



Efectos de amitraz más *Parapoxvirus ovis* sobre EGF, VEGF, IGF-1 e IGF-2 en la demodicosis generalizada canina

F. Gul Yarim^{1*} ; Didem Pekmezci² ; Murat Yarim³ ; B. Bugrahan Yagci⁴ ;
Ayris Gokceoglu¹ ; Mahmut Sozmen³ ; G. Zafer Pekmezci⁵ ; Efe Karaca³ ; Murat Guzel² .

¹Universidad Ondokuz Mayıs, Facultad de Medicina Veterinaria, Departamento de Bioquímica, Samsun, Turkey.

²Universidad Ondokuz Mayıs, Facultad de Medicina Veterinaria, Departamento de Medicina Interna, Samsun, Turkey.

³Universidad Ondokuz Mayıs, Facultad de Medicina Veterinaria, Departamento de Patología, Samsun, Turkey.

⁴Universidad Kirikkale, Facultad de Medicina Veterinaria, Departamento de Medicina Interna, Kirikkale, Turkey.

⁵Universidad Ondokuz Mayıs, Facultad de Medicina Veterinaria, Departamento de Ciencias Preclínicas, Samsun, Turkey.

*Correspondencia: gulyarim@omu.edu.tr

Recibido: Noviembre 2021; Aceptado: Julio 2022; Publicado: Septiembre 2022.

RESUMEN

Objetivo. El propósito del estudio es investigar el efecto del tratamiento con amitraz más *Parapoxvirus ovis* (IPPVO) sobre las concentraciones séricas y las expresiones cutáneas del factor de crecimiento insulínico (IGF) -1 y -2, factor de crecimiento epidérmico (EGF), vascular factor de crecimiento endotelial (VEGF), en perros que padecen demodicosis generalizada (GD). **Materiales y métodos.** A los perros afectados por GD se les inyectó 1 mL de IPPVO los días 0, 2 y 9 por vía subcutánea además del tratamiento con amitraz (0.025%) dos veces por semana durante 80 días. Las concentraciones de IGF-1, IGF-2, EGF y VEGF en suero sanguíneo se midieron mediante un kit de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas específico para caninos. Las expresiones de EGF, VEGF, IGF-1 e IGF-2 en muestras de biopsia de piel se examinaron inmunohistoquímicamente. **Resultados.** Después del tratamiento de los perros con amitraz más-IPPVO en GD, demostramos una reducción significativa tanto en las concentraciones circulantes como en las expresiones cutáneas de EGF, VEGF, IGF-1 e IGF-2, que tienen un papel en la preservación de la integridad de la piel y la herida. curación. **Conclusiones.** Los resultados de este estudio sugieren que IGF-1, IGF-2 EGF y VEGF tienen un papel crucial en la progresión de la GD en perros. Se cree que los hallazgos de este estudio contribuirán al desarrollo de nuevas estrategias para el tratamiento de la GD, que es un problema de salud importante para los perros.

Palabras clave: *Demodex canis*; perro; demodicosis generalizada; factor de crecimiento; piel (Fuente: MeSH).

ABSTRACT

Objective. The purpose of the study is to investigate the effect of treatment with amitraz plus *Parapoxvirus ovis* (IPPVO) on serum concentrations and skin expressions of insulin-like growth factor (IGF)-1 and -2, epidermal growth factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), in dogs

Como citar (Vancouver).

Yarim FG, Pekmezci D, Yarim M, Yagci BB, Gokceoglu A, Sozmen M, et al. Efectos de amitraz más *Parapoxvirus ovis* sobre EGF, VEGF, IGF-1 e IGF-2 en la demodicosis generalizada canina. Rev MVZ Córdoba. 2022; 27(3):e2619. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2619>



©El (los) autor (es) 2022. Este artículo se distribuye bajo los términos de la licencia internacional Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite a otros distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir de su obra de modo no comercial, siempre y cuando den crédito y licencien sus nuevas creaciones bajo las mismas condiciones.

suffering from generalised demodicosis (GD). **Materials and Methods.** GD affected dogs were injected 1 ml *IPPVO* on days 0, 2 and 9 subcutaneously in addition to amitraz (0.025%) treatment twice weekly for 80 days. IGF-1, IGF-2, EGF and VEGF concentrations in blood serum were measured by canine-specific enzyme-linked immunosorbent assay kit. EGF, VEGF, IGF-1, and IGF-2 expressions in skin biopsy specimens were examined immunohistochemically. **Results.** After the treatment of the dogs with amitraz plus-*IPPVO* in GD, we demonstrated a significant reduction in both circulating concentrations and skin expressions of EGF, VEGF, IGF-1, and IGF-2, which have a role in preserving skin integrity and wound healing. **Conclusions.** Results of this study suggest that IGF-1, IGF-2 EGF, and VEGF have a crucial role in the progression of GD in dogs. It is believed that the findings from this study will contribute to the development of new strategies for the treatment of GD, which is an important health problem for dogs.

Keywords: *Demodex canis*; dog; generalized demodicosis; growth factor; skin (Source: MeSH).

INTRODUCCIÓN

La demodicosis es una enfermedad inflamatoria de la piel causada por *Demodex spp.* agentes. *Demodex canis* es uno de los tres ácaros que causan demodicosis en perros (1). La enfermedad se caracteriza por alopecia, eritema, pústulas, descamación y formación de costras en muchas áreas de la piel y puede ocurrir pioderma secundario profundo o superficial. Hay dos formas clínicas de demodicosis: joven y adulta, en ambas formas se puede ver la forma localizada o generalizada. La demodicosis localizada se caracteriza por lesiones relacionadas con la enfermedad en 1 a 5 regiones diferentes del cuerpo, principalmente en la región facial y las extremidades anteriores. Principalmente en perros con un sistema inmunitario débil, la forma localizada progresa a la forma generalizada (2). La demodicosis generalizada provoca reacciones inmunológicas con la inflamación de los folículos pilosos y las glándulas sebáceas en perros, se puede observar furunculosis y dermatitis nodular, y se deteriora la integridad de la piel (3).

La pérdida de la integridad de grandes partes de la piel en perros que padecen GD conduce a un cuadro clínico que puede durar hasta la muerte (2,4). El tratamiento de la enfermedad requiere un proceso muy difícil. Si bien, teniendo el potencial de toxicidad dentro de las dificultades de aplicación, un inhibidor de la monoaminooxidasa y la molécula agonista $\alpha 2$ amitraz todavía se usan de manera efectiva en el tratamiento de la demodicosis en perros, además de lactonas macrocíclicas y metaflumizonas (5,6). Se ha encontrado que el uso de *Parapoxvirus ovis* (*IPPVO*) para estimular el sistema inmunitario no específico en combinación con amitraz en el tratamiento de la GD en perros proporciona un mejor éxito en el tratamiento (7).

Hay una serie de estudios científicos que muestran que los cambios en los niveles de proteína sérica y las expresiones cutáneas de los factores de crecimiento tienen un papel en la recuperación de heridas con el deterioro de la integridad de la piel (8,9,10,11,12,13). Factor de Crecimiento Epidérmico (EGF) acelera la recuperación de heridas estimulando la proliferación de fibroblastos, acelerando la formación de tejido de granulación, aumentando la epitelización y estimulando la formación de nuevos vasos (14). La administración de EGF tiene un efecto curativo en las heridas del pie diabético (15,16). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), un subtipo de la familia de factores de crecimiento derivados de plaquetas, es producido por queratinocitos (17), células mesangiales renales (18) y células tumorales (19). VEGF participa en funciones fisiológicas normales, como la formación ósea, la recuperación de heridas y el crecimiento (20,21). Se sugiere que VEGF juega un papel en la formación vascular, que tiene un papel importante en la recuperación de heridas (22). El IGF2 está asociado con muchas condiciones patológicas de la edad adulta, como enfermedades de la piel (23), proceso de cicatrización de heridas (24) y enfermedades tumorales (25). La alta expresión de IGF2 en el proceso de recuperación de la piel está asociada con la diferenciación y función de los fibroblastos (8). Los estudios científicos que investigan la expresión de los factores de crecimiento y los niveles de proteínas en la demodicosis canina con alteración de la integridad de la piel son bastante limitados (26,27,28). Por lo tanto, el objetivo del presente estudio fue demostrar los efectos de amitraz más *IPPVO* en los niveles de proteína sérica y las expresiones cutáneas de EGF, VEGF, IGF-1 e IGF-2 en perros que padecen GD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales materiales. Se inscribieron en el estudio diez perros de propiedad de clientes entre 6 y 10 meses de edad, de diferentes razas y de cualquier sexo, que se presentaron en el Hospital Veterinario Docente. La demodicosis generalizada se diagnosticó mediante examen clínico y se confirmó mediante exámenes parasitológicos en muestras de raspado profundo. Además, el examen histopatológico de especímenes de biopsia de tejido recolectados para la determinación de factores de crecimiento por inmunohistoquímica también confirmó el diagnóstico parasitológico.

Ética. Se informó a los dueños de los perros sobre el procedimiento de tratamiento y se proporcionaron formularios de consentimiento firmados. Todos los experimentos se realizaron después de la aprobación del Comité de Ética Local de la Universidad Ondokuz Mayıs para experimentos con animals (2015/09).

Parasitológico investigación. Para los exámenes parasitológicos, el día anterior al tratamiento (día 0), se tomaron muestras de raspado profundo ($\sim 4 \text{ cm}^2$) de la parte superior de las áreas afectadas de las patas de cada perro. Antes de raspar para expulsar los ácaros de las profundidades de los folículos pilosos, se realizaba un raspado profundo de la piel apretando la piel. Posteriormente se raspó con bisturí la zona indicada hasta que se produjo sangrado capilar (29). El material se transfirió a un portaobjetos de microscopio, se goteó aceite mineral sobre él, se cubrió con un cubreobjetos de vidrio y se examinó bajo un microscopio óptico con un aumento de 100X para contar el número de huevos, larvas, ninfas y adultos formas de *D. canis* (2). Al día 80 se rasparon nuevamente las mismas áreas y se realizaron exámenes parasitológicos.

Protocolo de tratamiento y muestreo. Se tomó sangre venosa de 5 mL de la vena cefálica en un vacutainer sin anticoagulante para análisis bioquímico. Se realizó la centrifugación de las muestras de sangre a 1550 g durante 10 min a 4°C para separar el suero. Se almacenaron en invernadero a -80°C para los análisis. Se utilizaron muestras de biopsia de piel con sacabocados de seis milímetros para la toma de muestras (30). Después de recortar y limpiar, se aplicaron subcutáneamente 2 mililitros de lidocaína inyectable al 2% en el área objetivo. Solo se seleccionó un sitio lesionado para tomar muestras

de los perros con GD antes del tratamiento y después, las muestras de biopsia de la piel se fijaron en formalina al 10% para el examen histológico e inmunohistoquímico de rutina. Se registraron los sitios de biopsia en cada animal. Después de la recuperación completa (80 días después del tratamiento) se eligieron diferentes sitios para el muestreo de control. El protocolo anterior se realizó para recolectar las muestras de control. Los perros diagnosticados como GD fueron tratados de acuerdo con un protocolo estándar informado por Pekmezci et al (7).

Exámenes histopatológicos. Después de la fijación con formalina al 10% e inclusión en parafina, se cortaron secciones de 5-6 μm de espesor. Se examinaron secciones de los tejidos utilizando un microscopio (Nikon Eclipse E600, Nikon Instruments Inc., Tokio, Japón) después de teñirlos con hematoxilina y eosina. Se prepararon secciones adicionales para los siguientes exámenes inmunohistoquímicos.

Exámenes inmunohistoquímicos. Para determinar la inmunopositividad se utilizó el kit complejo estreptavidina-biotina peroxidasa (SABC; Zymed Laboratories, Inc.; San Francisco, CA, USA). Las secciones de parafina se sembraron en portaobjetos recubiertos con 3-aminopropiltrietoxisilano (APES). Las secciones desparafinadas dos veces en xileno se pasaron por series de etanol absoluto, al 96 % y al 70 % para su rehidratación. Todos los pasos se llevaron a cabo en un ambiente húmedo y a temperatura ambiente. En los lavados se utilizó tampón fosfato (pH 7,4). Las secciones se mantuvieron en metanol con H_2O_2 al 3% durante 10 min. para la inhibición de la actividad de la peroxidasa endógena y luego se calentaron en un horno de microondas a 600 vatios con solución de recuperación de antígeno tamponada con citrato (pH 6) para revelar la estructura antigénica que se une a la solución de formaldehído durante 10 min. y enfriado. Las secciones se expusieron a suero de cabra al 5% durante 10 min. y con anticuerpos primarios durante la noche a 4°C de la siguiente manera para evitar la unión antigénica no específica de la siguiente manera: anticuerpos EGF policlonales de conejo (1:100; MBS2003642, My BioSource, Inc. San Diego, CA, USA), anticuerpos VEGF policlonales de conejo (1:50; orb191500, Biorbyt, Cambridge, UK), anticuerpo IGF-1 policlonal de conejo (1:500; orb312277, Biorbyt, Cambridge, UK), anticuerpo IGF-2 policlonal de conejo (1:500; orb10887, Biorbyt, Biorbyt, Cambridge, UK). La reactividad de todos los anticuerpos utilizados contra

especies caninas fue verificada por las empresas que compraron los anticuerpos. Las secciones se incubaron con anticuerpo secundario durante 20 min. y se incubó con HRP durante 20 min. El cromógeno AEC se aplicó durante 5 min. (controlando la reacción del cromógeno bajo un microscopio). El procedimiento de tinción se realizó con solución de hematoxilina de Mayer, luego se lavó con agua destilada y se montó con medio de montaje a base de agua. Se omitieron los anticuerpos primarios de las secciones de control negativo, que se incubaron con suero normal. Se sirvieron tejidos de testículo canino, riñón, páncreas y placenta como control positivo para los anticuerpos primarios EGF, VEGF, IGF-1 e IGF-2, inmunoprespectivamente. El área inmunopositiva se evaluó semicuantitativamente con microscopio (Nikon Eclipse E600, Nikon Instruments Inc., Tokio, Japón).

Análisis ELISA. Los niveles de EGF, VEGF, IGF-1 e IGF-2 en muestras de suero se midieron mediante el método ELISA utilizando kits de prueba ELISA comerciales específicos para perros (MyBioSource, Inc. San Diego, CA, USA) de la siguiente manera: EGF (MBS2605242), VEGF (MBS737581), IGF-1 (MBS041565) e IGF-2 (MBS740813). Las pruebas se llevaron a cabo de acuerdo con el procedimiento del fabricante. De acuerdo con el procedimiento del kit, se utilizaron como controles negativos el diluyente estándar para EGF, el diluyente de muestra para IGF-1 y la solución salina tamponada con fosfato para IGF-2 y VEGF. Los análisis se realizaron simultáneamente por duplicado. La absorbancia del color en la microplaca se registró usando un lector de microplacas (Infinite F50, Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria) y los niveles séricos se calcularon de acuerdo con las concentraciones estándar.

Evaluación estadística. Los datos se analizaron utilizando el programa de paquete estadístico (SPSS Statistics V21.0, IBM Corporation, Armonk, NY). Los resultados se dieron como media \pm desviación estándar. La normalidad se probó mediante la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk. La homogeneidad de las varianzas se evaluó mediante la prueba de Levene. Las diferencias de grupo para EGF, VEGF, IGF-1 e IGF-2 se determinaron utilizando pruebas t de dos colas para muestras independientes. Un valor p mínimo de $<0,05$ se consideró significativo para los hallazgos estadísticos.

RESULTADOS

Después de completar el tratamiento, los perros se recuperaron completamente sin efectos secundarios. Las lesiones de demodicosis generalizada se recuperaron por completo después del protocolo de tratamiento y no se observaron ácaros en investigaciones parasitológicas de muestras de raspado profundo y en exámenes histopatológicos de muestras de biopsia recolectadas para la determinación de factores de crecimiento por inmunohistoquímica.

Concentraciones séricas de EGF, VEGF, IGF-1 e IGF-2. Las concentraciones séricas de EGF, VEGF, IGF-1 e IGF-2 antes y después del tratamiento en perros con GD se presentan en la tabla 1.

Tabla 1. Concentraciones séricas de EGF, VEGF, IGF-1 e IGF-2 antes y después del tratamiento en perros con demodicosis generalizada.

	Antes del tratamiento	Después del tratamiento
EGF (pg/mL)	136.8 \pm 15.2	44.3 \pm 7.0*
VEGF (pg/mL)	164.9 \pm 29.5	17.1 \pm 3.5***
IGF-1 (ng/mL)	206.4 \pm 41.1	71.6 \pm 7.4**
IGF-2 (ng/mL)	79.7 \pm 13.3	20.4 \pm 5.2**

*p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001. Prueba t para muestras independientes.

La concentración de EGF en suero fue de 136.8 \pm 15.2 pg/mL antes del tratamiento y de 44.3 \pm 7.0 pg/mL después del tratamiento. La diferencia fue estadísticamente significativa (p<0.05). Después del tratamiento, el EGF sérico se redujo 3.09 veces. La concentración de VEGF en suero después del tratamiento fue significativamente menor que antes del tratamiento (17.1 \pm 3.5 pg/mL frente a 164.9 \pm 29.5 pg/mL) (p<0.001). El tratamiento de perros que padecían GD provocó una reducción significativa en las concentraciones séricas de VEGF hasta 9.64 veces. El IGF-1 sérico disminuyó significativamente en perros después del tratamiento (71.6 \pm 7.4 ng/mL) en comparación con antes del tratamiento (206.4 \pm 41.1 ng/mL; p<0.01). De manera similar, la concentración de IGF-2 en suero disminuyó después del tratamiento (79.7 \pm 13.3 ng/mL frente a 20.4 \pm 5.2 ng/mL; p<0.01).

Hallazgos histopatológicos. La epidermis en perros con GD se engrosó debido a la proliferación de queratinocitos. Se observaron dilataciones quísticas en folículos pilosos con

epitelio escamoso multicapa. Se encontraron ácaros *D. canis* y residuos queratinosos en la mayoría de los lúmenes del folículo piloso (Figura 1a). Se observaron infiltrados de linfocitos, células plasmáticas, histiocitos y células gigantes alrededor de las glándulas foliculares y sebáceas en las muestras de piel de perros con GD (Figura 1b). Después del tratamiento, se determinó que el grosor de la epidermis volvió a la normalidad y no se encontraron infiltraciones de ácaros *D. canis* ni de células inflamatorias en las secciones.

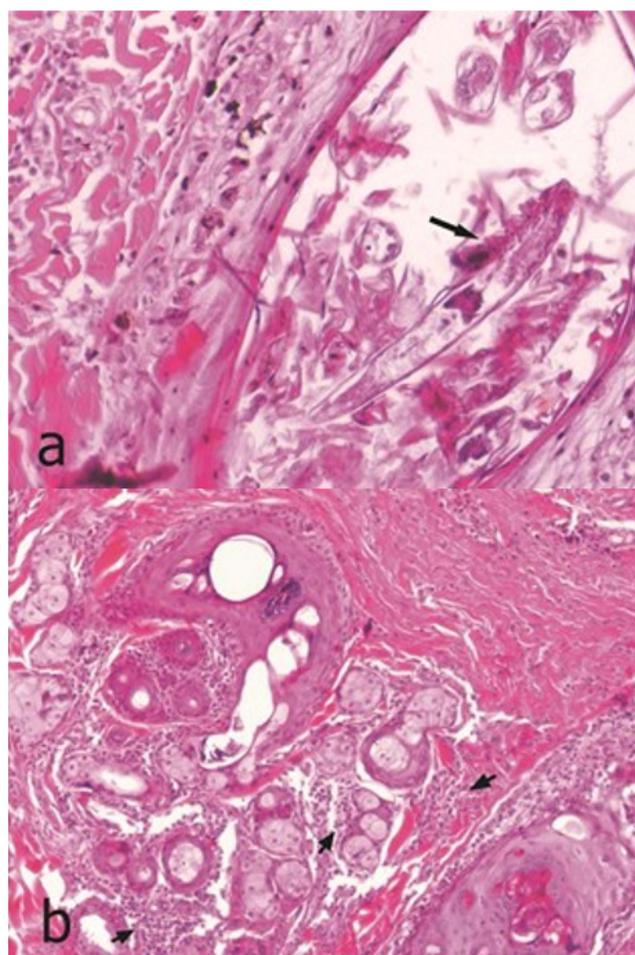


Figura 1. (a) Piel con demodicosis generalizada que muestra luz folicular que contiene ácaros (flecha) y restos queratinosos (b) folliculitis infiltrada con células plasmáticas, linfocitos e histiocitos (flechas). ÉL, un 280x; b 140x.

Hallazgos inmunohistoquímicos

Expresión de EGF en la piel. La inmunotinción de EGF se determinó citoplásmicamente en los queratinocitos de la epidermis en secciones de piel tomadas antes y después del tratamiento. La expresión de EGF citoplasmático aumentó (22.7 ± 5.4) en los queratinocitos de la epidermis antes del tratamiento (Figura 2a), pero después del tratamiento, tanto la intensidad de la tinción como el número de queratinocitos teñidos disminuyeron (4.6 ± 0.6) ($p < 0.01$) (Figura 2b).

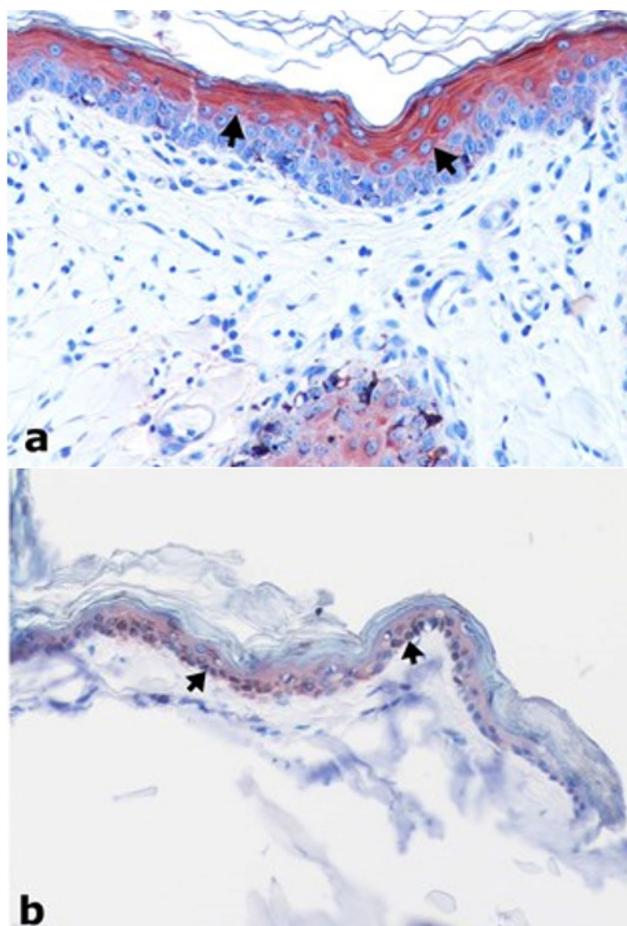


Figura 2. (a) Inmunotinción intensa de EGF (flechas) en queratinocitos antes del tratamiento (b) Inmunotinción débil de EGF (flechas) en queratinocitos después del tratamiento. Inmunotinción SABP, cromógeno AEC, contratinción de hematoxilina de Mayer, 560x.

Expresión de VEGF en la piel. La inmunopositividad de VEGF se determinó citoplásmicamente en queratinocitos en la epidermis antes y después del tratamiento. En las tinciones inmunohistoquímicas de VEGF realizadas en secciones de pretratamiento de piel de perro con GD, las expresiones citoplasmáticas de VEGF fueron altas en los queratinocitos en la epidermis (Figura 3a), pero después del tratamiento, tanto la intensidad de la tinción como el número de queratinocitos teñidos disminuyeron (23.8 ± 4.3 vs. 3.2 ± 0.4 , $p < 0.01$) (Figura 3b). Además, las expresiones de VEGF se observaron intensamente en células endoteliales vasculares recién formadas y fibroblastos en la dermis del área inflamatoria antes de las secciones pretratadas de piel de perro con GD (Figura 3c), mientras que no se observó expresión en células endoteliales vasculares y fibroblastos en el dermis después del tratamiento (Figura 3d).

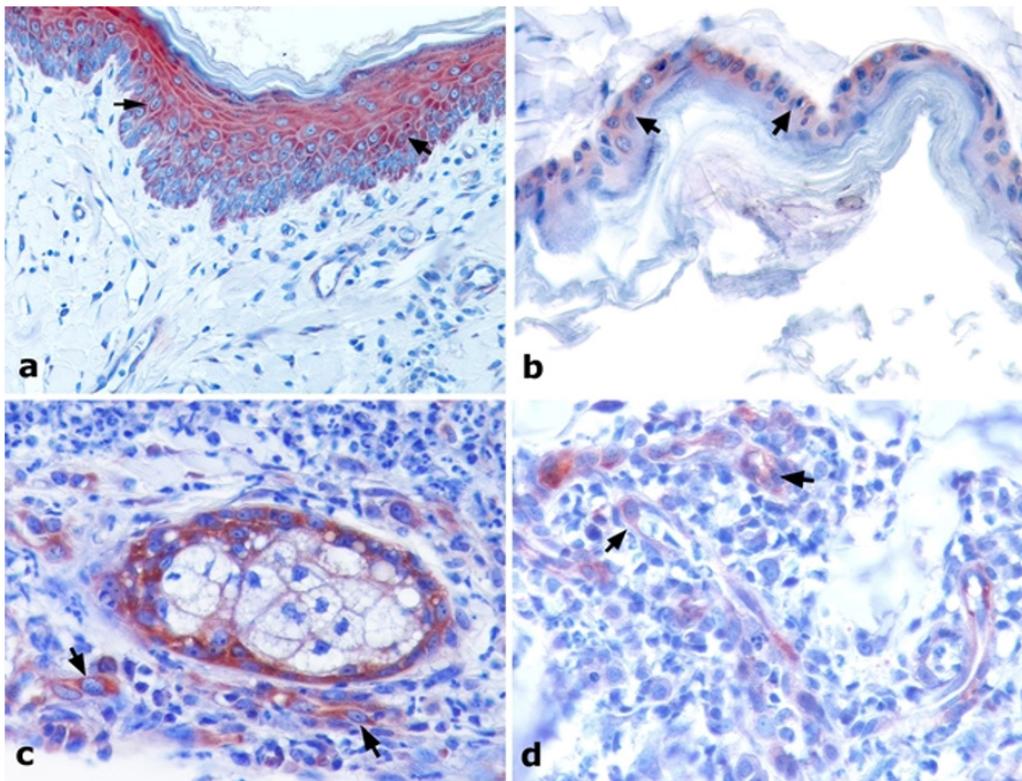


Figura 3. (a) Inmunotinción intensa de VEGF (flechas) en queratinocitos antes del tratamiento (b) Inmunopositividad débil de VEGF (flechas) en queratinocitos después del tratamiento, (c) inmunopositividad de VEGF en células epiteliales alrededor de fibroblastos (flechas) en la dermis y las glándulas sebáceas (d) Inmunopositividad de VEGF (flechas) en las células endoteliales vasculares de la dermis. Inmunotinción SABP, cromógeno AEC, contratinción de hematoxilina de Mayer, a y b 20x; c y d 560x.

Expresión de IGF-1 en la piel. Se observó inmunopositividad de IGF-1 citoplasmático en queratinocitos en la epidermis tanto antes como después del tratamiento (Figura 4a). Después del tratamiento, las expresiones de IGF-1 se

redujeron significativamente en términos de intensidad de tinción y cantidad de queratinocitos en comparación con los niveles previos al tratamiento (20.5 ± 3.8 frente a 5.7 ± 1.8 ; $p < 0.05$) (Figura 4b).

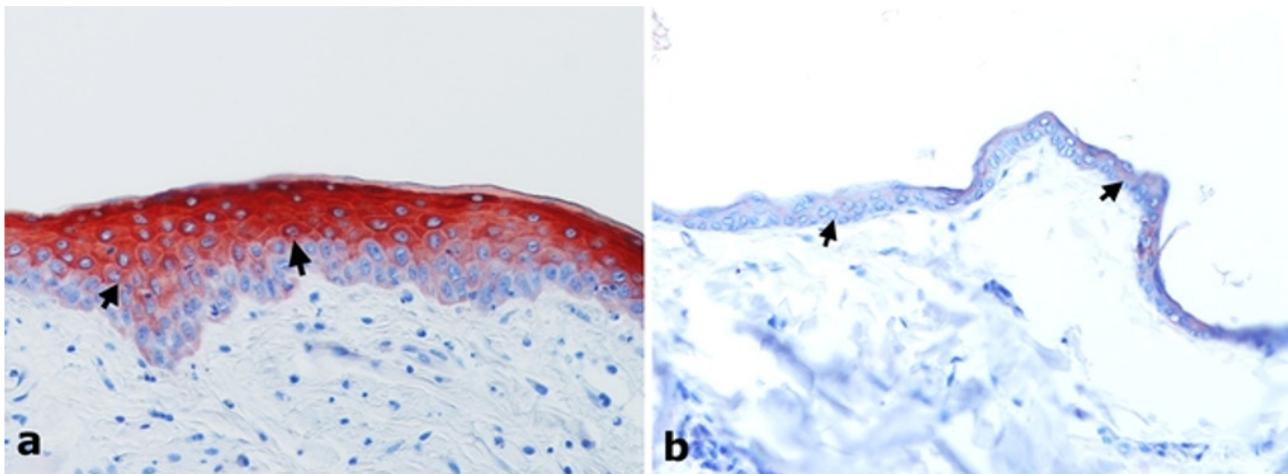


Figura 4. (a) Inmunotinción intensa de IGF-1 (flechas) en queratinocitos en la epidermis antes del tratamiento, (b) Inmunotinción débil de EGF (flechas) en queratinocitos después del tratamiento. Inmunotinción SABP, cromógeno AEC, contratinción de hematoxilina de Mayer, a y b 280x.

Expresión de IGF-2 en la piel. Antes y después del tratamiento, se observaron expresiones citoplasmáticas de IGF-2 en queratinocitos en la epidermis. La intensidad y la cantidad de inmunotinción de IGF-2 en los queratinocitos aumentaron antes del tratamiento (34.5 ± 4.0) (Figura 5a) y disminuyeron después del

tratamiento (3.0 ± 0.4 ; $p < 0.001$) (Figura 5b). Además, antes del tratamiento se observaron células epiteliales en la pared de la luz de los folículos pilosos e inmunotinción de macrófagos en la región intersticial (Figura 5c) mientras que en las secciones de piel después del tratamiento no se observaron (Figura 5d).

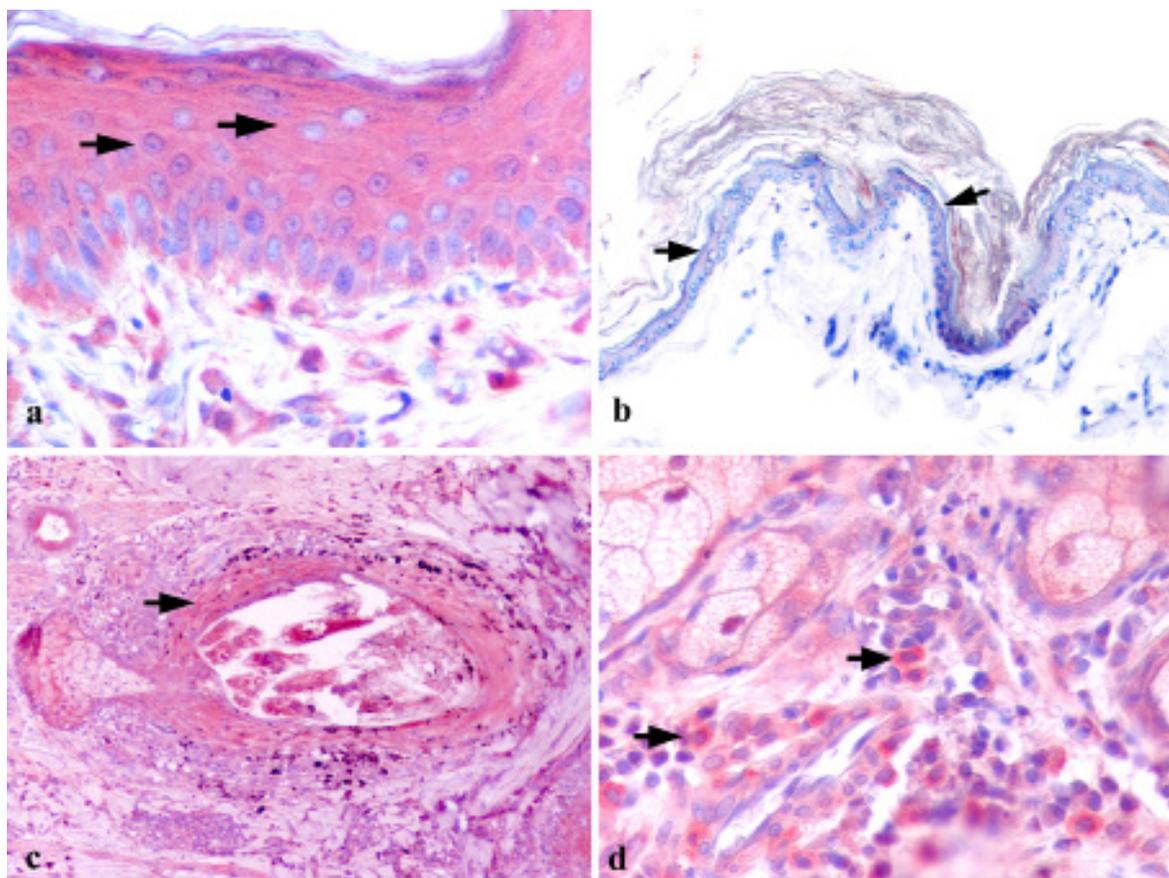


Figura 5. (a) Inmunotinción intensa de IGF-2 (flechas) en queratinocitos antes del tratamiento, (b) Inmunotinción débil de IGF-2 (flechas) en queratinocitos después del tratamiento, (c) Inmunopositividad de IGF-2 en el epitelio del folículo piloso (flecha) y (d) Inmunopositividad de IGF-2 en macrófagos en la dermis (flechas). inmunotinción SABP, cromógeno AEC, contratinción de hematoxilina de Mayer, a, b y c 280x; 560x.

DISCUSIÓN

La demodicosis generalizada es uno de los problemas dermatológicos más comunes en perros, a menudo asociada con dermatitis nodular, perifoliculitis, foliculitis y furunculosis (2). La respuesta inmunitaria cutánea local se estimula en las lesiones dérmicas que progresan desde la perifoliculitis hasta la furunculosis en perros con GD (3). La relación entre las respuestas inmunes en la piel y los diferentes mecanismos celulares y moleculares tienen un papel crucial en la reparación de la piel y la curación de la enfermedad. Aunque

se han llevado a cabo estudios para dilucidar los mecanismos moleculares en el proceso de curación de las heridas de la piel (10,12), los mecanismos complejos aún son muy desconocidos. A pesar de la creciente evidencia de los efectos de los factores de crecimiento en el proceso de reparación de la piel, el posible efecto del tratamiento sobre el cambio en los factores de crecimiento circulantes y/o de la piel en perros con GD aún no se ha investigado completamente. El propósito del presente estudio fue demostrar los niveles de expresión tanto circulantes como cutáneos de IGF-1, IGF-2, EGF y VEGF en los perros con GD tratados con amitraz más IPPVO.

Nuestros hallazgos inmunohistoquímicos en los perros con GD mostraron que los altos niveles de inmunopositividad en los queratinocitos antes del tratamiento se redujeron significativamente después del tratamiento. Además, en el presente estudio, los niveles séricos elevados de EGF en los perros con GD se redujeron significativamente ($p < 0.05$) después del tratamiento. Por lo tanto, estos hallazgos indican que EGF tiene un efecto de contribución del proceso de regeneración epitelial en perros con GD.

El VEGF desempeña un papel en funciones fisiológicas como la hematopoyesis, la formación ósea, el crecimiento y la cicatrización de heridas (20,21); también se informó su relación con la progresión tumoral (31). El VEGF muestra su efecto sobre la cicatrización de heridas a través de la mejora de la neovascularización (11,22). La relación entre la expresión de VEGF y la angiogénesis en el proceso de cicatrización también se informó en un modelo de heridas en ratas (32). Nuestros resultados inmunohistoquímicos en el presente estudio mostraron que el alto nivel de inmunopositividad de VEGF observado en los queratinocitos antes del tratamiento mostró una disminución significativa después del tratamiento. De manera similar, el valor de VEGF en suero, en comparación con el nivel de VEGF obtenido en el pretratamiento (17.1 ± 3.5 pg/mL), también disminuyó 9,64 veces después del tratamiento (164.9 ± 29.5 pg/mL) con una diferencia significativa ($p < 0.001$). Después del tratamiento, se determinó que el nivel de VEGF en suero en perros estaba cerca de los valores de VEGF en suero informados anteriormente en perros sanos (11.14 pg/mL) (33) y (14.9 pg/mL) (34). Mukorera et al (35) postularon que la concentración de VEGF circulante en perros con espirocercosis neoplásica era mayor que en los no neoplásicos y sanos.

Se demostró una asociación de IGF-1 con los trastornos de la piel y la cicatrización de heridas (23). En nuestro estudio, la concentración sérica de IGF-1 disminuyó ($p < 0.01$) en el postratamiento en comparación con el pretratamiento. Este hallazgo sugiere que el tratamiento exitoso con una combinación de amitraz más *IPPVO* tiene un efecto decreciente en el nivel de proteína circulante de IGF-1 en perros con GD. Además, se ha sugerido que IGF-1 tiene una actividad mitogénica en el crecimiento y regeneración de células epidérmicas (36). Los estudios han demostrado que las expresiones de IGF-1 e IGF-2 aumentan durante el proceso de

cicatrización de heridas en el momento en que los fibroblastos dominan (8). Además, nuestros hallazgos inmunohistoquímicos mostraron una disminución significativa en la expresión de IGF-1 después del tratamiento que aumentó antes del tratamiento en la piel de los perros con GD. Anteriormente informamos que el aumento de la expresión tisular y la concentración sérica de IGF-2 podría deberse a la proliferación de células nuevas, como los queratinocitos y los fibroblastos, durante el proceso de reparación de la piel en GD canina (28). El análisis inmunohistoquímico del presente estudio mostró una fuerte localización intracitoplasmática del IGF-2 en los queratinocitos, histocitos y fibroblastos del tejido de la piel en perros con GD. Además, se sabe que el IGF-2 sintetizado localmente contribuye a la vasculogénesis posnatal mediante la proliferación de células progenitoras endoteliales (37). Como resultado de este estudio, se determinó que los niveles de IGF-2 disminuyeron tanto en la concentración sérica ($p < 0.01$) como en la expresión cutánea después del tratamiento en perros con GD. De hecho, el aumento de los niveles previos al tratamiento de los niveles de expresión sérica y tisular de IGF-2 en perros con GD puede explicarse por la proliferación de nuevas células de queratinocitos y fibroblastos relacionados con los daños en la piel.

El presente estudio reveló que los queratinocitos en la epidermis sana expresan factores de crecimiento estudiados, incluidos EGF, VEGF, IGF-1 e IGF-2. Sin embargo, sus expresiones aumentaron significativamente en perros que padecían GD y sus niveles de expresión disminuyeron después del tratamiento. En consecuencia, este estudio demostró que el tratamiento con *IPPVO* y amitraz en perros que padecían GD dio como resultado una reducción significativa en los niveles de proteína sérica y las expresiones cutáneas de EGF, VEGF, IGF-1 e IGF-2. Los niveles elevados de proteínas séricas y su elevación simultánea en la epidermis de estos factores de crecimiento podrían ser parte del proceso de curación de la epidermis afectada por GD. Podría postularse que, después del tratamiento, estos factores ya no eran necesarios para la epidermis curada y, por lo tanto, regresaron a su nivel normal. Estos cambios no se consideraron específicos del principio activo utilizado para el tratamiento ni relacionados con la propia enfermedad. Por lo tanto, el estudio presentado brinda datos importantes sobre los efectos de los factores de crecimiento en esta desafiante enfermedad en perros y requiere más investigación.

Agradecimientos

Este estudio fue financiado por la Oficina de Gestión de Proyectos de la Universidad Ondokuz Mayıs (PYO.VET.1901.16.007).

Conflicto de intereses

Los autores de este artículo declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

- Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ, Affolter VK. Skin Diseases of the Dog and Cat. Clinical and Histopathologic Diagnosis. Blackwell Publishing: UK; 2005.
- Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Parasitic skin diseases. Small animal dermatology. Muller GH and Kirk RW (eds), W.B. Saunders Co: Philadelphia; 2001.
- Day MJ. An immunohistochemical study of the lesions of demodicosis in the dog. J Comp Pathol. 1997; 116:203-216. [https://doi.org/10.1016/S0021-9975\(97\)80077-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9975(97)80077-1)
- Shipstone M. Generalised demodicosis in dogs, clinical perspective. Aust Vet J. 2000; 78:240-242. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2000.tb11741.x>
- Tarallo VD, Lia RP, Sasanelli M, Cafarchia C, Otranto D. Efficacy of Amitraz plus Metaflumizone for the treatment of canine demodicosis associated with *Malassezia pachydermatis*. Parasit Vectors. 2009; 2:13. <http://https://doi.org/10.1186/1756-3305-2-13>
- Fourie J, Dumont P, Halos L, Beugnet F, Pollmeier M. Efficacy of a topical application of Certifect(R) (fipronil 6.26% w/v, amitraz 7.48% w/v, (S)-methoprene 5.63% w/v) for the treatment of canine generalized demodicosis. Parasite 2013; 20:46. <https://doi.org/10.1051/parasite/2013046>
- Pekmezci D, Pekmezci GZ, Guzel M, Cenesiz S, Gurler AT, Gokalp G. Efficacy of amitraz plus inactivated *Parapoxvirus ovis* in the treatment of canine generalised demodicosis. Vet Rec. 2014; 174:556. <https://doi.org/10.1136/vr.102226>
- Gartner MH, Benson JD, Caldwell MD. Insulin-like growth factors I and II expression in the healing wound. J Surg Res. 1992; 52:389-394. [https://doi.org/10.1016/0022-4804\(92\)90121-F](https://doi.org/10.1016/0022-4804(92)90121-F)
- Corral CJ, Siddiqui A, Wu L, Farrell CL, Lyons D, Mustoe TA. Vascular endothelial growth factor is more important than basic fibroblastic growth factor during ischemic wound healing. Arch Surg. 1999; 134:200-205. <http://dx.doi.org/10.1001/archsurg.134.2.200>
- Gibbs S, Silva Pinto AN, Murli S, Huber M, Hohl D, Ponc M. Epidermal growth factor and keratinocyte growth factor differentially regulate epidermal migration, growth, and differentiation. Wound Repair Regen. 2000; 8:192-203. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.2000.00192.x>
- Bao P, Kodra A, Tomic-Canic M, Golinko MS, Ehrlich HP, Brem H. The role of vascular endothelial growth factor in wound healing. J Surg Res. 2009; 153:347-358. <https://doi.org/10.1016/j.jss.2008.04.023>
- Shirakata Y. Regulation of epidermal keratinocytes by growth factors. J Dermatol Sci. 2010; 59:73-80. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2010.05.002>
- Talebpour Amiri F, Fadaei Fathabadi F, Mahmoudi Rad M, Piryae A, Ghasemi A, Khalilian A, Yeganeh F, Mosaffa N. The effects of insulin-like growth factor-1 gene therapy and cell transplantation on rat acute wound model. Iran Red Crescent Med J. 2014; 16(10):e16323. <https://doi.org/10.5812/ircmj.16323>

14. Wu Z, Tang Y, Fang H, Su Z, Xu B, Lin Y, Zhang P, Wei X. Decellularized scaffolds containing hyaluronic acid and EGF for promoting the recovery of skin wounds. *J Mater Sci Mater Med*. 2015; 1:5322. <https://doi.org/10.1007/s10856-021-06531-9>
15. Acosta JB, Savigne W, Valdez C, Franco N, Alba JS, del Rio A, López-Saura P, Guillén G, Lopez E, Herrera L, Fernández-Montequín J. Epidermal growth factor intralesional infiltrations can prevent amputation in patients with advanced diabetic foot wounds. *Int Wound J*. 2006; 3:232-239. <https://doi.org/10.1111/j.1742-481X.2006.00237.x>
16. Hong JP, Jung HD, Kim YW. Recombinant human epidermal growth factor (EGF) to enhance healing for diabetic foot ulcers. *Ann Plast Surg*. 2006; 56:394-398. <https://doi.org/10.1097/01.sap.0000198731.12407.0c>
17. Frank S, Hübner G, Breier G, Longaker MT, Greenhalgh DG, Werner S. Regulation of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. Implications for normal and impaired wound healing. *J Biol Chem*. 1995; 270:12607-12613. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.21.12607>
18. Iijima K, Yoshikawa N, Connolly DT, Nakamura H. Human mesangial cells and peripheral blood mononuclear cells produce vascular permeability factor. *Kidney Int*. 1993; 44:959-966. <https://doi.org/10.1038/ki.1993.337>
19. Boocock CA, Charnock-Jones DS, Sharkey AM, McLaren J, Barker PJ, Wright KA, Twentymen PR, Smith SK. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors flt and KDR in ovarian carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1995; 87:506-516. <https://doi.org/10.1093/jnci/87.7.506>
20. Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med*. 1999; 6:623-628. <https://doi.org/10.1038/9467>
21. Bates DO, Beazley-Long N, Benest AV, Ye X, Ved N, Hulse RP, Barratt S, Machado MJ, Donaldson LF, Harper SJ, Peiris-Pages M, Tortonese DJ, Oltean S, Foster RR. Physiological role of vascular endothelial growth factors as homeostatic regulators. *Compr Physiol*. 2018; 8:955-979. <https://doi.org/10.1002/cphy.c170015>
22. Zachary I. Molecules in focus VEGF. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998; 30:1169-1174. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00082-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00082-X)
23. Yoo H, Kim SJ, Kim Y, Lee H, Kim TY. Insulin-like growth factor-II regulates the 12-lipoxygenase gene expression and promotes cell proliferation in human keratinocytes via the extracellular regulatory kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39:1248-1259. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2007.04.009>
24. Bohnsack RN, Warejcka DJ, Wang L, Gillespie SR, Bernstein AM, Twining SS, Dahms NM. Expression of insulin-like growth factor 2 receptor in corneal keratocytes during differentiation and in response to wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2014; 55:7697-7708. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-15179>
25. Dong ZZ, Yao M, Qian J, Yan XD, Chen J, Yan MJ, Yao NH, Yao DF. Abnormal expression of insulin-like growth factor-II and intervening of its mRNA transcription in the promotion of HepG2 cell apoptosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2013; 93:892-896. <https://doi.org/10.3760/cma.j.isn.0376-2491.2013.12.004>
26. Tani K, Morimoto M, Hayashi T, Inokuma H, Ohnishi T, Hayashiya S, Nomura T, Une S, Nakaichi M, Taura Y. Evaluation of cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells from dogs with canine demodicosis. *J Vet Med Sci*. 2002; 64:513-518. <https://doi.org/10.1292/jvms.64.513>
27. Yarim GF, Yagci BB, Ciftci G. Increased circulating concentrations of PDGF-BB and TGF- β 1 in canine generalised demodicosis. *Rev Med Vet*. 2013; 164:13-17.

28. Yarim GF, Yagci BB, Yarim M, Sozmen M, Pekmezci D, Cenesiz S, Pekmezci GZ, Karaca E. Serum concentration and skin tissue expression of insulin-like growth factor 2 in canine generalized demodicosis. *Vet Dermatol.* 2015; 26: 421–e99. <https://doi.org/10.1111/vde.12270>
29. Pereira AV, Pereira SA, Gremião IDF, Campos MP, Ferreira AMR. Comparison of acetate tape impression with squeezing versus skin scraping for the diagnosis of canine demodicosis. *Aust Vet J.* 2012; 90:448-450. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2012.00994.x>
30. Kuznetsova E, Bettenay S, Nikolaeva L, Majzoub M, Mueller R. Influence of systemic antibiotics on the treatment of dogs with generalized demodicosis. *Vet Parasitol.* 2012; 188:148-155. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.02.023>
31. Lu Z, Weniger M, Jiang K, Boeck S, Zhang K, Bazhin A, Miao Y, Werner J, D'Haese JG. Therapies targeting the tumor stroma and the VEGF/VEGFR axis in pancreatic ductal adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Target Oncol.* 2018; 13:447-459. <https://doi.org/10.1007/s11523-018-0578-x>
32. Wu Q, Wang JH, Li ZQ, Ren JL, Wu YH. Expression of vascular endothelial growth factor in deep second-degree scald wounds in rats. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao.* 2014; 36:650-653. <https://doi.org/10.3881/j.issn.1000-503X.2014.06.017>
33. Sobczyńska-Rak A, Polkowska I, Silmanowicz P. Elevated Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) levels in the blood serum of dogs with malignant neoplasms of the oral cavity. *Acta Vet Hung.* 2014; 62:362-371. <https://doi.org/10.1556/avet.2014.009>
34. Balicki I, Sobczyńska-Rak A. Serum vascular endothelial growth factor concentration in dogs diagnosed with chronic superficial keratitis. *Acta Vet Hung.* 2014; 62:22-32. <https://doi.org/10.1556/avet.2013.040>
35. Mukorera V, Kirberger RM, Mabeta P, Dvir E. Vascular endothelial growth factor concentrations in dogs with spirocercosis. *J Vet Intern Med.* 2013; 27:1642-1645. <https://doi.org/10.1111/jvim.12179>
36. Neely EK, Morhenn VB, Hintz RL, Wilson DM, Rosenfeld RG. Insulin-like growth factors are mitogenic for human keratinocytes and a squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol.* 1991; 96:104-110. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12515914>
37. Maeng YS, Choi HJ, Kwon JY, Park YW, Choi KS, Min JK, Kim YH, Suh PG, Kang KS, Won MH, Kim YM, Kwon YG. Endothelial progenitor cell homing: prominent role of the IGF2-IGF2R-PLCbeta2 axis. *Blood.* 2009; 113:233-243. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-06-162891>