas enfermidades caninas observando um aumento de PCr considerável em neoplasias e doenças imune-mediadas a exemplo da anemia hemolítica imune-mediada (MERLO et al., 2007; NAKAMURA et al., 2008; GRIEBSCH et al., 2009). Tal fato, também, observado na clínica médica de pacientes humanos (EGNER, 2000) vem corroborar o detectado neste estudo com cães penfigosos. Em trabalhos com pacientes portadores do pênfigo foliáceo endêmico, pôde-se notar valores de PCr aumentados em cerca de 60% a 85% dos casos (FURTADO; CARDOSO; CISALPINO, 1960; FRANQUINI JUNIOR et al., 1994).

Correlações já foram estabelecidas entre os níveis de PFAs e a gravidade de outras enfermidades, com concentrações séricas de PFAs maiores em casos mais graves ou em animais sintomáticos perante àqueles assintomáticos (CERON; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). Isso pode explicar o fato dos animais acometidos pela piodermite superficial (Grupo III) apresentarem concentrações mais baixas de PCr e até mesmo sem diferença estatística quando comparados aos animais controles (Grupo I). A piodermite superficial, na maioria das vezes, é uma dermatopatia que não acarreta manifestação de outros sintomas afora as lesões tegumentares, fato esse que a difere dos quadros penfigosos, que podem, por vezes, ser acompanhados de leucocitose, piroxia, apatia e lesões tegumentares bem mais disseminadas.

Utilizando-se como ponto de corte um valor de PCr superior a 10,6 $\mu\text{g/mL}$, com base na população estudada, a chance de se tratar de PF é 5,5 vezes maior, o que equivale a uma probabilidade pós-teste de 84,6%, propiciando assim acréscimo de 34,6% de precisão diagnóstica quanto ao PF, o que poderia facilitar a diagnose diferencial entre as suspeitas de tratar-se de PF ou PS.

Não se observou correlação entre os títulos de anticorpos e as concentrações dessa PFAs em distintas enfermidades infecciosas (CERON; ECKERSALL; MARTÍNEZ-SUBIELA, 2005). Como explicação para tal fato pressupôs-se que decorreria de uma resposta inata e precoce das PFAs, enquanto que os títulos de anticorpos corresponderiam à resposta imune adquirida mais tardiamente. Isso pode justificar a ausência de correlação dos valores de PCr com a titulação observada nos pacientes com PF, a exemplo do observado nos animais 32, 39 e 45 que tiveram negatificação dos títulos quando da piora clínica e valores de PCr mais elevados (gráficos 2, 9 e 15). Ainda mais, não se observou correlação entre os animais que obtiveram os maiores títulos com aqueles de maiores valores de PCr, a exemplo do cão 35 (Cherrie) que apresentou título inicial de 320 e valor de PCr de 16,3 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que o animal 37 (Luna) apresentou título de 40 e valor de PCr de 139,9 $\mu\text{g/mL}$, ambos valores obtidos no momento do diagnóstico. Já, nos animais 38 e 42 foi possível evidenciar aumento dos valores de PCr coincidentemente com o aumento dos títulos de IFI, ambos relacionados com a piora clínica avaliada pelo, também, aumento do PEFESI. Entretanto pôde-se evidenciar que nos demais casos (33, 36, 37, 40 e 43) os valores de PCr e os títulos obtidos na IFI reduziram em associação à melhora clínica dos cães penfigosos, evidenciada pela redução do PEFESI.

Segundo Foster et al. (2014), o sucesso do tratamento de cães com poliartrite ou pancreatite resultou na diminuição de concentrações de PCr. Em contraste, níveis persistentemente elevados de PCr foram encontrados em cães que não responderam à terapia ou que apresentaram recidiva. Nessa investigação, a avaliação da PCr, nos cães penfigosos, mostrou importante queda em seus níveis quinze dias após instituição da terapia, com diferença estatisticamente significativa ($P < 0,005$) quando da comparação da PCr no D0 (dia inicial, ou seja, no momento do diagnóstico) em relação aos dias 15, 30, 60 e 90 (quais sejam, os tempos subsequentes à instituição do protocolo terapêutico). O Teste de Friedman quando

aplicado não permitiu a evidenciação de diferenças estatísticas entre os dias 15, 30, 60 e 90. Demonstrando que a PCr talvez indique uma melhora clínica inicial após início da terapia, porém não consegue avaliá-la precisamente em momentos de recidiva. No entanto, ao avaliar individualmente os animais com PF pôde-se observar que há uma queda expressiva dos níveis de PCr já aos quinze dias após início da terapia para a maioria dos animais. Com relação aos cães 38, 42 e 45 (Bob, Nyna e Thor) observou-se aumento dos valores de PCr que coincidiram com os momentos de recidiva do PF, apesar de não ter havido comprovação estatística. Desta maneira, por óbvio, são necessárias outras investigações com magnitude amostral de maior monta em termos de casuística canina acometida pelo pênfigo foliáceo, a fim de, eventualmente, caracterizar-se o quanto a PCr poderia se relacionar com momentos de recidiva e, se, poderia ser ela utilizada para avaliação prognóstica da doença. Para tanto, os animais devem ser acompanhados por períodos maiores de tempo para obter-se êxito na resposta a essas indagações.

Destarte, é importante corroborar, o já sabido, que as concentrações de proteínas de fase aguda encontram-se elevadas em animais com uma série de distintas doenças, mormente o PF, embora apresentem baixa especificidade com o fim precípua da determinação de causalidade da enfermidade.

Permite-se afirmar que uma das PFAs, especificamente, a PCr não deve ser utilizada, de forma isolada, como teste eletivo de diagnose precoce, no caso do PF e quiçá de outras enfermidades. No entanto, devido a sua alta sensibilidade na detecção de muitas condições mórbidas que alteram a higidez do animal, seguramente, auxilia no estabelecimento precoce do diagnóstico de doenças inflamatórias ou infecciosas.

Em face a essas ponderações permite-se inferir que a determinação de PCr é de inequívoca contribuição para o estabelecimento de diferenciação diagnóstica entre a casuística da contumaz piodermite superficial com os quadros do pênfigo foliáceo canino, contudo sendo de pouca valia como metodologia a ser utilizada de modo isolado.

8 CONCLUSÕES

Com base na metodologia ora empregada e nos resultados obtidos e discutidos permite-se, concluir que:

- 1) o pênfigo foliáceo induz resposta de fase aguda em pacientes caninos, que se expressa pela elevação dos níveis séricos de PCr.
- 2) a piodermite superficial, por sua vez, não eleva os níveis séricos de PCr.
- 3) a PCr pode ser utilizada como marcador biológico complementar, a outros exames, para diferenciar o pênfigo foliáceo da piodermite superficial canina.
- 4) a PCr pode auxiliar na diferenciação diagnóstica entre pacientes caninos acometidos pelo pênfigo foliáceo ou piodermite superficial, pois eleva a possibilidade diagnóstica em 5,5 vezes nos casos de PF, quando os valores de PCr forem maiores que 10,6 μ g/mL.
- 5) a intensidade da resposta na fase aguda, avaliada pela PCr, reduz-se após o tratamento exitoso dos pacientes penfigosos e, já aos 15 dias, com descenso para o intervalo de normalidade.
- 6) a IFD permitiu estabelecer o diagnóstico em 75% dos casos caninos de pênfigo foliáceo, enquanto que a congênera IFI alcançou percentil de 100%, ambos comparados com resultados da histopatologia.
- 7) as reações de imunofluorescência, direta e indireta, não apresentam resultados falso-positivos em casos de piodermite superficial.
- 8) pôde-se evidenciar que os títulos de IFI e os valores de PCr reduziram, na maioria dos casos de PF, tal como o esperado em momentos de melhora clínica.

REFERÊNCIAS

AOKI, V.; FUKUMORI, L. M. I.; FREITAS, E. L.; SOUSA, J. X.; PÉRIGO, A. M.; OLIVEIRA, Z. N. P. Imunofluorescência direta e indireta. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 490–500, 2010.

AOKI, V.; RIVITTI, E. A.; DIAZ, L. A. Update on fogo selvagem, an endemic form of pemphigus foliaceus. **The Journal of Dermatology**, v. 42, n. 1, p. 18–26, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/1346-8138.12675>>. Acesso em: 25 jun. 2015.

BALDA, A. C.; IKEDA, M. O.; MICHALANY, N. S.; LARSSON, C. E. Pênfigo foliáceo em cães: levantamento de casos atendidos no período de novembro de 1986 a julho de 2000 e de resposta aos protocolos de terapia empregados no Hospital Veterinário da USP. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 9, n. 2, p. 97-101, 2002.

BALDA, A. C.; IKEDA, M. O.; LARSSON, C. E.; MICHALANY, N. S.; LARSSON, C. E. Pênfigo foliáceo canino: Estudo retrospectivo de 43 casos clínicos e terapia (2000-2005). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 28, n. 8, p. 387–392, 2008.

BIZIKOVA, P.; DEAN, G. a.; HASHIMOTO, T.; OLIVRY, T. Cloning and establishment of canine desmocollin-1 as a major autoantigen in canine pemphigus foliaceus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 149, n. 3-4, p. 197–207, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.vetimm.2012.06.025>>. Acesso em: 26 set. 2012.

BLOOM, P. Canine superficial bacterial folliculitis: current understanding of its etiology, diagnosis and treatment. **Veterinary Journal**, v. 199, n. 2, p. 217–222, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.11.014>>. Acesso em: 5 jul. 2015.

CARNEY, P. C.; RUAUX, C. G.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Biological variability of C-reactive protein and specific canine pancreatic lipase immunoreactivity in apparently healthy dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 25, n. 4, p. 825-830, 2011.

CECILIANI, F.; GIORDANO, A.; SPAGNOLO, V. The systemic reaction during inflammation: the acute phase proteins. **Protein Peptide Letters**, v. 9, n. 3, p. 211–223, 2009.

CERON, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. **Veterinary Clinical Pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology**, v. 34, n. 2, p. 85–99, 2005.

CHRIGUER, R. S.; ROSELINO, A. M.; DE CASTRO, M. Glucocorticoid sensitivity and proinflammatory cytokines pattern in pemphigus. **Journal of Clinical**

Immunology, v. 32, n. 4, p. 786–93, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22407150>>. Acesso em: 2 abr. 2013.

CURTIS, C. F.; LAMPORT, A. I.; LLOYD, D. M. Masked, controlled study to investigate the efficacy of *Staphylococcus intermedius* autogenous bacterin for the control of canine iopathic recurrent superficial pyoderma. **Veterinary Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 163-168, 2006.

DOS REIS, V. M. S; CUCÊ, L. C.; RIVITTI, E. A. Anatomopatologia e imunofluorescência direta e indireta das lesões de pêfingo foliáceo endêmico resistentes à corticoterapia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 33, n. 3, p. 97-103, 1991.

ECKERSALL, P. D.; BELL, R. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. **Veterinary Journal**, v. 185, n. 1, p. 23–27, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.04.009>>. Acesso em: 23 out. 2012.

EGNER, W. The use of laboratory tests in the diagnosis of SLE. **Journal of Clinical Pathology**, v. 53, n. 6, p. 424-432, 2000.

FOSTER, J.D.; SAMPLE, S.; KOHLER, R.; WATSON, K.; TREPANIER, L.A. Serum biomarkers of clinical and cytologic response in dogs with idiopathic immune-mediated polyarthropathy. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 28, n. 3, p. 905-911, 2014.

FRANQUINI JUNIOR, J.; ADAD, S. J.; HELENA, A.; MURTA, C.; MORAIS, C. A. de; PAULA, V. de; TEIXEIRA, A. Provas de atividade inflamatória no pêfingo foliáceo endêmico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. 1, p. 25–29, 1994.

FURTADO, T. A.; CARDOSO, J. P.; CISALPINO, E. O. A Proteína C Reativa no pêfingo foliáceo. **O Hospital**, v. 58, p. 157-162, 1960.

GORTEL, K. Recognizing pyoderma: more difficult than it may seem. **The Veterinary clinics of North America. Small animal practice**, v. 43, n. 1, p. 1–18, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23182321>>. Acesso em: 1 mar. 2013.

GRIEBSCH, C.; ARNDT, G.; RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J.; KOHN, B. C-reactive protein concentration in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 4, p. 421–425, 2009.

IDE, K.; YAMAMOTO, W.; SATO, M.; YABUZOE, A.; IWASAKI, T., NISHIFUJI, K. Expression Analysis of Desmosomal Components of the Novel Canine Epidermal Keratinocyte Cell Line (MSCEK). **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 72, n. 11, p. 1479-1482, 2010.

ISHA; JAIN, V. K.; LAL, H. C-reactive protein and uric acid levels in patients with psoriasis. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 26, n. 3, p. 309–311, 2011.

IWASAKI, T.; SHIMIZU, M.; OBATA, H.; OGATA, M.; NAGATA, M.; YANAI, T.; KITAGAWA, H.; SASAKI, Y. Effect of substrate on indirect immunofluorescence test for canine pemphigus foliaceus. **Veterinary Pathology**, v. 33, n. 3, p. 332–336, 1996.

KJELGAARD-HANSEN, M.; KRISTENSEN, A. T.; JENSEN, A. L. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of C-reactive protein in canine serum. **Journal of Veterinary Medicine, A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine**, v. 50, n. 3, p. 164–8, abr. 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12757556>>. Acesso em: 2 abr. 2013.

KLENNER, S.; BAUER, N.; MORITZ, A. Evaluation of three automated human immunoturbidimetric assays for the detection of C-reactive protein in dogs. **Journal of veterinary diagnostic investigation : official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc**, v. 22, n. 4, p. 544–552, 2010.

KOCATURK, M.; TVARIJONAVICIUTE, A.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; ERALP, O.; YILMAZ, Z.; CERON, J. J. Inflammatory and oxidative biomarkers of disease severity in dogs with parvoviral enteritis. **Journal of Small Animal Practice**, v. 56, n. 2, p. 119–124, 2014.

KUHL, K. A.; SHOFER, F. S.; GOLDSCHMIDT, M. H. Comparative Histopathology of Pemphigus Foliaceus and Superficial Folliculitis in the Dog. **Veterinary Pathology**, v. 31, n. 1, p. 19–27, 1 jan. 1994. Disponível em: <<http://vet.sagepub.com/lookup/doi/10.1177/030098589403100103>>. Acesso em: 2 abr. 2013.

KURIBAYASHI, T.; SHIMADA, T.; MATSUMOTO, M.; KAWATO, K.; HONJYO, T.; FUKUYAMA, M.; YAMAMOTO, Y.; YAMAMOTO, S. Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy beagle dogs of various ages and pregnant beagle dogs. **Experimental Animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science**, v. 52, n. 5, p. 387–390, 2003.

LARSSON, C. E.; DAGLI, M. L. Z.; CHIESA, S. C.; MICHALANY, N. S. Pênfigo eritematoso em Collie em Sao Paulo - Primeira Descricao. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA ANCLIVEPA, 15., 1993, Rio de Janeiro, RJ., 1993.

LARSSON, C. E. Enfermidades Imunemediadas. In: LARSSON, C. E.; LUCAS, R. **Tratado de medicina externa**. São Paulo: Interbook, Cap. 50, p. 713-742, 2015 (no prelo).

LARSSON JUNIOR, C. E. **Estudo comparativo da eficácia da imunoterapia com bacterina e de dois esquemas de pulsoterapia antibiótica no manejo das piодermites superficiais idiopáticas recidivantes caninas**. 2008. 88 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências -Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

LARSSON JUNIOR, C. E. Enfermidades bacterianas. In: LARSSON, C. E.; LUCAS, R. **Tratado de medicina externa**. São Paulo: Interbook, 2015. Cap. 28, p. 425-462. (no prelo).

LENNON, E.M.; DE BRUIN, A.; DE MEULEMEESTER, J.; WYDER, M.; SUTER, M. Immunological heterogeneity of canine pemphigus foliaceus: I-variability of indirect immunofluorescence patterns (Abstract). **Veterinary Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 216, 2006.

LÓPEZ-ROBLES, E.; AVALOS-DÍAZ, E.; VEGA-MEMIJÉ, E.; HOJYO-TOMOKA, T.; VILLALOBOS, R.; FRAIRE, S.; DOMÍGUEZ-SOTO, L.; HERRERA-ESPARZA, R. TNF- α and IL-6 are mediators in blistering process of pemphigus. **International Journal of Dermatology**, v. 40, p. 185-188, 2001.

LUCARTS, L. E. B. **Avaliação de exequibilidade e da efetividade da determinação de anticorpos séricos pela IFI, em cães acometidos por pêmfigo foliáceo na pré e trans-terapia**. 2010. 89 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Clínica Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

MARSELLA, R. Canine Pemphigus Complex: diagnosis and therapy. **Compendium on Continuing Education for the Practicing veterinarian**, v. 22, n. 7, p. 680-685, 2000.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; TECLES, F.; ECKERSALL, P. D.; CÉRON, J. J. Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniosis. **Veterinary Record**, v. 150, n. 8, p. 241–244, 2002.

MARTÍNEZ-SUBIELA, S.; GINEL, P. J.; CERÓN, J. J. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. **The Veterinary Record**, v. 154, n. 26, p. 814–817, 2004.

MAIZE, J. C.; GREEN, D.; PROVOST, T. T. Pemphigus foliaceus: A case with serologic features of Senear-Usher syndrome and other autoimmune abnormalities. **Journal of American Academy Dermatology**, v. 7, n. 6, p. 736-741, 1982.

MEHTA, V.; SARDA, A.; BALACHANDRAN, C. Lupus band test. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, v. 76, n. 3, p. 298-300, 2010.

MERLO, A.; REZENDE, B. C. G.; FRANCHINI, M. L.; SIMÕES, D. M. N.; LUCAS, S. R. R. Serum C-reactive protein concentrations in dogs with multicentric lymphoma undergoing chemotherapy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 230, n. 4, p. 522–526, 2007.

MIHAI, S.; SITARU, C. Immunopathology and molecular diagnosis of autoimmune bullous diseases. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 11, n. 3, p. 462-81, 2007.

MILLER, D. H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K. L. **Miller and Kir's small animal dermatology**. 7. ed. Philadelphia: Saunders, 2013. p. 432-445.

MONTEIRO, G. A.; SOUZA, M. V. de; CONCEIÇÃO, L. G.; BORBA, C. D. L. B. E. R.; MOREIRA, M. A. S. Pênfigo foliáceo em um equino. **Ciência Rural**, v. 37, n. 2, p. 594-598, 2007.

MORRISON, L. H. When to request immunofluorescence: practical hints. **Seminars in Cutaneous Medicine Surgery**, v. 18, n. 1, p. 36-42, 1999.

MUELLER, R. S.; KREBS, I.; POWER, H. T.; FIESELER, K. V. Pemphigus foliaceus in 91 dogs. **Journal of the American Hospital Association**, v. 42, n. 3, p. 189-196, 2006.

NAKAMURA, M.; TAKAHASHI, M.; OHNO, K.; KOSHINO, A.; NAKASHIMA, K.; SETOGUCHI, A.; FUJINO, Y.; TSUJIMOTO, H. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. **The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science**, v. 70, n. 2, p. 127–131, 2008.

NIELSEN, L.; TOFT, N.; ECKERSALL, P. D.; MELLOR, D. J.; MORRIS, J. S. Serum C-reactive protein concentration as an indicator of remission status in dogs with multicentric lymphoma. **Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine**, v. 21, n. 6, p. 1231–6, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18196731>>. Acesso em: 2 abr. 2013.

NISHIFUJI, K.; YOSHIDA-YAMAKITA, K.; IWASAKI, T. A canine pemphigus foliaceus case showing parallel relationship of disease activity and titer of serum anti-keratinocyte cell surface antibodies. **The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science**, v. 67, n. 9, p. 943–945, 2005.

ODAGUIRI, J.; LUCARTS, L. E. B.; MICHALANY, N.S.; LARSSON JUNIOR, C.E.; LARSSON, C.E. Canine pemphigus foliaceus: a retrospective study of 102 cases (1986-2011) in São Paulo, Brazil. **Veterinary Dermatology**, v. 23. p. 87, 2012. Trabalho apresentado no 7th World Congress of Veterinary Dermatology, 2012, Vancouver, Canadá.

OKTARINA, D. A. M.; POOT, A. M.; KRAMER, D.; DIERCKS, G. F. H.; JONKMAN, M. F.; PAS, H. H. The IgG “Lupus-Band” deposition pattern of pemphigus erythematosus. **Archives of Dermatology**, v. 148, n. 10, p. 1173-1178, 2012.

OLIVRY, T.; RIVIERRE, C.; MURPHY, K. M. Efficacy of cyclosporine for treatment induction of canine pemphigus foliaceus. **The Veterinary Record**, v. 152, n. 2, p. 53–54, 2003.

OLIVRY, T. A review of autoimmune skin diseases in domestic animals: I - Superficial pemphigus. **Veterinary Dermatology**, v. 17, n. 5, p. 291–305, 2006.

OLIVRY, T.; LAVOY, A.; DUNSTON, S. M.; BROWN, R. S.; LENNON, E. M.; WARREN, S. J.; PRISAYANH, P.; MÜLLER, E. J.; SUTER, M. M.; DEAN, G. A.

- Desmoglein-1 is a minor autoantigen in dogs with pemphigus foliaceus. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, n. 3-4, p. 245–55, 15 abr. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16293316>>. Acesso em: 2 abr. 2013.
- OTABE, K.; SUGIMOTO, T.; JINBO, T.; HONDA, M.; KITAO, S.; HAYASHI, S.; SHIMIZU, M.; YAMAMOTO, S. Physiological levels of C-reactive protein in normal canine sera. **Veterinary Research Communications**, v. 22, n. 2, p. 77-85, 1998.
- PALTRINIERI, S. Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: The acute phase proteins. **Veterinary Research Communications**, v. 31, p. 125–129, 2007. Supplement, 1.
- PEPYS, M. B.; HIRSCHFIELD, G. M. C-reactive protein: a critical update. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 12, p. 1805-1812, 2003.
- PLANELLAS, M.; BASSOLS, A.; SIRACUSA, C.; SACO, Y.; GIMÉNEZ, M.; PATO, R.; PASTOR, J. Evaluation of serum haptoglobin and C-reactive in dogs with mammary tumors. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 38, n. 3, p. 348-352, 2009.
- RAILA, J.; SCHWEIGERT, F. J.; KOHN, B. C-reactive protein in serum of dogs naturally occurring renal disease. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, n. 4, p. 710-715, 2011.
- RANI, Z.; HUSSAIN, I. Review article Immunofluorescence diseases in immunobullous. **Journal of Pakistan Association of Dermatologists**, v. 13, p. 76–88, 2003.
- RECHE JUNIOR, A.; WANG, L.; GERALDO-JUNIOR, C. A.; LARSSON, C. L. Paraneoplastic pemphigus foliaceus in a cat (Abastract). **Veterinary Dermatology**, v. 23. p. 72, 2012. Trabalho apresentado no 7th World Congress of, Veterinary Dermatology, 2012. Estados Unidos: Wiley Online Library.
- ROSENKRANTZ, W. S. Pénfigo foliáceo. In: GRIFFIN, C. E.; KWOCKKA, K. W.; MACDONALD, J. M. **Enfermedades dermatológicas del perro y el gato. Ciência y arte de la terapêutica**. Buenos Aires: Inter-Médica, 1993. cap. 13, p.165-173.
- SAMPAIO, A. P.; RIVITTI, E. A. Erupções vésico-bolhosas. In: SAMPAIO, A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 3. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2007. p. 301-330.
- SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Small animal dermatology**. 6th. ed. Philadelphia: W.B.Saunders, 2001.
- STEEVES, E. B.; CHELACK, B. J.; CLARK, E. G.; HAINES, D. M. Altered immunohistochemical staining for desmoglein in skin biopsies in canine pemphigus foliaceus. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 14, p. 53-56, 2002.
- TECLES, F.; CALDÍN, M.; ZANELLA, A.; MEMBIELA, F.; TVARIJONAVICIUTE, A.; SUBIELA, S. M.; CERÓN, J. J. Serum acute phase protein concentrations in female

dogs with mammary tumors. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation:** official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, v. 21, n. 2, p. 214–219, 2009.

TEREDA, Y.; MURAYAMA, N.; OKUAKI, M.; NAGATA, M. C-reactive protein concentration in dogs with skin diseases (Aabstract). In: 7th World Congress of Veterinary Dermatology, 2012, Vancouver. **Veterinary Dermatology**, v. 23. p. 99, 2012.

TIZARD, I. R. Los macrófagos y las últimas fases de la inflamación. In: TIZARD, I. R. **Introducción a la inmunología veterinaria**. 8. ed. Espanha: Elsevier, 2009. p. 41-58.

THOMPSON, J. P. Moléstias imunológicas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: moléstias do cão e do gato**. 4. ed. Guanabara Koogan, 1997. Cap.148, p. 2766-2804.

VOLANAKIS, J. E. Human C-reactive protein: expression, structure, and function. **Molecular Immunology**, v. 38, n. 2-3, p. 189-197, 2001.

YABUZOE, A.; NISHIFUJI, K.; SEKIGUCHI, M.; SHIMIZU, A.; MOMOI, Y.; ISHIKO, A.; IWASAKI, T. Neutrophils contact to plasma membrane of keratinocytes including desmosomal structures in canine pemphigus foliaceus. **The Journal of Veterinary Medical Science / The Japanese Society of Veterinary Science**, v. 70, n. 8, p. 807–812, 2008.

YAMAMOTO, S.; SHIDA, T.; MIYAJI, S.; SANTSUKA, H.; FUJISE, H.; MUKAWA, K.; FURUKAMA, E.; NAGAE, T.; NAIKI, M. Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. **Veterinary Research Communication**, v. 17, n. 2, p. 85-93, 1993.

Apêndice A - PEFESI - Pemphigus foliaceus extent severity index

(Tradução livre – LUCARTS, 2010)

Data:	Identificação:				
	CLÍNICO:				
	LOCAL \LESÕES	PÚSTULAS	EROSÕES	CROSTAS	ESCORE MÁXIMO
PEFESI	PLANO NASAL				
Pemphigus	ESPELHO NASAL				
Foliaceus	PONTE NASAL				
Extent	REGIÃO MENTONIANA				
Severity	MAXILAR, LATERAL LEFT				
Index	MAXILAR, LATERAL RIGHT				
	FACE, PERIOCULAR ESQUERDA				
	FACE, PERIOCULAR DIREITA				
para cada local, gradue cada lesão	FACE LATERAL ESQUERDA				
como se segue:	FACE LATERAL DIREITA				
0 = ausente	CABEÇA, DORSAL				
1 = discreta	PAVILHÃO AURICULAR ESQUERDO, CONVEXO				
2 = moderada	PAVILHÃO AURICULAR ESQUERDO, CÔNCAVO				
3 = grave	PAVILHÃO AURICULAR DIREITO, CONVEXO				
	PAVILHÃO AURICULAR DIREITO, CÔNCAVO				
adicione o escore para cada linha (máximo)	REGIÃO CERVICAL, DORSAL				
e o total de linhas ao fundo	REGIÃO CERVICAL, VENTRAL				
sua somatória nos dará o escore clínico	REGIÃO CERVICAL, LATERAL ESQUERDA				
	REGIÃO CERVICAL, LATERAL DIREITA				
	AXILAR, ESQUERDA				
	AXILAR, DIREITA				
	ESTERNO				
	INGUINAL, ESQUERDA				
	INGUINAL, DIREITA				
	ABDOME				
	TÓRAX, DORSAL				
	TÓRAX, LATERAL ESQUERDA				
	TÓRAX, LATERAL DIREITA				
	LOMBAR, DORSAL				
	FLANCO, ESQUERDO				
	FLANCO, DIREITO				
	MEMBRO, TORÁCICO ESQUERDO, MEDIAL				
	MEMBRO, TORÁCICO ESQUERDO, LATERAL				
	MEMBRO, TORÁCICO ESQUERDO, VENTRAL				
	EXTREMIDADE MP ESQUERDO DORSAL				
	MP ESQUERDO MEDIAL				
	MP ESQUERDO LATERAL				
	EXTREMIDADE MP ESQUERDO DORSAL				
	EXTREMIDADE MP ESQUERDO VENTRAL				
	MT DIREITO MEDIAL				
	MT DIREITO LATERAL				
	EXTREMIDADE MT DIREITO, VENTRAL				
	EXTREMIDADE MT DIREITO, DORSAL				
	MP DIREITO MEDIAL				
	MP DIREITO LATERAL				
	EXTREMIDADE MP DIREITO, VENTRAL				
	EXTREMIDADE MP DIREITO, DORSAL				
	PERÍNEO				
	COCCÍGEA, DORSAL				
	COCCÍGEA, VENTRAL				
				TOTAL:	

Apêndice B – Caracterização dos resultados obtidos nos animais incluídos no Grupo III (piodermite superficial), segundo os resultados de PCr ($\mu\text{g/mL}$), nos dias 0, 15, 30 e 60 e das reações de IFD e IFI. Serviço de Dermatologia do HOVET/FMVZ-USP (2013-2015) - São Paulo - 2015.

Número	Prontuário	Nome	D0	PCr ($\mu\text{g/mL}$)				IFD	IFI
				D15	D30	D60			
46	221935	Costelinha	6,9	2,9	4,4	...	-	-	
47	240806	Koda	5,4	0,3	3,1	...	-	-	
48	244846	Amora	3,6	0,3	0,3	...	-	-	
49	244803	Ana Julia	9,9	6,2	0,8	...	-	-	
50	240182	Jackie	2,2	0,5	0,2	...	-	-	
51	211634	Magoo	4,0	0,5	0,3	...	-	-	
52	243890	Toby	11,3	1,7	3,1	...	-	-	
53	243353	Gaia	1,5	1,6	0,7	...	-	-	
54	236893	Meg	4,0	2,0	4,3	2,1	-	-	
55	244580	Fox	0,9	1,0	0,6	...	-	-	
56	244086	Kelly	0,8	0,6	0,5	...	-	-	
57	240637	Meg	1,2	0,6	0,7	...	-	-	
58	234802	Polly	40,2	1,4	0,9	...	-	-	
59	243020	Francesca	3,5	6,8	0,6	...	-	-	

D: dia, SRD –sem raça definida, ... dado inexistente, - negativo