

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

LUCAS ANDRÉ LUDWIG

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AO EXTRATO BRUTO DE
DERMATOPHAGOIDES FARINAE E SEUS ALÉRGENOS DERIVADOS, DER F 2 E
ZEN 1, EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA**

CURITIBA

2018

LUCAS ANDRÉ LUDWIG

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AO EXTRATO BRUTO DE
DERMATOPHAGOIDES FARINAE E SEUS ALÉRGENOS DERIVADOS, DER F 2 E
ZEN 1, EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Clínica e Cirurgia Veterinária, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias

CURITIBA

2018

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS	vi
FORMATO DA DISSERTAÇÃO	vii
RESUMO GERAL	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE GRÁFICOS	xi
LISTA DE TABELAS	xxii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
CAPITULO 1	1
1 BREVE REVISÃO SOBRE DERMATITE ATÓPICA CANINA	1
2 BIOLOGIA E ECOLOGIA DOS ÁCAROS DE POEIRA DOMÉSTICA	4
3 ALÉRGENOS DE ÁCAROS DE POEIRA DOMÉSTICA	10
4 ALÉRGENOS DO GRUPO 2	13
5 RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS FRENTE AOS ÁCAROS DE POEIRA DOMÉSTICA	15
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O CAPÍTULO 1	17
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 2	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
Critérios de inclusão	26
Critérios de exclusão	26
Obtenção de amostras de soro	26
Coleta de informações ambientais	26
ELISA	26
<i>Imobilização antigênica</i>	26
<i>Bloqueio</i>	27
<i>Preparação e incubação das amostras de soro dos cães</i>	27
<i>Preparação e incubação dos anticorpos</i>	27

<i>Reação enzima-substrato</i>	27
<i>Leitura da absorvância</i>	27
Análise estatística	27
RESULTADOS	28
Dados epidemiológicos	28
Sorologia	28
Alérgenos e contato com materiais ambientais	31
DISCUSSÃO	31
REFERÊNCIAS	36
CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
APÊNDICES	42
APÊNDICE A	43
ANEXOS	45
ANEXO A	46
ANEXO B	47

Dedico este trabalho à minha avó, Ana Cecília Marchiori

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

Agradeço aos meus pais, Darci José Ludwig e Leni Maria Ludwig, pelo apoio incondicional durante o período. Este apoio foi fundamental para manter-me em pé em cada passo.

Obrigado ao meu orientador, Prof Dr. Marconi Rodrigues de Farias, por primeiramente acreditar em mim para ser seu orientado. Por todos os enormes conhecimentos passados ao longo do período, pelas oportunidades, pelo respeito, pela educação, pelo bom humor. Muito obrigado.

Um agradecimento especial também à Juliane Possebom pela confiança e incentivo. Ju, se não fosse você talvez este trabalho não existiria.

Obrigado a todo o pessoal da Clínica Veterinária Escola da PUCPR, principalmente os professores, residentes, alunos e demais funcionários. Um obrigado especial à Jéssica Fagundes, do Laboratório de Patologia Clínica, pela paciência e ajuda com a separação das amostras.

Agradeço também a todos da Clínica Dermatovet: Elaine Oliveira, Suzana Solomon e, em especial, a Polyanne Schmidlin, pelos ensinamentos, paciência, atenção e amizade.

Obrigado a todos meus novos amigos que Curitiba me deu, amigos que espero levar para a vida toda.

Obrigado à Larissa Condas, pela suporte estatístico e paciência para sanar eventuais dúvidas.

Agradeço ao pessoal da Zenoaq no Japão: Nobuyuki, Myuki, Toshiroh Tsukui e todos os outros, pela recepção, acolhimento, respeito e prontidão em sempre ajudar e responder os questionamentos, além, é claro, de financiar parte do estudo.

Obrigado à Caroline Nocera, da secretaria da PPGCA, pela organização, ajuda e compreensão.'

Obrigado também aos professores José Ademar Villanova Junior e Pedro Vicente Michelotto Júnior, pelas correções e sugestões durante a banca de qualificação.

Agradeço, por fim, a Capes, pelo apoio financeiro ao projeto.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é formada por capítulos. O capítulo 1 trata-se de uma revisão de literatura sobre ácaros de poeira doméstica. O capítulo 2 trata-se de artigo científico completo, com referências, e nas normas do periódico o qual será submetido (Veterinary Dermatology). O capítulo 3 finaliza com conclusões gerais sobre o trabalho. As referências encontram-se ao final de cada capítulo.

RESUMO GERAL

Dermatite atópica é uma doença cutânea inflamatória, pruriginosa, geneticamente predisposta, com sinais clínicos característicos e geralmente associada a produção de anticorpos IgE contra alérgenos ambientais, como pólenes, fungos e de ácaros de poeira, principalmente as espécies *D. pteronyssinus* e *D. farinae*. O objetivo deste estudo foi determinar a sensibilidade ao extrato bruto de *D. farinae* e seus alérgenos Der f 2 e Zen 1, em cães com dermatite atópica. Para isto, foram selecionados 100 cães com diagnóstico clínico de dermatite atópica após exclusão de outras dermatopatias pruriginosas, excluindo-se cães submetidos à imunoterapia alérgeno específica ou não-específica. Os cães eram de diferentes raças e idades e oriundos do serviço de dermatologia veterinária da Clínica Veterinária Escola da PUCPR e da Clínica de Dermatologia e Alergia Veterinária Dermatovet, ambas situadas em Curitiba-PR. No momento da anamnese, perguntas foram realizadas a fim de saber a possibilidade destes cães terem contato com mobília e material têxtil que possam abrigar ácaros de poeira doméstica. Amostras de sangue de cada cão foram coletadas e o soro foi obtido, congelado e enviado ao laboratório Zenoaq, localizado em Koryiama, Fukushima, Japão. As amostras foram analisadas por ELISA para mensurar os níveis séricos de IgE contra os alérgenos pesquisados, se estabelecendo 0,200 de densidade ótica de IgE como ponto de corte. Todos os dados foram analisados de forma descritiva. Para a comparação de proporções entre os alérgenos foi utilizado qui-quadrado e o cálculo do coeficiente de *Spearman* foi utilizado para correlacionar a sensibilidade ao extrato bruto de *D. farinae* com seus alérgenos. Como resultados, a sensibilidade ao extrato bruto de *D. farinae* (92%) e ao Zen 1 (77%) foi superior ao Der f 2 (56%) ($p < 0,001$). Houve uma forte correlação na sensibilização entre extrato bruto de *D. farinae* e Zen 1 ($p < 0,001$), fato não observado entre este e Der f 2 ($p < 0,002$). A sensibilização ao *D. farinae* e seus alérgenos foi associada com irrestrita exposição à mobília e material têxtil domiciliar. Concluiu-se que cães com dermatite atópica são frequentemente sensibilizados a *D. farinae* e, seus alérgenos Der f 2 e Zen 1, são alérgenos maiores nestes animais. A sensibilização ao Zen 1 parece ser a principal responsável pela sensibilização ao ácaro *D. farinae*.

Palavras-chave: ácaros de poeira doméstica; Pyroglyphidae; alergia; sorologia.

GENERAL ABSTRACT

Atopic dermatitis is a genetically predisposed inflammatory and pruritic allergic skin disease, with characteristic clinical signs and generally associated with the production of IgE antibodies against environmental allergens, as pollens, molds and house dust mites, mainly the species of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*. The aim of this study was to observe the serological sensitivity to crude extract of *D. farinae*, beyond its allergens Der f 2 and Zen 1, in dogs with atopic dermatitis. For that, 100 dogs with clinical diagnosis of atopic dermatitis after exclusion others pruritic skin diseases and dogs that already received specific or non-specific immunotherapy. These dogs were of different breeds and ages and they were presented at the veterinary dermatology service of veterinary teaching hospital of PUCPR and at the clinic of veterinary dermatology and allergy Dermatovet, both in Curitiba-PR. At the time of anamnesis, some question were done to know the possibility of these dogs had contact with furniture and textile material which could shelter house dust mites. Sera samples were obtained and further analyzed by ELISA test to measure serum IgE levels against these allergens with an established cut-off of 0,200 IgE optical density. All data were analyzed in a descriptive form. For comparison of proportion between allergens, the chi-square test was used and the Spearman rank correlation coefficient was used to correlate the sensitivity to crude *D. farinae* and its allergens. As results, the IgE sensitivity to crude *D. farinae* (92%) and Zen 1 (77%) was higher than Der f 2 (56%) ($p < 0,001$). There was a strong correlation in sensitization to crude *D. farinae* and Zen 1 ($p < 0,001$) that was not observed between crude *D. farinae* and Der f 2 ($p < 0,002$). The sensitization to *D. farinae* and its allergens was associated with an unrestricted exposition to furniture and textile material. As conclusion, dogs with atopic dermatitis are frequently sensitized to *D. farinae* and its allergens, Der f 2 and Zen 1, may be considered majors in these dogs. The sensitization to Zen 1 may be the mainly responsible for the sensitization to crude *D. farinae*.

Keywords: house dust mites; Pyroglyphidae; allergy; serology;

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1. Cão com dermatite atópica canina. A: eritema e alopecia periocular. B: Eritema ventral e alopecia em axilas. C: eritema e alopecia em regiões abdominal e inguinal..... 3
- Figura 2. Shih tzu com dermatite atópica. A: Eritema interdigital. B: Eritema, pápulas e alopecia em axilas, porções ventrais de membros torácicos, abdomen e virilha. C: Eritema e alopecia em virilha e porção medial de membro pélvico..... 3
- Figura 3. Fotomicrografia de uma fêmea adulta de *D. farinae* 5
- Figura 4. Distribuição de *Dermatophagoides* spp. sendo Dp, predominância de *D. pteronyssinus*; Df, predominância de *D. farinae*; DpDf mistura de ambos com predomínio de *D. pteronyssinus*; DfDp mistura de ambos com predominância de *D. farinae*; Ds, *D. siboney*. Os parênteses indicam baixos níveis do ácaro no local..... 4
- Figura 5. Porcentagem de concentração de ácaros de poeira doméstica separados em ambientes urbano, misto e rural. 8
- Figura 6. Distribuição de gêneros bacterianos vivendo no ácaro *D. farinae* 13
- Figura 7. Superfície molecular do Der f 2 colorida após conservação de aminoácidos comparada com o Der p 2. Região vermelha mostra onde ambos os alérgenos apresentam semelhanças. 15
- Figura 8. Mapeamento dos locais de ligação a LPS no Der f 2..... 17

CAPÍTULO 2

- Figura 1. Percentual de animais soropositivos na mensuração de IgE para *D. farinae* bruto, Der f 2 e Zen 1.....29
- Figura 2. Todos os valores de densidade óptica de IgE para cada alérgeno, no total de 100 amostras de soro provenientes de cães com dermatite atópica. HD: extrato bruto de *D. farinae*.....29
- Figura 3. Correlação entre valores de densidade óptica (OD) de IgE ao *Dermatophagoides farinae* bruto e Zen 1.....30
- Figura 4. Correlação entre valores de densidade óptica (OD) de IgE ao *Dermatophagoides farinae* bruto e Der f 2.....30

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Porcentagem de concentração de ácaros de poeira doméstica separadaos em ambientes urbano, misto e rural.	7
Gráfico 2. Número de ácaros por grama de poeira em diferentes camadas do colchão, além de trevesseiro.	8

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Critérios de inclusão para a nomenclatura de alérgenos pela OMS..... 11

Tabela 2. Relação de alérgenos derivados de *D. farinae*, suas estruturas bioquímicas e pesos moleculares 12

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Descrição das porcentagens de animais positivos a cada alérgeno e o respectivo contato ambiental.....31

LISTA DE ABREVIATURAS

DAC	Dermatite atópica canina
IL	Interleucina
Th	Linfócito T auxiliar (<i>helper</i>)
CCL17/TARC	<i>Thymus-and activation-regulated chemokine</i>
HDM	Ácaros de poeira doméstica (<i>house dust mites</i>)
UR	Umidade relativa do ar
OMS	Organização Mundial da Saúde
kDa	Quilodauton
D. farinae	<i>Dermatophagoides farinae</i>
D. pteronyssinus	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
TSLP	Linfopoetina estromal tímica

CAPÍTULO 1

1 BREVE REVISÃO SOBRE DERMATITE ATÓPICA CANINA

A dermatite atópica canina (DAC) é definida como uma doença cutânea alérgica, inflamatória, pruriginosa, geneticamente predisposta, com sinais clínicos característicos e geralmente associado a produção de anticorpos IgE contra alérgenos ambientais (Hensel et al., 2015), como pólenes, fungos e ácaros de poeira doméstica (Bizikova et al., 2015). Dentre os ácaros, são importantes as espécies do gênero *Dermatophagoides* spp., especialmente *D. pteronyssinus* e *D. farinae* (Nuttall et al., 2006).

A DAC não apresenta predileção racial, embora raças definidas sejam mais citadas na literatura, como o Labrador Retriever, o Golden Retriever, o West Highland White Terrier e Shar-pei (Zur et al., 2002; Nodtvedt et al., 2006). Estes cães apresentam defeitos na barreira cutânea, como redução dos níveis de lipídios e ceramidas na epiderme e mutações no gene de expressão de filagrina, levando à uma maior perda de água transepidermica (Santoro et al., 2015). Em adição, estes cães também apresentam alterações na interação do microbioma cutâneo com o hospedeiro, através da redução da expressão de peptídeos antimicrobianos naturais, aumento da colonização por bactérias como o *Staphylococcus pseudintermedius* e leveduras como a *Malassezia pachydermatis*, o que leva a um aumento da inflamação cutânea e agravamento dos sinais clínicos (Santoro et al., 2015).

A imunopatogênese da doença baseia-se na interação da imunidade inata e adquirida, principalmente com a super expressão de citocinas e quimiocinas de linfócitos Th2, especialmente as interleucinas (IL) 4, IL-5, IL-13 e IL-31, linfopoetina estromal tímica (TSLP), CCL-17/TARC, mas também de citocinas derivadas de células Th1 e Th17, além da produção de anticorpos do tipo IgE (Pucheu-Haston et al., 2015; Pucheu-Haston et al., 2015b, Olivry et al., 2016).

Os sinais clínicos manifestam-se através do prurido intenso, sazonal ou perene, localizado ou generalizado, que leva a lesões como eritema, pápulas, alopecia, hiperqueratose e hiperpigmentação, geralmente afetando áreas ventrais como axilas e

1 virilhas, interdígitos, bem como regiões periocular, peribucal e perianal, além de otite
2 externa recorrente (figuras 1 e 2) (Bizikova et al., 2015). Estes sinais geralmente
3 iniciam-se nos primeiros anos de vida do animal (Favrot et al., 2010). Infecções
4 cutâneas recorrentes por bactérias e/ou leveduras também são comuns nestes cães
5 (Santoro et al., 2015).

6 O diagnóstico da doença é baseado através da exclusão de outras
7 dermatopatias pruriginosas e do preenchimento de ao menos cinco de oito critérios pré-
8 estabelecidos (Favrot et al., 2010), tais quais:

- 9 a) Idade de início dos sinais clínicos entre seis meses e três anos de idade;
- 10 b) Presença de otite externa
- 11 c) Interdígitos afetados;;
- 12 d) Animal intradomiciliado;
- 13 e) Prurido primário;
- 14 f) Redução do prurido após uso de corticoides;
- 15 g) Bordas das orelhas não afetadas;
- 16 h) Região dorso-lombar não afetada.

17 Após o diagnóstico clínico, testes alérgicos podem ser realizados a fim de
18 identificar quais possíveis alérgenos estão relacionados com o desencadeamento
19 dos sinais clínicos, através de provas cutâneas e/ou sorológicas, que têm como alvo
20 a presença de IgE alérgeno-específica (Hensel et al., 2015).

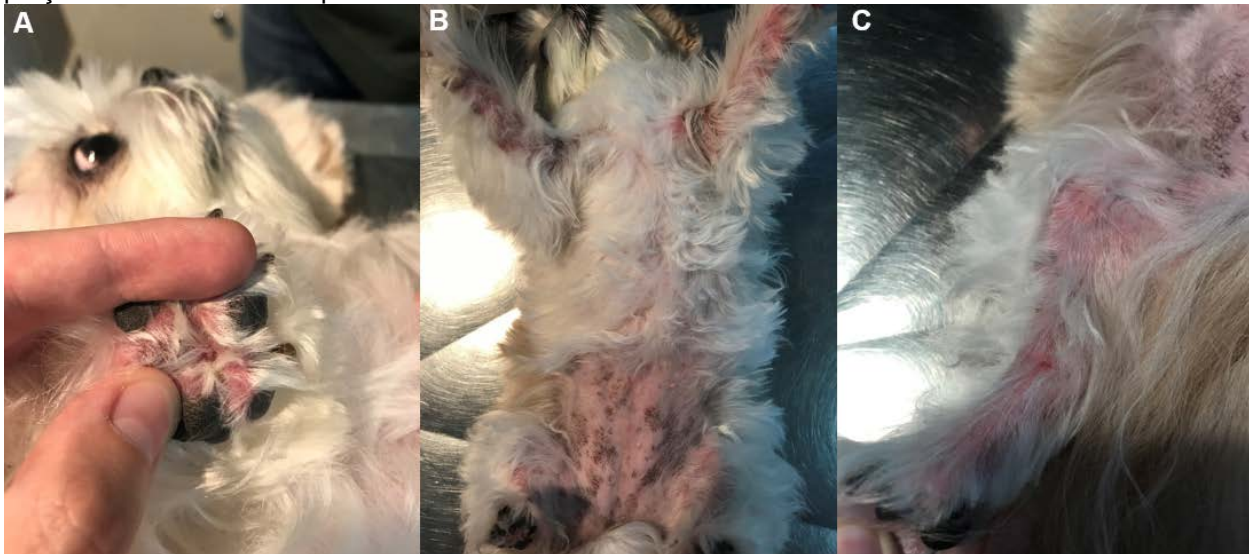
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31

1 **Figura 1.** Cão com dermatite atópica canina. A: eritema e alopecia periocular. B: Eritema ventral e
2 alopecia em axilas. C: eritema e alopecia em regiões abdominal e inguinal.



3
4 Fonte: o autor, 2017

5
6 **Figura 1.** Shih tzu com dermatite atópica. A: Eritema interdigital. B: Eritema, pápulas e alopecia em
7 axilas, porções ventrais de membros torácicos, abdômen e virilha. C: Eritema e alopecia em virilha e
8 porção medial de membro pélvico.



9
10 Fonte: o autor, 2017

11
12 O tratamento da DAC associa terapia tópica e sistêmica, além da redução do
13 contato com alérgenos. A terapia tópica baseia-se no uso de cremes e/ou shampoos
14 hidratantes/emolientes e/ou anti-inflamatórios, ao passo que substâncias comuns
15 utilizadas sistemicamente são aquelas capazes de reduzir os efeitos das citocinas
16 envolvidas na imunopatogênese da doença, como os glicocorticoides, a ciclosporina e

1 o oclacitinib (Saridomichelakis e Olivry, 2016). Ainda, o tratamento com imunoterapia
2 alérgeno-específica pode ser utilizada, a fim de promover uma maior tolerância do
3 indivíduo frente à uma exposição natural aos alérgenos os quais está sensibilizado
4 (DeBoer, 2017).

5 Embora seja uma doença a qual não há cura, uma terapia de controle eficaz a
6 longo prazo pode ser realizada ao combinar diferentes tipos de opções terapêuticas
7 potencializando seus benefícios e reduzindo efeitos adversos (Saridomichelakis e
8 Olivry, 2016).

9

10 **2 BIOLOGIA E ECOLOGIA DOS ÁCAROS DE POEIRA DOMÉSTICA**

11

12 O termo *ácaro de poeira doméstica* (*house dust mites*, em inglês – HDM) é
13 tradicionalmente aplicado às espécies da família Pyroglyphidae que comumente estão
14 presente no ambiente domiciliar (Platts-Mills *et al.*, 1992). Contudo, o termo *ácaro*
15 *doméstico* é aplicado aos ácaros desta família somados aos ácaros de estoque e
16 alguns ácaros predadores (Platts-Mills *et al.*, 1997). Estes geralmente medem entre 0.1
17 e 0.6mm e, por isso, não são visíveis ao olho nú (Milián e Díaz, 2004).

18 Ácaros de estoque são encontrados principalmente em comida armazenada,
19 como grãos, farinha e feno (Tee, 1994). Alguns exemplos destes ácaros incluem os
20 gêneros *Glycyphagus*, *Blomia*, *Tyrophagus*, *Lepidoglyphus* e *Acarus* (Fernández-
21 Caldas *et al* 2014). Enquanto os ácaros dos gêneros *Lepidoglyphus*, *Tyrophagus* e
22 *Acarus* são mais encontrados em regiões temperadas, o gênero *Blomia* encontra-se
23 em áreas tropicais e sub-tropicais (Tee, 1994).

24 A família Pyroglyphidae possui cerca de 18 gêneros e 46 espécies (Arlan e
25 Morgan, 2003). Contudo, mais de 80% dos ácaros encontrados na poeira
26 intradomiciliar corresponde as espécies *Dermatophagoides* e *Euroglyphus* (Hallas,
27 1991). O gênero *Dermatophagoides* também pode ser encontrado em nichos não-
28 domésticos, como ninhos de aves e pequenos mamíferos (Colloff, 2009). As duas
29 principais espécies deste gênero são *D. pteronyssinus* e *D. farinae* (figura 3), sendo
30 que, no passado, a primeira era mais prevalente na Europa enquanto que a segunda,

1 mais resistente a dissecação, era mais prevalente nos Estados Unidos (Sporik *et al.*,
2 1992).

3 **Figura 2.** Fotomicrografia de uma fêmea adulta de *D. farinae*



4
5 Fonte: Chan *et al.*, 2015
6

7 O termo *Dermatophagoides* significa comedor de pele, sendo que o termo
8 *farinae* significa farinha, o que provavelmente reflete o *habitat* natural do ácaro antes
9 dele ser associado com humanos, enquanto que *pteronyssinus* significa “adora penas”
10 (Arlan e Morgan, 2003). Os principais fatores determinantes para a sobrevivência dos
11 ácaros são alta umidade, temperaturas moderadas e fontes adequadas de alimento
12 (Nascimento *et al.*, 2016). Ambas as espécies estão amplamente distribuídas ao redor
13 do mundo (figura 4) (Thomas, 2010).

14
15
16
17
18
19
20
21
22

1 **Figura 3.** Distribuição de *Dermatophagoides* spp. sendo Dp, predominância de *D. pteronyssinus*; Df,
 2 predominância de *D. farinae*; DpDf mistura de ambos com predomínio de *D. pteronyssinus*; DfDp mistura
 3 de ambos com predominância de *D. farinae*; Ds, *D. siboney*. Os parênteses indicam baixos níveis de
 4 ácaro no local.



5

1. Vancouver Dp	12. Virginia DfDp	23. Sao Paulo Dp	34. Netherlands DpDf	45. Palestine Dp	56. Philippines Dp
2. Seattle Dp	13. Florida Dp	24. Chile Dp	35. Belgium DfDp	46. Saudi Ara. Dp(Df)	57. India Dp(Df)
3. Los Angeles DfDp	14. Cuba DpDs	25. Argentina DpDf	36. Switzerland Df	47. Ghana Dp	58. Thailand Dp(Df)
4. San Diego Dp	15. Puerto Rica Dp	26. Iceland NIL	37. France DpDf	48. Nigeria Dp	59. Singapore Dp
5. Nunavut NIL	16. Barbados Dp	27. Norway Dp	38. Spain Dp(Df)	49. Mauritius Dp	60. Malaysia Dp
6. Midwest DfDp	17. Mexico DpDf	28. Finland Dp	39. Italy Df	50. South Afr. Dp(Df)	61. Indonesia DfDp
7. Rockies Df	18. Colombia Dp	29. Sweden DfDp	40. Croatia Dp	51. Japan DpDf	62. Australia Dp
8. Arizona DfDp	19. Venezuela Dp	30. Denmark DfDp	41. Turkey Dp	52. Korea Df(Dp)	63. New Zealand Dp
9. Texas Dp	20. Ecuador DpDf	31. Moscow Dp	42. Kuwait Dp	53. Taiwan Dp(Df)	
10. Louisiana Dp	21. Inland Brazil DfDp	32. Germany DfDp	43. Iran Dp	54. Hong Kong Dp	
11. North east Df(Dp)	22. Salvador Dp	33. England Dp	44. Israel Dp	55. Mainl. China DpDf	

6

7

Fonte: Thomas, 2010

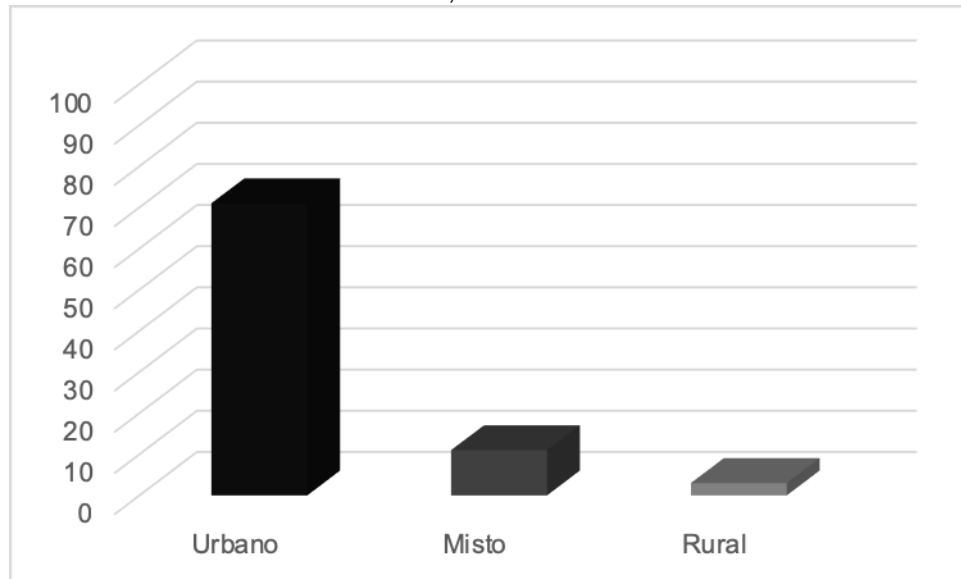
8

9 Em estudo espanhol, o *D. farinae* apresentou maior concentração em
 10 ambientes urbanos, quando comparados a ambientes rurais ou mistos (gráfico 1)
 11 (Agratorres *et al.*, 1999), sendo que carpetes, tapetes, colchões e mobílias estofadas
 12 correspondem ao principal nicho habitacional dos ácaros em ambiente intradomiciliar
 13 (Nascimento *et al.*, 2016). Contudo, se recursos apropriados de alimento e água
 14 estiverem disponíveis, eles podem se desenvolver em qualquer local (Arlan e Morgan,
 15 2003). O colchão, quando separado por camadas, apresenta na camada intermediária
 16 a maior concentração de HDM por grama de poeira (gráfico 2) (Coloff, 2009). Roupas

1 provavelmente não são locais de reprodução de HDM, mas servem como meios de
2 transporte entre diferentes locais (Neal *et al.*, 2002). Carros, trens e aviões podem ter
3 certa quantidade de HDM em seus assentos e também contribuem para a sua
4 dispersão (Arlan e Morgan, 2003).

5

6 **Gráfico 1.** Porcentagem de concentração de ácaros de poeira doméstica separados em ambientes
7 urbano, misto e rural.



8

9

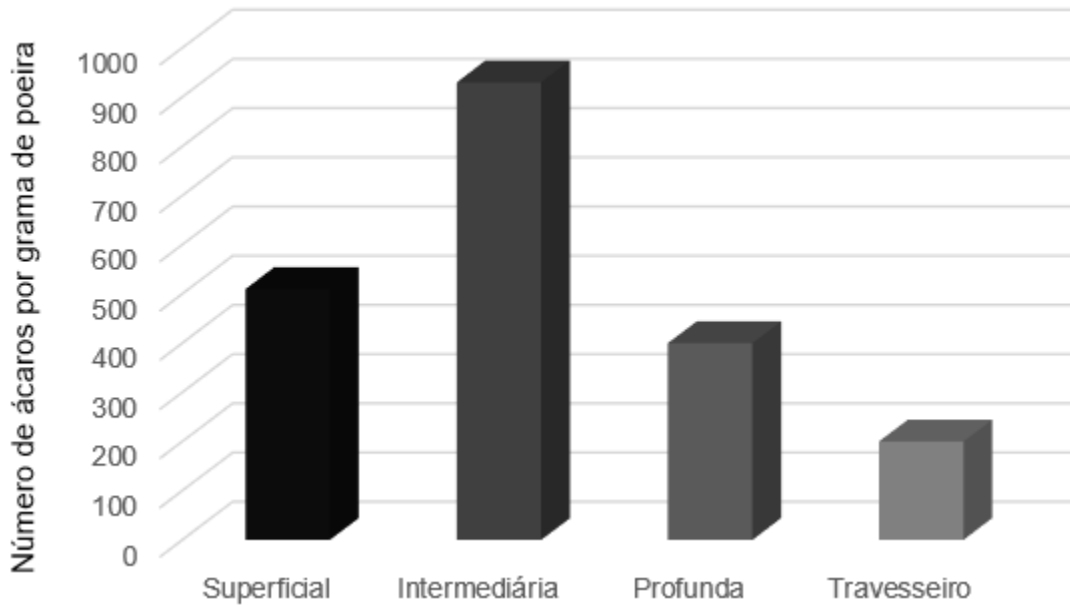
Fonte: adaptado de Agratorres et al., 1999.

10

11 A intensa mobilização de pessoas suporta também a mobilização e migração de
12 ácaros concomitantemente. Há evidências de migração de ácaros em mobílias, o que
13 leva à dispersão dos ácaros domésticos entre continentes, com possíveis efeitos na
14 genética e evolução das espécies (Colloff, 2009). A ecologia dos HDM e suas
15 variações de habitat pode ser melhor compreendida ao utilizar escalas especiais
16 divididas em micro-habitat, macro-habitat, regional e global (figura 5).

1
2

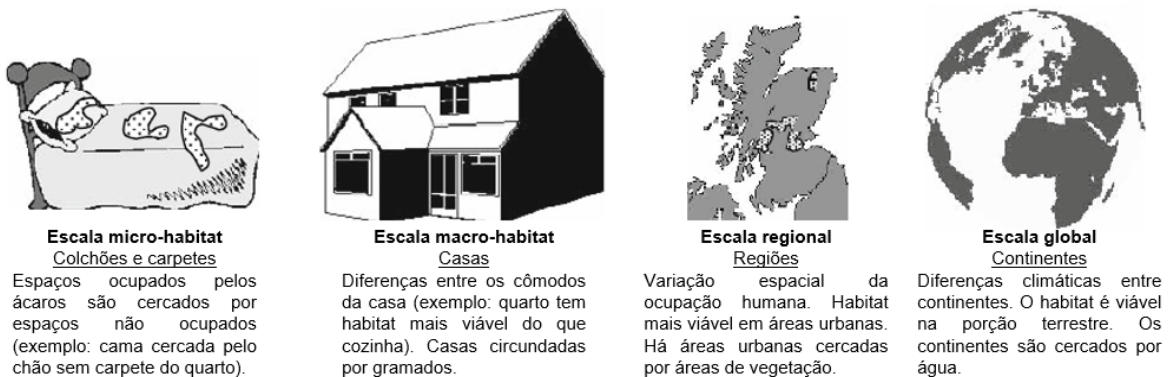
Gráfico 2. Número de ácaros por grama de poeira em diferentes camadas do colchão, além de travesseiro.



3
4
5
6

Fonte: adaptado de Colloff, 2009.

Figura 4. Variações de *habitat* de ácaros de poeira doméstica



7
8
9

Fonte: adaptado de Colloff, 2009.

10 O ciclo de vida dos ácaros da família Pyroglyphidae consiste em cinco estágios:
11 ovo, larva, protoninfa, tritoninfa e adulto (Arlian e Platts-Mills, 2001). A nutrição dos
12 HDM é baseada basicamente em material epitelial de animais no ambiente (Hallas,
13 1991; Nadchatram, 2005), sua reprodução baseia-se na cópula entre machos e
14 fêmeas adultos, e o ato da cópula pode durar até 48 horas e, neste tempo, a fêmea
15 continua se movimentando pelo ambiente levando o macho (Hart, 1998). As fêmeas

1 depositam alguns ovos por dia, durante alguns dias ou meses antes de morrer (Hallas,
2 1991). O número de ovos que uma fêmea pode depositar ao longo da vida é incerto,
3 com estimativas entre 40 e 100 ovos. Ácaros de poeira doméstica podem viver entre
4 dois a cinco meses, dependendo das condições ambientais (Milián et al., 2004;
5 Nadchatran, 2005). Devido ao fato de que a temperatura e a umidade relativa
6 ambientais não são uniformes ao longo do tempo, a taxa de reprodução,
7 desenvolvimento e população é altamente variável em determinado local (Arlian e
8 Platts-Mills, 2001). Ao longo do ano, uma maior concentração de HDM é encontrada na
9 época do verão, quando a temperatura e a umidade estão elevadas (Arlian et al., 1982;
10 Arlian e Morgan, 2003; Kosik-Bogacka et al., 2012).

11 Cerca de 75% do peso corporal dos HDM consiste em água, e a umidade
12 relativa do ar (UR) é muito importante no ciclo de vida. Os ácaros obtêm água
13 bebendo-a diretamente, ingerindo com alimentos umedecidos ou absorvendo
14 passivamente pela umidade do ar (Arlian, 1992). Para o *D. farinae*, as condições
15 ambientais ideais apresentam UR entre 55-75% com temperatura entre 15-35°C (Arlian
16 e Platts-Mills, 2001). De maneira simplificada, a temperatura ambiental influenciará na
17 velocidade de desenvolvimento dos ácaros, enquanto a umidade ambiental tem
18 influência na quantidade de ácaros capazes de habitar o local (Hallas, 1991). Um
19 estudo demonstrou que os ácaros se desenvolvem melhor em um ambiente com
20 temperatura de 25°C quando comparado com 20°C (Arlian et al., 2010). O *D. farinae*
21 possui certa resistência à alternâncias de UR. Estudos demonstraram que estes ácaros
22 podem se desenvolver completamente em ambientes controlados com baixa UR
23 durante a maior parte do dia e pequenos períodos com UR a 75% (Arlian et al., 1998;
24 Arlian et al., 1999). Em um ambiente com apenas quatro horas diárias de UR a 75%,
25 uma fêmea adulta de *D. farinae* pode produzir até um terço dos ovos que produziria em
26 um ambiente com constante UR a 75% (Arlian et al., 1998). Em relação a tolerância
27 térmica, a concentração de HDM reduz significativamente em ambientes com
28 temperatura entre 40°C e 50°C (Arlian e Morgan, 2003). A ionização do ar também
29 demonstrou eficiência na redução das concentrações de HDM em ambiente laboratorial
30 controlado, mas baixa eficácia na redução em colchões e mobília (Abidin e Ming,
31 2012).

1 No Brasil, os ácaros da família Pyroglyphidae também são os mais comuns,
2 sendo que o *D. pteronyssinus* é mais comum em regiões costeiras e de alta umidade,
3 enquanto o *D. farinae* é mais comum em locais secos e quentes (Souza e Filho, 2012).
4 Na cidade de Curitiba, em ambientes domésticos, ambas as espécies podem ser
5 encontradas, embora haja um predomínio de *D. pteronyssinus* e de seus alérgenos do
6 grupo 1 (Dutra et al., 2001; Farias et al., 2015; Assunção et al., 2017).

7

8 **3 ALÉRGENOS DE ÁCAROS DE POEIRA DOMÉSTICA**

9 Alérgeno é um antígeno capaz de suscitar uma resposta de hipersensibilidade
10 (Olivry et al., 2001). Os alérgenos de ácaros são estabelecidos pelo Sub-comitê de
11 Nomenclatura de Alérgenos da Organização Mundial da Saúde (OMS). A OMS
12 estabelece que cada alérgeno seja representado, em itálico, pelas três primeiras letras
13 do gênero do ácaro, seguido por um espaço simples e pela primeira inicial da espécie e
14 em seguida por um número romano (exemplo: *Der f 1* para *Dermatophagoides farinae*
15 1). Os alérgenos serão numerados de acordo com o ordem de, com algumas
16 exceções. Estruturas homólogas de diferentes espécies serão classificadas com o
17 mesmo número (Marsh et al, 1986).

18 Um alérgeno, para ser incluso pela OMS, necessita contemplar critérios
19 bioquímicos e imunológicos, obtidos após sua purificação (tabela 1) (Breiteneder e
20 Chapman, 2014)

-
1. Definição das propriedades molecular e estrutural, incluindo:
 - 1.1 Purificação da proteína até, ou próximo, a sua homogeneidade;
 - 1.2 Determinação do peso molecular, ponto isoelétrico e padrão de glicosilação;
 - 1.3 Determinação da sequência de nucleotídeos e/ou aminoácidos;
 - 1.4 Produção de anticorpos monoclonais ou monoespecíficos.
 2. Definição da importância do alérgeno em causar respostas por IgE:
 - 2.1 Comparar a prevalência de anticorpos IgE séricos em populações de pacientes alérgicos às mesmas fontes de alérgenos;
 - 2.2 Demonstrar atividade alergênica, por testes cutâneos ou testes de liberação de histamina, por exemplo;
 - 2.3 Investigar se a depleção do alérgeno de um extrato alergênico reduz sua atividade de ligação à molécula de IgE;
 - 2.4 Demonstrar, se possível, se alérgenos recombinantes têm atividade de ligação às moléculas de IgE semelhante ao alérgeno natural.
-

Fonte: adaptado de Breiteneder e Chapman, 2014.

2

3

4 Os principais alérgenos de ácaros da poeira doméstica são oriundos de
5 enzimas digestivas, como proteases cisteínas, tripsinas e quimotripsinas, amilases,
6 colagenases e quitinases (Bessot e Pauli, 2011), e sofrem importantes influências
7 dietéticas. Estes alérgenos são liberados juntamente com as partículas fecais dos
8 ácaros (Colloff, 2009), e estas partículas são mantidas em sua estrutura por uma
9 membrana peritrófica. Isto é importante pois alguns alérgenos podem ser suspensos no
10 ar na forma de partículas fecais intactas (Platts-Mills et al., 1997).

11 A produção de IgE frente a um alérgeno pode promover respostas a outros
12 antígenos espectadores e, assim, respostas colaterais a componentes não-alergênicos
13 podem acontecer, tornando necessária a identificação dos reais alérgenos que levam a
14 sensibilização do indivíduo (Thomas, 2015).

15 Além de origem enzimática, os alérgenos de HDM podem também ser proteínas
16 ligadoras. Até o momento, segundo o banco de dados do Sub-comitê de Nomenclatura
17 de Alérgenos da Organização Mundial da Saúde e da União Internacional de

1 Sociedades Imunológicas, 32 alérgenos derivados de *D. fariane* estão catalogados
 2 (Tabela 2)

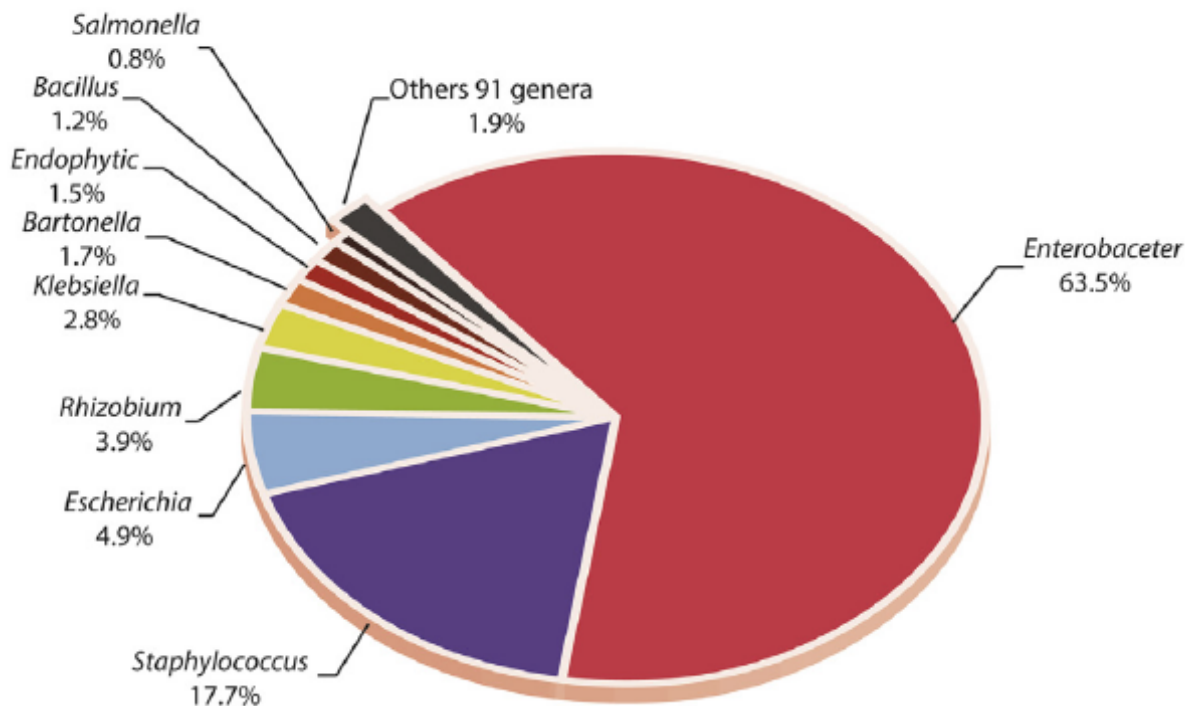
3 **Tabela 2.** Relação de alérgenos derivados de *D. farinae*, suas estruturas bioquímicas e pesos
 4 moleculares. Notar que alguns alérgenos possuem estrutura e/ou peso molecular ainda desconhecidos.

Alérgeno	Estrutura bioquímica	Peso molecular (KDa)
Der f 1	Cysteine protease	27
Der f 2	NPC2 family	15
Der f 3	Trypsin	29
Der f 4	alpha-amylase	57.9
Der f 6	Chymotrypsin	25
Der f 7	Bactericidal permeability-increasing like protein	30-31
Der f 8	Glutathione S-transferase	32
Der f 10	Tropomyosin	37
Der f 11	Paramyosin	98
Der f 13	Fatty acid binding protein	
Der f 14	Apolipoporphin	177
Der f 15	Chitinase	98/109
Der f 16	Gelsolin/villin	53
Der f 17	Calcium binding protein	53
Der f 18	Chitin-binding protein	60
Der f 20	Arginine kinase	40
Der f 21		14
Der f 22		
Der f 23	Peritrophin-like protein	19
	Ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein homologue	
Der f 24		13
	Triosephosphate isomerase	
Der f 25		34
Der f 26	Myosin alkali light chain	18
Der f 27	Serpin	48
Der f 28	Heat Shock Protein	70
Der f 29	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (cyclophilin)	16
Der f 30	Ferritin	16
Der f 31	Cofilin	15
Der f 32	Secreted inorganic pyrophosphatase	35
Der f 33	alpha-tubulin	52
Der f 34	enamine/imine deaminase	16
Der f 35		14.4 kDa, natural and recombinant
Der f 36		23

5 Fonte: OMS. Disponível em <www.allergen.org>.

1 Ainda, os HDM podem abrigar bactérias. Um estudo observou cerca de 112.000
2 sequências genômicas relacionadas com 100 espécies distintas de bactérias no ácaro
3 *D. farinae*. Destas, cerca de 63% relacionadas a espécie *Enterobacter* (figura 6) (Chan
4 et al, 2015).

5
6 **Figura 5.** Distribuição de gêneros bacterianos vivendo no ácaro *D. farinae*
7



8
9 Fonte: Chan et al., 2015

10 11 **4 ALÉRGENOS DO GRUPO 2**

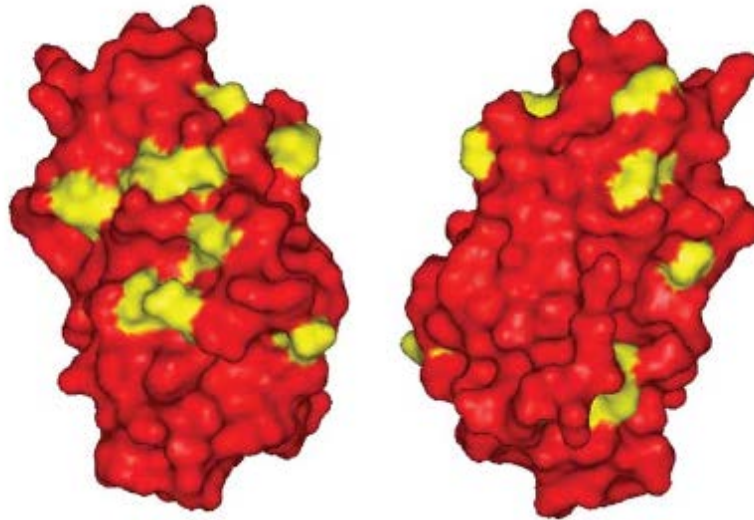
12 Os alérgenos do grupo 2 são classificados como proteínas ligantes a lipídios e
13 possivelmente não são enzimas. Outros grupos com a mesma classificação são os
14 grupos 13 e 14 (Colloff, 2009). O grupo 2 apresenta homologia estrutural com o fator de
15 diferenciação mieloide 2 (MD-2), e pode ser classificado como ligante a lipídio tipo MD-
16 2 (Scheurer *et al.*, 2015). Os alérgenos podem se ligar aos lipídios em cavidades
17 hidrofóbicas através de interações eletrostáticas e outros mecanismos ainda pouco
18 conhecidos (Bublin *et al.*, 2014). Eles são resistentes à temperatura e não deterioram

1 em temperaturas de até 100°C (Bessot e Pauli, 2011). Este grupo possui capacidade
2 de ligação à IgE de 80 a 100%, similar ao grupo 1 (Thomas, 2015). Os alérgenos do
3 grupo 2 foram identificados em uma grande variedade de ácaros, mais do que qualquer
4 outro grupo, incluindo *Euroglyphus maynei*, *Psoroptes ovis*, *Aleuroglyphus ovatus*,
5 *Tyrophagus putrescentiae*, *Suidasia medanensis*, *Glycyphagus domesticus*,
6 *Lepidoglyphus destructor*, *Blomia tropicalis*, *Dermatophagoides siboney*, *D.*
7 *pteronyssinus* e *D. farinae* (Colloff, 2009).

8 O Der f 2 possui 129 aminoácidos e peso molecular de cerca de 14 kDa
9 (Trudinger et al., 1991). Foi primeiramente isolado e caracterizado em 1986,
10 juntamente com o Der f 1 (Yasueda et al., 1986). Sua função biológica ainda não está
11 bem esclarecida, mas é possível que faça parte da defesa inata do ácaro contra
12 bactérias (Ichigawa et al., 2009). O Der f 2 pode apresentar padrões de variação de
13 alelos devido a diversas linhagens genéticas distribuídas geograficamente (Thomas et
14 al., 2010).

15 Alérgenos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae* têm uma diferença de 15-20% na
16 sequência de aminoácidos e, apesar de imunologicamente poderem apresentar reação
17 cruzada, eles também possuem epítomos únicos (Thomas et al., 2010). No caso do Der
18 f 2, a homologia ao Der p 2 chega a 88% (figura 7), o que pode conferir reação cruzada
19 (Trudinger et al., 1991; Johannessen et al., 2005) enquanto a homologia entre Der f 2 e
20 Der p 1 chega a 78% (Trudinger et al., 1991) Recentemente, um novo alérgeno
21 derivado de *D. farinae* e também uma proteína ligante a lipídio com homologia ao MD-
22 2, o Der f 35, apresentou homologia de cerca de 40% com o Der f 2, o que pode ser
23 responsável por reação cruzada entre eles (Fijimura et al., 2017).

1 **Figura 6.** Superfície molecular do Der f 2 colorida após conservação de aminoácidos comparada com o
2 Der p 2. Região vermelha mostra onde ambos os alérgenos apresentam semelhanças.



3
4
5 Fonte: Johanensen, 2005.
6

7 **5 RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS FRENTE AOS ÁCAROS DE POEIRA DOMÉSTICA**

8 É conhecido que indivíduos com dermatite atópica apresentam uma barreira
9 epidérmica deficiente, apresentando maior perda de água transpidérmica, redução na
10 expressão de lipídios no estrato córneo, especialmente ceramidas, além de alteração
11 na expressão de filagrina (Santoro et al., 2015). A alergenicidade de determinado
12 antígeno é determinada por propriedades bioquímicas, como a atividade enzimática, e
13 a interação com elementos do sistema imune inato (Thomas et al., 2010).

14 A exposição aos HDM podem ativar respostas imunológicas inatas e
15 adaptativas, além de rotas pruritogênicas, em indivíduos com dermatite atópica (Olivry
16 et al., 2016). A penetração epicutânea de alérgenos é provavelmente a principal via
17 que leva a sensibilização dos pacientes. Estudos demonstraram que repetidas
18 aplicações epicutâneas de extratos de *Dermatophagoides farinae* levam ao
19 aparecimento de sinais clínicos de dermatite atópica, através da resposta Th2
20 (Yamamoto et al, 2007; Pucheu-Haston et al., 2008). Em um destes estudos, após
21 aplicação de uma pasta contendo Der f 1, os autores observaram um grande número
22 de células contendo Der f 1 na derme superficial, o que não foi visto no grupo controle.
23 Ainda, estas células foram vistas cercado folículos pilosos, o que levanta a hipótese

1 de que os alérgenos possam entrar mais facilmente via epitélio folicular pouco
2 cornificado (Pucheu-Haston et al., 2008).

3 Ácaros de poeira doméstica possuem uma variedade de enzimas que podem
4 aumentar a penetração de outros alérgenos através de suas ações em desmossomos
5 (Marsella et al., 2011). Alérgenos do grupo 1 possuem atividade enzimática relacionada
6 com sua função de protease, o que facilita a penetração de alérgenos por ação do
7 aumento da permeabilidade epitelial, através da clivagem de junções celulares (Wan et
8 al., 1999). Em adição, a atividade enzimática proteolítica de *D. pteronyssinus* também
9 degrada componentes da matriz extracelular cutânea, contribuindo para a disfunção de
10 barreira, especialmente quando o pH cutâneo está elevado (Oida et al., 2017).

11 Beagles com dermatite atópica com alta concentração sérica de IgE, quando
12 expostos a HDM por três dias consecutivos, apresentaram uma redução na expressão
13 de mRNA de citocinas reguladoras juntamente com um aumento na expressão de
14 mRNA de citocinas derivadas de Th2 (Maeda et al., 2007).

15 A aplicação epicutânea de extratos contendo *D. farinae* em cães com DA
16 evidenciou que a pele lesionada super-regula genes que codificam citocinas Th2, tais
17 como interleucina (IL)-4, IL-5, IL-13, IL-31 e IL-33, citocinas Th9 como IL-9, citocinas
18 Th22 como IL-22, além de quimiocinas promotoras de respostas Th2 como CCL-5 e
19 CCL-17. Em adição, citocinas pró-inflamatórias como IL-6, LTB e IL-18 foram também
20 super-reguladas, além de vias pruriginosas codificando proteases como catepsina S,
21 quimase de mastócitos, triptase, entre outros (Olivry et al., 2016). É conhecido que IL-6
22 tem papel importante na resposta imune inicial, seguido por aumento de IL-13 e TARC
23 (do inglês, *thymus and activation-regulated chemokine*), ao passo que IL-18 tem
24 importância principalmente em respostas mais tardias (Marsella et al., 2006).

25 Citocinas promotoras de resposta Th2 são expressas principalmente na fase
26 aguda do eczema atópico, ao passo que a medida que a doença torna-se crônica,
27 ocorre maior expressão de citocinas Th1 (principalmente IFN-gamma), Th17 (IL-17) e
28 Th22 (IL-22) (Eyerich e Novak, 2013). Citocinas Th1 são induzidas provavelmente por
29 trauma autoinduzido devido ao prurido intenso e infecções cutâneas (Nuttall et al.,
30 2002). Humanos atópicos sensibilizados a ácaros de poeira doméstica apresentam
31 altas concentrações de células Th17 na pele, contudo, a expressão de IL-17 é

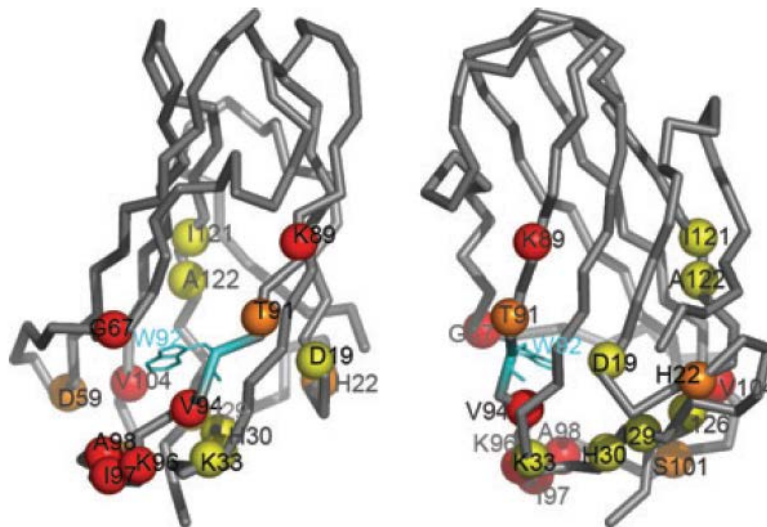
1 significativamente menor quando comparada a outros indivíduos sensibilizados a
2 outros tipos de alérgenos (Baris et al., 2016).

3 Alérgenos do grupo 2 podem se ligar a lipopolissacarídeos (LPS) de superfícies
4 bacterianas e ativam resposta imune inata, através de receptores tipo Toll-4 (figura 8)
5 (Ichikawa et al., 2009). Através destes receptores, quando há uma baixa exposição a
6 LPS, ocorre um direcionamento da resposta imunológica para o tipo Th2,
7 diferentemente de quando há um alto nível de exposição e a resposta é direcionada
8 para o tipo Th1 (Eisenbarth et al., 2002).

9 A sensibilização experimental com Der f 2 em cães atópicos também induz à
10 manifestação clínica da doença, evidenciados por escores clínicos lesionais e de
11 prurido. Contudo, esta sensibilização não parece induzir altos níveis séricos de
12 citocinas inflamatórias, como IL-2 e IL-4 (Olivry et al., 2017).

13
14
15

Figura 7. Mapeamento dos locais de ligação a LPS no Der f 2.



16
17
18
19

Fonte: Ichikawa et al., 2009.

20 **6 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O CAPÍTULO 1**

21 A dermatite atópica é uma doença a qual apresenta complexa
22 imunopatogênese, sendo a sensibilização a ácaros de poeira doméstica uma das

1 partes que a compõem. Os alérgenos de HDM podem agir por diferentes vias
2 imunológicas e novos estudos pesquisando os mecanismos de sensibilização dos
3 diferentes grupos de alérgenos são necessários.

4 Os HDM se alimentam de restos epiteliais de indivíduos cujo os quais dividem o
5 ambiente, sendo encontrados principalmente em mobília estofada e material têxtil,
6 como camas, sofás, tapetes e roupas. O contato frequente de cães com dermatite
7 atópica com esse tipo de material pode facilitar essa sensibilização.

1 REFERÊNCIAS

- 2
3 Abidin SZ, Ming HT. Effect of a commercial air ionizer on dust mites *Dermatophagoides*
4 *pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae) in the laboratory.
5 Asian Pac J Trop Biomed. 2012;2(2):156-158.
- 6 Agratorres JM, Pereira-Lorenzo A, Fernandez-Fernandez I. Population dynamics of
7 house dust mites (acari: pyroglyphidae) in Santiago de Compostela (Galicia, Spain).
8 Acarologia. 1999;40(1):59-63.
- 9 Allergen nomenclature [homepage]. USA. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-
10 Committee. 2018. [acessado em: 10 ago 2018]. Disponível em <
11 <http://www.allergen.org>>.
- 12 Arlian LG. Water balance and humidity requirements of house dust mites. Exp Appl
13 Acarol. 1992;16(1-2):15-35.
- 14 Arlian LG, Bernstein IL, Gallagher JS. The prevalence of house dust mites,
15 *Dermatophagoides* spp, and associated environmental conditions in homes in Ohio. J
16 Allergy Clin Immunol. 1982;69(6):527-32.
- 17 Arlian LG, Confer PD, Rapp CM, Vyszenski-Moher DL, Chang JC. Population dynamics
18 of the house dust mites *Dermatophagoides farinae*, *D. pteronyssinus* and *Euroglyphus*
19 *maynei* (Acari: Pyroglyphidae) at specific relative humidities. J Med Entomol.
20 1998;35(1):46-53.
- 21 Arlian LG, Morgan MS. Biology, ecology and prevalence of dust mites. Immunol Allergy
22 Clin N Am. 2003;23:443-468.
- 23 Arlian LG, Neal JS, Vyszenski-Moher DL. Reducing relative humidity to control the
24 house dust mite *Dermatophagoides farinae*. J Allergy Clin Immunol. 1999;104(4):852-
25 856.
- 26 Arlian LG, Platts-Mills TAE. The biology of dust mites and the remediation of mite
27 allergens in allergic disease. J Allergy Clin Immunol. 2001;107(3):S406-S413.
- 28 Arlian LG, Yella L, Morgan MS. House dust mite population growth and allergen
29 production in cultures maintained at different temperatures. J Allergy Clin Immunol.
30 2005;125(2):ab17.
- 31 Assunção DL, Farias MR, Barbosa MCR, Machado LHA. Evaluation of the
32 concentration of allergens from mites in fur and household dust of dogs with atopic
33 dermatitis. Pes Vet Bras. 2017;37(1):41-46.
- 34 Baris S, Ozen A, Akdeniz T, Karakoc-Aydiner E, Aydin O, Ercan H et al. House dust
35 mites confer a distinct immunological feature among dermatitis. Iran J Allergy Asthma
36 Immunol. 2016;15(4):264-274.
- 37 Bessot JC, Pauli G. Mite allergens: an overview. Eur Ann Allergy Clin Immunol.
38 2011;43(5):141-156.

- 1 Breiteneder H, Chapman MD. Allergen Nomenclature. In: Lockey RF, Ledford DK.
2 Allergens and Allergen Immunotherapy: subcutaneous, sublingual and oral. 5. ed.
3 Tampa: CRC Press, 2014.
- 4 Bizikova P, Pucheu-Haston CM, Eisenschenk MNC, Marsella R, Nuttall T, Santoro D.
5 Review: Role of genetics and the environment in the pathogenesis of canine atopic
6 dermatitis. *Vet Dermatol.* 2015;26(2):95-e26.
- 7 Bizikova P, Santoro D, Marsella R, Nuttall T, Eisenschenk MN, Pucheu-Haston CM.
8 Review: clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet*
9 *Dermatol.* 2015;26(2):79-e24.
- 10 Bublin M, Eiwegger T, Breiteneder H. Do lipids influence the allergic sensitization
11 process? *J Allergy Clin Immunol.* 2014;134(3):521-529.
- 12 Chan TF, Ji KM, Yim AKY et al. The draft genome, transcriptome, and microbiome of
13 *Dermatophagoides farinae* reveal a broad spectrum of dust mite allergens. *J Allergy*
14 *Clin Immunol.* 2015;135(2):539-548.
- 15 Colloff, MT. Dust mites. 1.ed. Collingwood: CSIRO, 2009; xiv.
- 16 Deboer, D. The future of immunotherapy for canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.*
17 2017;28:25-e6.
- 18 Dutra BMRS, Filho NAR, Zavadniak AF. Alérgenos inaláveis em Curitiba: uma revisão
19 de sua relevância clínica. *Rev Bras Alerg Immunopatol.* 2001;24(5):189-195.
- 20 Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K.
21 Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2
22 responses to inhaled antigen. *J Exp Med.* 2002;196(12):1645-1651.
- 23 Eyerich K, Novak N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm.
24 *Allergy.* 2013;68(8):974-982.
- 25 Farias MR, Barbosa M, Arruda LK, Filho NR. Evaluation of the concentration of the coat
26 of dogs aeroallergens (*Canis lupus familiaris*) and the dust from families of children with
27 asthma and or allergic rhinitis. *World Allergy Organ J* 2015; 8: A171.
- 28 Fijimura T, Aki T, Isobe T, Matsuoka A, Hayashi T, Ono K, Kawamoto S. Der f 35: An
29 MD-2-like house dust mite allergen that cross-reacts with Der f 2 and Pso o 2. *Allergy.*
30 2017;72(11):1728-1736.
- 31 Hallas TE. The biology of mites. *Allergy.* 1991;46(11):6-9.
- 32 Hart BJ. Life cycle and reproduction of house-dust mites: environmental factors
33 influencing mite populations. *Allergy.* 1998;53(48):13-17.
- 34 Ichikawa S, Takai T, Yashiki T, Takahashi S, Okumura K, Ogawa H, Kohda D,
35 Hatanaka H. Lipopolysaccharide binding of the mite allergen Der f 2. *Genes Cells.*
36 2009;14(9):1055-1065.
- 37 Johannessen BR, Skov LK, Kastrup JS, Kristensen O, Bolwig C, Larsen JN, Spangfort
38 M, Lund K, Gajhede M. Structure of the house dust mite allergen Der f 2: implications

1 for function and molecular basis of IgE cross-reactivity. FEBS Letters. 2005;579:1208-
2 1212.

3 Kosik-Bogacka DI, Kalisinska E, Henszel L, Kuzna-Grygiel W. Seasonal dynamics of
4 house dust mites in dust samples collected from sleeping places in north-western
5 Poland. Zoonoses Public Health. 2012;59(1):8-15.

6 Maeda S, Tsuchida H, Marsella R. Allergen challenge decreases mRNA expression of
7 regulatory cytokines in whole blood of high-IgE Beagles. Vet Dermatol 2007;18(6):422-
8 426.

9 Marsella R, Olivry T, Carlotti DN. Current evidence of skin barrier dysfunction in human
10 and canine atopic dermatitis. Vet Dermatol 2011. 22:239-248.

11 Marsella R, Olivry T, Maeda S. Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous
12 allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles. Vet
13 Dermatol 2006;17(2):111-120.

14 Marsh DG, Goodfriend L, King TP, Lowenstein H, Platts-Mills TA. Allergen
15 nomenclature. Bulletin World Health Organ. 1986;64(5):767-774.

16 Milián E, Díaz AM. Allergy to house dust mites and asthma, PRHSJ. 2004;23(1):47-57.

17 Nadchatram M. House dust mites, our intimate associates. Trop Biomed.
18 2005;22(1):23-37.

19 Nascimento JM, Reis-Avila G, Dutra MS, Silva DE, Castro LC, Ferla NJ. Seasonal and
20 environmental variations in community structure of house dust mites (Acari) in
21 subtropical southern Brazil. Inter J Acarol. 2016;43(1):86-90.

22 Neal JS, Arlian LG, Morgan MS. Relationship among house-dust mites, Der 1, Fel d 1,
23 and Can f 1 on clothing and automobile seats with respect to densities in houses. Ann
24 Allergy Asthma Immunol. 2002;88(4):410-5.

25 Nodtvedt A, Guitian J, Egenvall A, Emanuelson U, Pfeiffer DU. The spatial distribution
26 of atopic dermatitis cases in a population of insured Swedish dogs. Pres Vet Med.
27 2007;78(3-4):210-222.

28 Nuttall TJ, Knight PA, McAleese SM, Lamb JR, Hill PB. Expression of Th1, Th2 and
29 immunosuppressive cytokine gene transcripts in canine atopic dermatitis. Clin Exp
30 Allergy. 2002;32:789-795.

31 Oida K, Einhorn L, Hermann I, Panakova L, Resch Y, Vrtala S, Hofstetter G, Tanaka A,
32 Matsuda M, Jensen-Jarolim E. Innate function of house dust mite allergens: robust
33 enzymatic degradation of extracellular matrix at elevated pH. World Allergy Organ J.
34 2017;10(1):1-9.

35 Olivry T, DeBoer D, Griffin CE, Haliwell RE, Hill PB, Hillier A, Marsella R, Sousa CA.
36 The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. Vet Immunol
37 Immunopathol. 2001;81(3-4):143-146.

- 1 Olivry T, Mayhew D, Paps JS, Linder KE, Paredo C, Rajpal D, Hofland H, Cote-Sierra J.
2 Early activation of Th2/Th22 inflammatory and pruritogenic pathways in acute canine
3 atopic dermatitis skin lesions. *J Invest Dermatol.* 2016;136(10):1961-1969.
- 4 Olivry T, Paps JS, Dunston SM. Proof of concept of the preventive efficacy of high-dose
5 recombinant mono-allergen immunotherapy in atopic dogs sensitized to the
6 *Dermatophagoides farinae* allergen Der f 2. *Vet Dermatol.* 2017;28(2):183-e40.
- 7 Platts-Mills TAE, Thomas WR, Aalberse RC, Vervloet D, Chapman MD. Dust mite
8 allergens and asthma: report of a second international workshop. *J Allergy Clin
9 Immunol.* 1992;89(6):1046-1060.
- 10 Platts-Mills TAE, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman M. Indoor allergens
11 and asthma: report of the third international workshop. *J Allergy Clin Immunol.*
12 1997;100(6):S2-S24.
- 13 Pucheu-Haston CM, Jackson HA, Olivry T, Dunston SM, Hammerberg B. Epicutaneous
14 sensitization with *Dermatophagoides farinae* induces generalized allergic dermatitis and
15 elevated mite-specific immunoglobulin E levels in canine model of atopic dermatitis. *Clin
16 Exp Allergy.* 2008;38:667-669.
- 17 Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Eisenschenk MNC, Santoro D, Nuttall T, Marsella R.
18 Review: The role of antibodies, autoantigens and food allergens in canine atopic
19 dermatitis. *Vet Dermatol.* 2015;26(2):115-e30.
- 20 Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Marsella R, Santoro D, Nuttall T, Eisenschenk MN.
21 Review: lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1-T-helper 2 balance in
22 canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2015b;26(2):124-e32.
- 23 Santoro D, Marsella R, Pucheu-Haston CM, Eisenschenk MN, Nuttall T, Bizikova P.
24 Review: pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host micro-organism
25 interaction. *Vet Dermatol.* 2015;26(2):84-e25.
- 26 Saridomichelakis M, Olivry T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis.
27 *Vet J.* 2016;207:29-37.
- 28 Scheurer S, Toda M, Vieths S. What makes an allergen? *Clin Exp Allergy.*
29 2015;45:1150-1161.
- 30 Souza CCT, Filho NAR. Perfil de aeroalérgenos intradomiciliares comuns no Brasil:
31 revisão dos últimos 20 anos. *Rev Bras Alerg Immunopatol.* 2012;35(2):47-52.
- 32 Sporik R, Chapman MD, Platts-Mills TAE. House dust mite exposure as a cause of
33 asthma. *Clin Exp Allergy.* 1992;22:897-906.
- 34 Thomas WR. Geography of house dust mite allergens. *Asian Pac J Allergy Immunol.*
35 2010;28(4):211-24.
- 36 Thomas WE. Hierarchy and molecular properties of house dust mite allergens. *Allergol
37 Int.* 2015;64(4):304-311.

1 Trudinger M, Chua KY, Thomas WR. cDNA encoding the major mite allergen Der f II.
2 Clin Exp Allergy. 1991;21:33-37.

3 Wan H, Winton HL, Soeller C, Taylor GW, Gruener DC, Thompson PJ, Cannell MB,
4 Stewart GA, Garrod DR, Robinson C. The transmembrane protein occluding of
5 epithelial tight junctions is a functional target for serine proteases from faecal pellets of
6 *Dermatophagoides pteronyssinus*. Clin Exp Allergy. 2001;31(2):279-294.

7 Yamamoto M, Haruna T, Yasui K, Takahashi H, Iduhara M, Takasi S, Deguchi M,
8 Arimura A. A novel atopic dermatitis model induced by topical application with
9 *Dermatophagoides farinae* extract in NC/Nga mice. Allergol Int. 2007;56(2):139-148.

10 Yasueda H, Mita H, Yui Y, Shida T. Isolation and characterization of two allergens from
11 *Dermatophagoides farinae*. Int Arch Allergy Appl Immunol. 1986;81(3):214-223.

12 Zur G, Ihrke PK, White SD, Kass PH. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of
13 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical
14 features and allergy testing results. Vet Dermatol. 2002;13(2):89-102.

15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43

CAPÍTULO 2

Título: Avaliação da sensibilidade ao extrato bruto de *Dermatophagoides farinae* e seus alérgenos derivados, Der f 2 e Zen 1, em cães com dermatite atópica.

Autores:

Lucas A. Ludwig*, Marconi R. de Farias* ‡, Toshiroh Tsukui†

* Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba, PR 80215-901, Brasil

† Animal Life Science Laboratories, Nippon Zenyaku Kogyo Corporation (Zenoaq), 1-1 Tairanoue, Sasagawa, Asaka-machi, Koriyama, Fukushima 963-0196, Japan

‡ Clínica Veterinária Dermatovet, Rua Carmelo Rangel 85, Curitiba, PR CEP, Brasil

Correspondência: Lucas A. Ludwig, Departamento de Medicina Veterinária, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição 1155, Curitiba, PR 80215-901, Brasil. E-mail: lucas.ludwig@hotmail.com

Fonte financiadora: este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e pelo laboratório Zenoaq (Nippon Zenyaku Kogyo Co. Ltd.), que disponibilizaram os alérgenos e a técnica empregada em seus domínios.

Conflitos de interesse: Toshiroh Tsukui é um empregado da companhia financiando o estudo.

39 INTRODUÇÃO

40 Dermatite atópica é uma doença cutânea inflamatória, alérgica, pruriginosa,
41 geneticamente predisposta, com sinais clínicos característicos e geralmente associada
42 a produção de anticorpos IgE contra alérgenos ambientais, como pólenes, fungos e de
43 ácaros de poeira (Hensel et al, 2015). Dentre os ácaros de poeira, os do gênero
44 *Dermatophagoides* são o mais frequente, principalmente representado pelas espécies
45 *D. pteronyssinus* e *D. farinae* (Arlian e Platts-Mills, 2001). Estes são encontrados
46 especialmente na poeira domiciliar, principalmente em carpetes, tapetes, colchões e
47 outros materiais têxteis (Agratorres et al., 1999; Arlian e Morgan, 2003), onde a alta
48 umidade, moderada temperatura e disponibilidade de alimento os tornam ideais para
49 sua reprodução e desenvolvimento (Arlian e Morgan, 2003).

50 A sensibilização aos alérgenos do ácaro *D. farinae* é comum em cães com
51 dermatite atópica (Nuttall et al., 2006). Estudos prévios observaram que repetidas
52 aplicações epicutâneas de extratos de *D. farinae* levam ao aparecimento de sinais
53 clínicos, especialmente através do desenvolvimento de resposta Th2, o que denota a
54 importância desta via na sensibilização aos alérgenos de ácaros (Yamamoto et al.,
55 2007; Pucheu-Haston et al., 2008). Até o momento, segundo o sub-comitê de
56 nomenclatura de alérgenos e a União Internacional de Sociedades Imunológicas, 31
57 alérgenos derivados de *D. farinae* foram caracterizados e catalogados em banco de
58 dados, disponível em <www.allergen.org>. Dentre estes, alérgenos de alto peso
59 molecular do grupo 15 e 18 são classicamente considerados maiores na dermatite
60 atópica em cães (McCall et al, 2001; Nuttall et al., 2001; Weber et al., 2003). O Der f 2
61 possui uma sequência de 129 aminoácidos e um baixo peso molecular de 14kD
62 (Trudinger et al 1991) e foi considerado um alérgeno maior em cães com dermatite
63 atópica no Japão (Yamashita et al., 2002), Espanha (Moya et al., 2016) e Inglaterra
64 (Patel et al., 2019), e menor em alguns países da Europa (França e Suíça) e Estados
65 Unidos (Olivry et al., 2017). Os alérgenos do grupo 2 são classificados como proteínas
66 ligantes a lipídios, com alta capacidade de ligação a IgE e são encontrados nas fezes
67 dos ácaros (Thomas 2015). Contudo, outros autores afirmam que este grupo são
68 encontrados em baixas concentrações nas fezes e, portanto, derivam de outras fontes
69 que não os intestinos (Collof, 2009). O grupo 2 apresenta homologia estrutural com o
70 fator de diferenciação mieloide 2 (MD-2) e possuem alta capacidade de ligação com
71 receptores Toll Like-4 e com a padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs),
72 principalmente lipopolissacarídeos bacterianos (Ichikawa et al., 2009). Esta
73 característica pode fazer com que alérgenos do grupo 2 ativem a resposta imune inata
74 e a redirecione para um perfil de resposta imunológica Th2 (Ichikawa et al., 2009;
75 Scheurer et al., 2015).

76 Em adição, outro alérgeno derivado de *D. farinae* de alto peso molecular
77 (188kDa) e reconhecido como causa de sensibilização em cães com dermatite atópica
78 é o Zen 1 (Tsukui et al., 2008). Este foi considerado um alérgeno maior em cães com
79 dermatite atópica no Japão (Tsukui et al, 2008), Inglaterra (Patel et al., 2019), França,
80 Suíça e Estados Unidos (Olivry et al., 2017) e sua sequência está depositada no
81 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/BAM29295.1>).

82 O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade aos extratos de
83 *Dermatophagoides fariane* bruto, ao Der f 2 e Zen 1 em cães com dermatite atópica, e
84 se estes são capazes de representar sensibilização ao *D. farinae* bruto.

85

86 **MATERIAL E MÉTODOS**

87 Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Pontifícia
88 Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob o número 01185.

89

90 **Critérios de inclusão**

91 Ao todo foram incluídos 100 cães com diagnóstico clínico de dermatite atópica
92 com histórico de prurido crônico, primário e perene e padrões de distribuição lesional os
93 quais obedeciam ao menos cinco dos oito critérios pré-estabelecidos por Favrot et al.,
94 2010, e após a exclusão de outras dermatopatias pruriginosas. Cães de diferentes
95 raças e idades foram selecionados aleatoriamente a partir do Serviço de Dermatologia
96 e Alergia de Animais de Companhia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná e da
97 Clínica de Dermatologia e Alergia Veterinária Dermatovet, ambas situadas na cidade de
98 Curitiba, Estado do Paraná, Brasil.

99

100 **Critérios de exclusão**

101 Foram excluídos do projeto os cães que receberam algum tipo de imunoterapia,
102 alérgeno específica ou não, e aqueles cujo os tutores não anuíram com o projeto.

103

104 **Obtenção de amostras de soro**

105 Uma amostra de 5mL de sangue de cada cão foi coletada através de
106 venopunção jugular ou cefálica. O soro de cada amostra foi obtido após centrifugação e
107 uma alíquota de 0,5mL de cada amostra foi retirada, armazenada em microtubos,
108 identificada e mantida sob congelamento em -20°C até análise.

109

110 **Coleta de informações ambientais**

111 Durante anamnese de cada paciente e antes do exame dermatológico, dados
112 ambientais de cada paciente eram coletados como:

- 113 a) O animal tinha contato com tapetes e/ou carpetes?
114 b) O animal usava roupas para cães?
115 c) O animal tinha acesso livre aos cômodos e contato com cama e sofá?
116 d) O animal tinha cama ou individual?
117 e) O animal usava cobertor ou manta individual?

118

119 **ELISA**

120 *Imobilização antigênica*

121 O ELISA para detecção específica de IgE anti-Der f 2 e anti-Zen 1 foi realizado
122 no laboratório Zenoaq, pertencente a Nippon Zenyaku Kogyo Co. Ltda., localizada na
123 cidade de Koryiama, distrito de Fukushima, Japão. O teste utilizou anti-anticorpos IgE
124 monoclonais canino contra Der f 2 recombinante, Zen 1 nativo (Zenoaq) e extrato bruto
125 de *D. farinae* (Greer Laboratories, Carolina do Norte, Estados Unidos).

126 Como primeiro passo, o antígeno (*D. farinae* bruto, Der f 2 ou Zen 1) foi diluído
127 (concentração final de 50µg/mL) em solução tampão carbonada de pH 9.6.
128 Posteriormente, os poços de uma microplaca de ELISA foram revestidos com esta
129 diluição de antígeno (100µL por poço), cobertos com filme adesivo e incubados a 37°C
130 por uma hora. Após a incubação, foi realizada a lavagem da microplaca com solução
131 PBST (solução PBS com 0,1% de Tween 20).

132

133 *Bloqueio*

134 Uma solução tampão bloqueadora foi adicionada aos poços (100µL por poço) a
135 fim de bloquear os locais de ligação à proteínas insaturadas. Após o procedimento de
136 cobrimento com filme adesivo, incubação e lavagem com PBST foi realizado
137 novamente como descrito anteriormente.

138
139 *Preparação e incubação das amostras de soro dos cães*

140 Cada amostra de soro (30uL), juntamente com o controle positivo (soro de cães
141 sensibilizados ao alérgeno) e controle negativo (soro de cães hígidos pertencentes ao
142 Laboratório Zenoaq), foram diluídos em solução tampão bloqueadora (270uL). Esta
143 diluição (100uL por poço) foi utilizada para revestir poços de uma nova microplaca,
144 sempre em duplicata. Em seguida, novamente a microplaca foi coberta com filme
145 adesivo, incubada a 37°C e lavada por três vezes com PBST.

146
147 *Preparação e incubação dos anticorpos*

148 Uma solução conjugada com peroxidase de raiz forte contendo anticorpos anti-
149 IgE canina para determinado antígeno foi diluída em solução tampão bloqueadora
150 (1:10.000), e posteriormente adicionada uma porção desta diluição (100uL) em cada
151 poço previamente revestido com as amostras. Logo após, novamente foi realizado o
152 cobrimento com filme adesivo, incubação e lavagem com PBST como descrito no tópico
153 acima.

154
155 *Reação enzima-substrato*

156 Um substrato foi preparado através da mistura de solução TMB A e TMB B,
157 imediatamente antes do uso. Uma porção deste substrato (100uL) foi adicionada em
158 cada poço da microplaca. Após, a microplaca foi coberta por filme adesivo, incubada
159 por trinta minutos até desenvolver uma reação de coloração azul. Após os trinta
160 minutos, uma solução de 1N H₂SO₄ (ácido sulfúrico) foi adicionada aos poços com a
161 finalidade de conter a reação enzimática.

162
163 *Leitura da absorvância*

164 A leitura da absorvância (densidade ótica) de cada poço foi realizada em leitor de
165 microplaca (BIO-RAD, modelo 680; número 168-1000). Uma amostra foi considerada
166 positiva se a densidade ótica fosse superior a 0.2.

167
168 **Análise estatística**

169 Os dados demográficos dos animais participantes foram apresentados
170 descritivamente em percentual ou mediana. As variáveis inclusas foram raça, idade (em
171 categorias), gênero, e proporção de animais positivos a mensuração de IgE dos
172 alérgenos Der f 2, Zen 1 e *D. farinae* bruto. Para a comparação de proporções de
173 animais soropositivos para cada IgE foi usado teste qui-quadrado. Os dados foram
174 expostos em proporções, considerando intervalo de confiança de 95%, e nível de
175 significância a 5% ($p < 0,05$).

176 A correlação entre as mensurações de densidade óptica dos alérgenos Zen 1 e
177 Der f 2 em relação a HDM foram determinados pelo cálculo do coeficiente de
178 *Spearman*, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

179 A comparação de proporções de animais soropositivos para cada IgE, com sua
180 respectiva exposição ambiental foi realizada através de teste de qui-quadrado (REF)
181 considerando intervalo de confiança de 95%, e nível de significância a 5% ($p < 0,05$).

182 O software utilizado foi o STATA versão 14, College Station, Texas, USA.

183

184 **RESULTADOS**

185 **Dados epidemiológicos**

186 Um total de 23 raças foram incluídos no estudo, com predomínio de cães das
187 Lhasa Apso, Shih Tzu, Maltês e Bulldog Francês, bem como animais sem raça definida
188 (SRD). A idade variou entre 11 meses e 14 anos, com mediana de 5 anos. Em relação
189 ao gênero, 43% eram machos e 56% eram fêmeas.

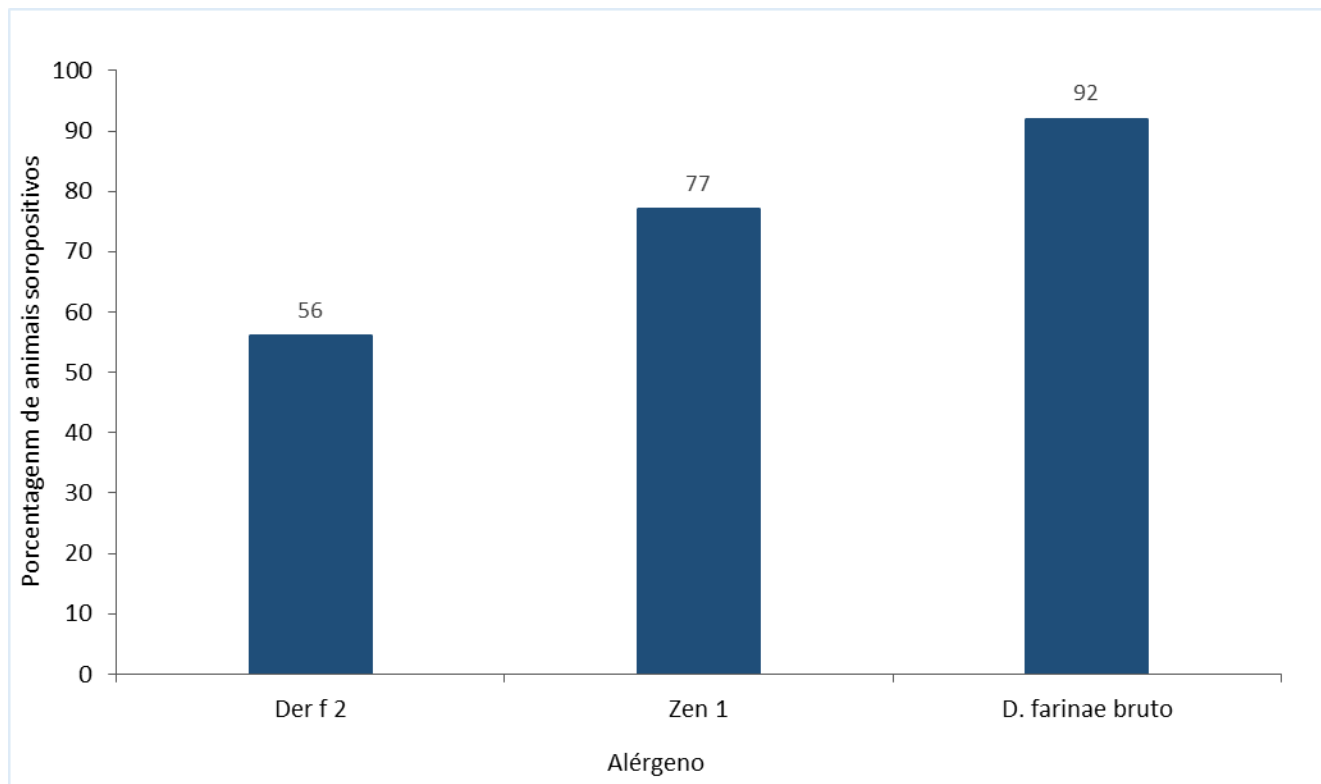
190

191 **Sorologia**

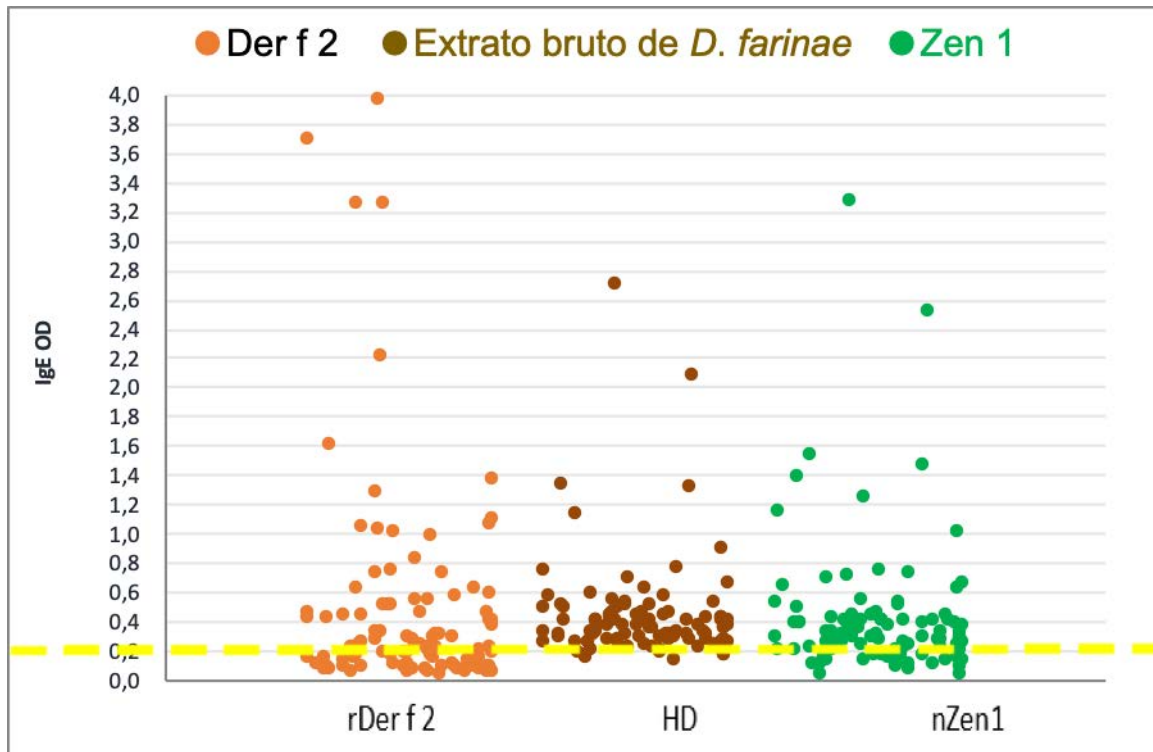
192 Os resultados da soropositividade aos alérgenos testados estão dispostos na
193 figura 1. Dentre os 100 cães, 92 (92%) foram positivos para *D. farinae* bruto, 56 (56%)
194 para Der f 2 e 77 (77%) para Zen 1. Os valores de densidade óptica a cada alérgeno de
195 cada animal estão representados na figura 2. Ao comparar a proporção da positividade
196 ao alérgeno bruto de *D. farinae* com Der f 2 e Zen1 observou-se diferença estatística
197 significativa ($p < 0,001$ e $p = 0,0057$ respectivamente). Ao comparar as proporções de
198 reatividade ao Der f 2 e Zen 1 observou-se diferença significativa ($p < 0,001$).

199 Ao correlacionar os valores de densidade óptica de IgE aos alérgenos
200 purificados com o extrato bruto de *D. farinae*, observou-se alta correlação entre Zen 1 e
201 extrato bruto de *D. farinae* (Spearman $r = 0,88$, $p < 0.001$; figura 3), ao passo que
202 observou-se uma baixa correlação deste com Der f 2 (Spearman $r = 0,30$; $p < 0.002$;
203 figura 4).

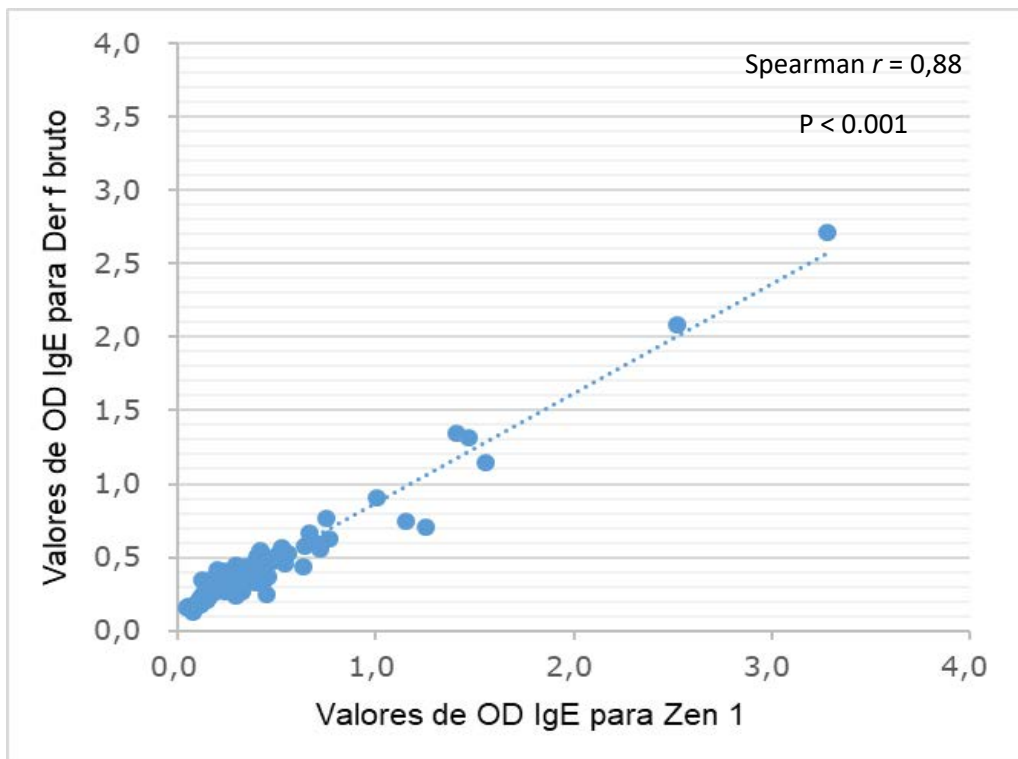
204



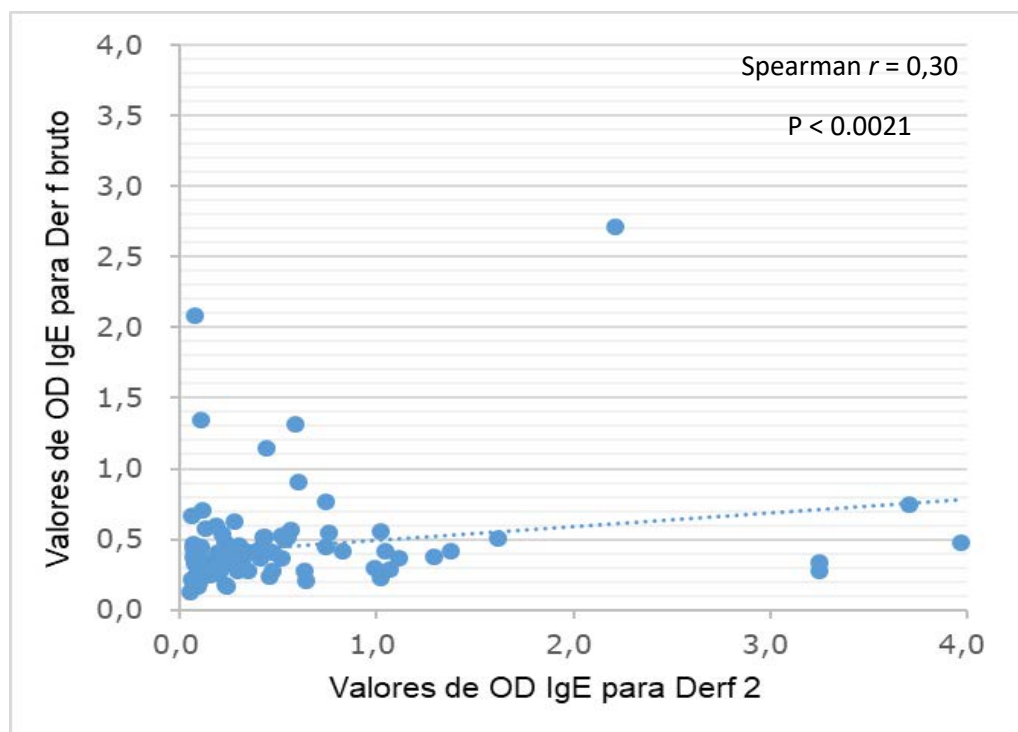
205
206
207
208
Figura 1. Percentual de animais soropositivos na mensuração de IgE para *D. farinae* bruto, Der f 2 e Zen 1.



209
210
211
Figura 2. Todos os valores de densidade óptica de IgE para cada alérgeno, no total de 100 amostras de soro provenientes de cães com dermatite atópica. HD: extrato bruto de *D. farinae*.



212
 213 **Figura 3.** Correlação entre valores de densidade óptica (OD) de IgE ao *Dermatophagoides farinae* bruto
 214 e Zen 1.
 215



216
 217 **Figura 4.** Correlação entre valores de densidade óptica (OD) de IgE ao *Dermatophagoides farinae* bruto
 218 e Der f 2.
 219
 220

221 **Alérgenos e contato com materiais ambientais**

222 Os resultados relacionando a positividade ao alérgeno e a exposição ambiental
223 dos cães estão dispostos na tabela 1. Apenas o uso regular de roupas representou
224 porcentagem menor de 50% dos animais. Embora sem diferença significativa entre os
225 alérgenos, a maior parte dos animais positivos para Der f 2 tinham acesso a sofás e
226 camas dos tutores (93%), ao passo que a maior parte dos positivos para Zen 1 tinham
227 acesso a cobertor para cães (88%), o que foi muito similar aos positivos para extrato
228 bruto de *D. farinae*.

229

230 **Tabela 1.** Descrição das porcentagens de animais positivos a cada alérgeno e o respectivo contato
231 ambiental.

Determinantes ambientais	Der f 2 (n=56)	Zen 1 (n=77)	<i>D. farinae</i> (n=92)
Sofá e cama	52 (93%)*	65 (84%)	76 (82%)
Tapetes	34 (61%)	47 (61%)	56 (61%)
Cama para cães	51 (91%)*	65 (84%)	78 (85%)
Cobertor para cães	48 (86%)	68 (88%)	80 (87%)
Roupas para cães	25 (45%)	32 (41%)	35 (38%)

232 * proporção de animais positivos a Der f 2, com acesso a sofá cama e cama, significativamente diferente
233 em relação a proporção e animais positivos a Zen 1 e *D. farinae* bruto com acesso aos mesmos
234 ambientes (teste de qui-quadrado, $p < 0,01$)
235

236 **DISCUSSÃO**

237 Este estudo demonstra que cães com dermatite atópica em Curitiba, sul do
238 Brasil, são comumente sensibilizados ao *Dermatophagoides farinae*, bem como aos
239 seus alérgenos Der f 2 e Zen 1. A alta sensibilização ao extrato bruto de *D. farinae* foi
240 também observada em estudos prévios em diferentes localidades (Day et al., 1996;
241 Lian e Halliwell, 1998; Goicoa et al., 2008; Farmaki et al., 2012; Lauber et al., 2012;
242 Bjelland et al., 2014; Olivry et al., 2017; Patel et al., 2019), embora diferentes técnicas
243 de pesquisa de IgE específica tenham sido utilizadas. No Brasil, estudos prévios
244 mostraram que esta espécie de ácaro de poeira doméstica também desempenha papel
245 importante na sensibilização de cães com dermatite atópica (Cunha et al., 2012; Pereira
246 et al., 2015). Neste estudo, por utilizar anticorpo monoclonal anti-IgE canina, é
247 improvável que esta alta sensibilização seja decorrente de anticorpos IgG, devido a alta
248 especificidade (Dérer et al., 1998). Contudo, devido ao fato que ácaros *D. farinae* e *D.*
249 *pteronyssinus* podem apresentar reação cruzada (Masuda et al., 1999), parte desta alta
250 sensibilização ao *D. farinae* pode ser decorrente de *D. pteronyssinus*.

251 No Brasil, *D. pteronyssinus* é encontrado mais comumente em regiões costeiras,
252 com umidade mais elevada, ao passo que *D. farinae* encontra-se em maiores
253 concentrações em regiões secas e quentes (Souza e Rosário, 2012). Alérgenos de *D.*
254 *pteronyssinus* parecem ser mais comuns na poeira domiciliar na região investigada
255 (Dutra et al., 2001; Farias et al., 2015; Assunção et al., 2017) e é importante ressaltar
256 que alérgenos do grupo 2 de *D. farinae* e *D. pteronyssinus* dividem até 85% de suas
257 sequências de aminoácidos, e reações cruzadas entre eles podem ocorrer (Masuda et
258 al., 1999; Smith et al., 2001). Porém, cães com dermatite atópica podem ser mais

259 comumente sensibilizados a *D. farinae* do que a outros ácaros (Bensignor e Carlotti,
260 2002; Foster et al., 2003; Farmaki et al., 2012), mesmo quando estes são mais
261 comumente encontrados no ambiente (Farmaki et al., 2012). Isto pode ser explicado
262 devido ao fato do *D. farinae* ser mais alergênico do que *D. pteronyssinus*.

263 Este estudo aponta que o alérgeno de baixo peso molecular, Der f 2, pode ser
264 considerado maior na região pesquisada, sendo o primeiro estudo que demonstrou a
265 importância deste alérgeno no continente americano. Classicamente, alérgenos
266 maiores de *D. farinae* que estão associados à eczema atópica em cães eram aqueles
267 de alto peso molecular, especialmente Der f 15 (98/109 kDa) e Der f 18 (60 kDa)
268 (McCall et al., 2001; Nuttall et al., 2001; Weber et al., 2003). Os alérgenos de baixo
269 peso molecular eram considerados de menor importância (Noli et al., 1996; Nuttall et
270 al., 2001), exceto no Japão (Masuda et al., 1999; Yamashita et al., 2002).

271 Estudos japoneses foram os primeiros a demonstrar a importância destes
272 alérgenos em cães com dermatite atópica, onde cerca de 43% de 16 cães
273 apresentaram anticorpos IgE contra Der f 2 em 1999 (Masuda et al., 1999) e 75% de 90
274 cães foram positivos para Der f 2 em 2002 (Yamashita et al., 2002). Em um estudo
275 prévio brasileiro, apenas 20% de amostras de soro de 10 cães reconheceram bandas
276 entre 12 e 17 kDa, possivelmente Der f 2 (Cunha et al., 2012). Contudo, em 2016, um
277 estudo demonstrou uma alta prevalência de alérgenos de baixo peso molecular de *D.*
278 *farinae* no soro de cães com dermatite atópica no Brasil, utilizando western blot com
279 anticorpo IgE canino monoclonal (Possebom et al., 2016). Os resultados deste estudo
280 demonstraram 100% das amostras de soro de cães reconhecerem bandas entre 21 e
281 31 kDa, possivelmente Der f 1 e 40% das amostras reconhecerem bandas de peso
282 molecular similar ao Der f 2.

283 Mais recentemente, com a padronização de técnicas altamente específicas
284 utilizando alérgenos purificados e recombinantes, além de anticorpos monoclonais,
285 estes alérgenos de baixo peso molecular estão ganhando destaque, com 100% e 97%
286 dos cães apresentando IgE contra Der f 2 na Espanha e Inglaterra, respectivamente
287 (Moya et al., 2016; Patel et al., 2019). Contudo, nos Estados Unidos (especificamente
288 no Estado da Carolina do Norte), França e Suíça, o alérgeno Der f 2 parece não
289 promover sensibilização nos cães (Olivry et al., 2017). Esta discrepância entre estudos
290 de diferentes regiões demonstra a importância que variações geográficas promovem
291 sobre a genética e alergenicidade destes alérgenos.

292 Uma alta soropositividade ao alérgeno Zen 1 também foi observada no presente
293 trabalho, o qual é um alérgeno de alto peso molecular de 188 kDa (variando de 150 a
294 250 kDa). Este alérgeno foi primeiramente identificado em estudo japonês publicado em
295 2008, no qual o soro dos cães com dermatite atópica reconheceram bandas de 188 kDa
296 de *D. farinae* que não apresentava homologia com os alérgenos até então reconhecidos
297 (Tsukui et al., 2008). Este alérgeno foi caracterizado e sequenciado e ganhou o nome
298 provisório de Zen 1, que ainda é utilizado atualmente. No primeiro estudo publicado que
299 pesquisou presença de IgE contra o Zen 1 nativo, dos 33 cães com dermatite atópica
300 espontânea nos Estados Unidos (Estado da Carolina do Norte), 88% foram
301 soropositivos ao alérgeno, ao passo que 90% de 29 cães foram positivos na Europa
302 (França e Suíça), caracterizando este novo alérgeno como maior nestas localidades
303 (Olivry et al., 2017). Em seguida, este alérgeno também foi considerado maior na região
304 sudeste da Inglaterra, onde 76% de 59 cães foram considerados positivos (Patel et al.,
305 2019). Em adição, proteínas de 175 kDa foram identificadas em um estudo que

306 caracterizada um extrato de *D. farinae*, que poderia ser Zen 1 (Moya et al., 2016).
307 Interessantemente, no Brasil, um estudo prévio demonstrou que cinco de 10 cães
308 reconheceram bandas de 225 kDa, através de western blot, que também poderiam ser
309 Zen 1, mas nenhuma investigação posterior foi realizada neste caso (Cunha et al.,
310 2012). Finalmente, um estudo demonstrou que cães com dermatite atópica
311 apresentaram maior produção de anticorpos IgG, especificamente IgG1, contra uma
312 proteína de 180 kDa de *D. farinae* (Hou et al., 2006).

313 O alérgeno Zen 1 ainda é pouco conhecido e sua função ainda não é clara. Sua
314 sequência é diferente de outros alérgenos de ácaros da espécie *Dermatophagoides*
315 spp., contudo, é possível que o Zen 1 divida epítomos conformacionais de superfície
316 com Der f 15. Em adição, ambas proteínas também convergem em porções altamente
317 O-glicosiladas e é plausível se pensar que ambos os alérgenos possam apresentar
318 reações cruzadas (Olivry et al., 2017). Esta reação cruzada pode explicar, neste estudo,
319 a alta positividade a Zen 1 quando comparada a Der f 2, uma vez que Der f 15 é um
320 alérgeno maior no Brasil (Cunha et al., 2012; Possebom et al., 2016).

321 No presente estudo, os níveis de densidade óptica entre o extrato bruto de *D.*
322 *farinae* e Zen 1 foram significativamente correlacionados, o que não aconteceu com Der
323 f 2 e o extrato bruto. Assim, provavelmente, a sororreatividade ao extrato bruto de *D.*
324 *farinae* está fortemente relacionada aos alérgenos de alto peso molecular, como
325 observado em estudo prévio (Olivry et al., 2017).

326 O papel de anticorpos IgE na fisiopatogenia da dermatite atópica ainda requer
327 melhores esclarecimentos. Os efeitos fisiológicos e patofisiológicos da IgE são
328 manifestados através da interação com seus receptores de alta afinidade (FcεRIα) e de
329 baixa afinidade (CD23), na superfície de células efetoras, principalmente mastócitos,
330 basófilos e eosinófilos, promovendo a liberação de citocinas e mediadores
331 inflamatórios, além de regular mudanças na produção de anticorpos por plasmócitos e
332 linfócitos B, e na apresentação de antígenos por linfócitos B e células dendríticas
333 (Hammerberg, 2014). É sabido que cães não atópicos podem apresentar altos níveis de
334 IgE específica a determinados alérgenos (Lian e Haliwell, 1998; Roque et al., 2011;
335 Lauber et al., 2012). Entretanto, alguns cães experimentalmente sensibilizados podem
336 apresentar baixos níveis de IgE alérgeno específico (Okayama et al., 2011). Essa
337 controversa correlação entra níveis de IgE e doença clínica pode ser explicada pela
338 possibilidade de apenas a porção variável deste é direcionada contra alérgenos
339 ambientais (Pucneau-Haston et al, 2015). Assim, o fato destes animais apresentarem
340 níveis sorológicos de IgE acima do ponto de corte implica em sensibilização, mas não
341 necessariamente em desenvolvimento e desencadeamento de sinais clínicos, uma vez
342 que a imunopatogênese da doença é extremamente complexa. A molécula de IgE pode
343 ser funcionalmente heterogênea, com frações que diferenciam-se em alergenicidade,
344 mobilidade e habilidade de ligar-se à outras moléculas (Pucneau-Haston et al., 2015).
345 Contudo, a resposta benéfica em humanos com dermatite atópica após utilizar terapia
346 parenteral com anticorpo monoclonal direcionado a IgE comprova que este anticorpo
347 tem papel importante na patofisiologia da doença (Sheinkopf et al., 2008).

348 A importância de alérgenos de *D. farinae* na dermatite atópica em cães também
349 pode ser reforçada através da resposta positiva à imunoterapia com Der f 2
350 recombinante conjugado a pullulan, os quais apresentaram melhora na manifestação
351 clínica da doença, redução nos seus escores clínicos e de prurido, além de redução no
352 uso de medicação, após poucos meses de uso do produto (Olivry et al., 2017; Kawano

353 e Mizuno, 2017; Fischer et al., 2018). Interessante observar que tanto cães
354 sabidamente positivos para Der f 2, como cães apenas positivos para *D. farinae* bruto
355 se beneficiaram desta opção terapêutica, e este produto se mostrou benéfico em cães
356 sensibilizados a múltiplos alérgenos ambientais, além de *D. farinae* (Kawano e Mizuno,
357 2017). Entretanto, este resultado contrasta com um estudo prévio que mostrou que a
358 imunoterapia específica para *D. farinae* foi ineficaz em cães sensibilizados a outros
359 alérgenos ambientais, em adição ao *D. farinae* (Willemse et al., 2009). Esta disparidade
360 de resultados pode ser explicada pela diferente composição dos extratos, seleção dos
361 pacientes e protocolos utilizados. Por exemplo, o adjuvante utilizado na imunoterapia
362 anti-Der f 2 é o polissacarídeo pullulan, que apresenta propriedades de redução do
363 poder de reconhecimento de IgE e de sua alergenicidade, além de promover citocinas
364 Th1 (Mehvar, 2003; Wang et al., 2016).

365 Embora existam diferentes rotas de sensibilização a alérgenos ambientais em
366 cães atópicos, a penetração epicutânea é a principal via em cães com dermatite atópica
367 e ocorre através do contato direto dos cães com estes alérgenos (Marsella et al., 2006).
368 Apesar da presença destes ácaros também ocorrer na pelagem e pele de cães (Randall
369 et al., 2005; Farias et al., 2015, Assunção et al., 2017), suas concentrações ambientais
370 são significativamente maiores (Assunção et al., 2017).

371 A alta soropositividade aos alérgenos aqui demonstrados coincide com uma alta
372 exposição à material reservatório de ácaros de poeira doméstica. Em Curitiba, a
373 temperatura média anual é de cerca de 20°C, com umidade relativa do ar entre 60-80%
374 (Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil), o que torna o ambiente ideal para o
375 desenvolvimento e reprodução de ácaros da espécie *Dermatophagoides* (Arlian e
376 Platts-Mills, 2001). É notório que estes ácaros são altamente concentrados em
377 ambientes domiciliares, especialmente em locais onde há presença de mobiliário e
378 material têxtil como estofados, como tapetes, colchões, sofás e camas (Arlian e
379 Morgan, 2003; Assunção et al., 2017) e a grande maioria dos animais positivos para os
380 alérgenos testados tinham liberdade de trânsito dentro de seus domicílios.

381 Ainda, a maioria dos cães aqui relatados tinha acesso à cama para cachorros
382 que geralmente abriga altas concentrações de ácaros de poeira doméstica e seus
383 alérgenos (Eaton et al., 1985; Randall et al., 2003; Raffan et al., 2005; Assunção et al.,
384 2017). Essa concentração alta de alguns alérgenos nesse material pode ser explicada
385 pela presença de restos de alimentos e outros substratos para a alimentação dos
386 ácaros, além de manter temperatura e umidade adequada. Assim, a lavagem frequente
387 destas camas pode auxiliar na redução da quantidade de alérgenos ambientais (Raffan
388 et al., 2005).

389 Parte dos cães estudados usavam regularmente roupas de lã ou material
390 sintético, as quais também são reconhecidos reservatórios para ácaros e seus
391 alérgenos (Neal et al., 2002; Teplisky et al., 2008). Um estudo demonstrou que ácaros
392 de *D. farinae* são isolados em cerca de 58% de roupas de humanos atópicos (Teplisky
393 et al., 2008). A diferença do tecido também parece interferir na concentração de ácaros.
394 O tecido denso e fibroso conhecido como *fleece* parece abrigar maiores níveis de
395 ácaros do que o algodão (Clarke et al., 2015). Assim, é possível que o hábito de vestir
396 cães com diferentes tipos de roupas possa aumentar à exposição a alérgenos
397 ambientais e favorecer a sensibilização em indivíduos predispostos.

398 Em conclusão, cães com dermatite atópica em Curitiba, região Sul do Brasil, são
399 frequentemente sensibilizados a *D. farinae*, e seus alérgenos Der f 2 e Zen 1 são

400 alérgenos maiores nestes animais. A sensibilização ao Zen 1 parece ser a principal
401 responsável à sensibilização ao ácaro *D. farinae* e a frequente exposição com mobília e
402 materiais têxteis domiciliares pode favorecer a esta sensibilização.

403 **REFERÊNCIAS**

- 404
405 Favrot C, Steffan J, Seewald W *et al.* A prospective study on the clinical features of
406 chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol* 2010; 21: 23-31.
407
408 Hensel P, Santoro D, Favrot C *et al.* Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for
409 diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res* 2015; 11: 196.
410
411 Arlian LG, Platts-Mills TAE. The biology of dust mites and the remediation of mite
412 allergens in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 3; S406-413.
413
414 Agratorres JM, Pereira-Lorenzo A, Fernandez-Fernandez I. Population dynamics of
415 house dust mites (acarí: pyroglyphidae) in Santiago de Compostela (Galicia, Spain).
416 *Acarologia* 1999; 40: 59-63.
417
418 Arlian LG, Morgan MS. Biology, ecology and prevalence of dust mites. *Immunol Allergy*
419 *Clin N Am* 2003; 23: 443-468.
420
421 Nuttall TJ, Hill PB, Bensignor E *et al.* House dust and forage mite allergens and their
422 role in human and canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2006; 17: 223-35.
423
424 Yamamoto M, Haruna T, Yasui K *et al.* A novel atopic dermatitis model induced by
425 topical application with *Dermatophagoides farinae* extract in NC/Nga mice. *Allergol Int*
426 2007; 56: 139-148.
427
428 Pucheu-Haston CM, Jackson HA, Olivry T *et al.* Epicutaneous sensitization with
429 *Dermatophagoides farinae* induces generalized allergic dermatitis and elevated mite-
430 specific immunoglobulin E levels in canine model of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*
431 2008; 38: 667-669.
432
433 McCall C, Hunter S, Stedman K *et al.* Characterization and cloning of a major high
434 molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. *Vet Immunol*
435 *Immunopathol* 2001; 78: 231-247.
436
437 Nuttall TJ, Lamb JR, Hill PB. Characterisation of major and minor *Dermatophagoides*
438 allergens in canine atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 2001; 71: 51-7.
439
440 Weber E, Hunter S, Stedman K *et al.* Identification, characterization, and cloning of a
441 complementary DNA encoding a 60-kd house dust mite allergen (Der f 18) for human
442 beings and dogs. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112: 79-86.
443
444 Trudinger M, Chua KY, Thomas WR. cDNA encoding the major mite allergen Der f II.
445 *Clin Exp Allergy* 1991; 21: 33-37.
446
447 Yamashita L, Fujiwara C, Azuma R *et al.* Determination of antigenic proteins of
448 housedust mites in 90 dogs suffering from atopic dermatitis. *J Vet Med Sci* 2002; 64:
449 673-6.

450
451 Moya R, Carnés J, Sinovas N *et al.* Immunoproteomic characterization of a
452 *Dermatophagoides farinae* extract used in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet*
453 *Immunol Immunopathol* 2016; 1: 1-8.
454
455 Olivry T, Dunston SM, Favrot C *et al.* The novel high molecular weight
456 *Dermatophagoides farinae* protein Zen-1 is a major allergen in North American and
457 European mite allergic dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2017; 28: 177-e38
458
459 Thomas WE. Hierarchy and molecular properties of house dust mite allergens. *Allergol*
460 *Int* 2015; 64: 304-311.
461
462 Colloff, MT. *Dust mites*. Collingwood: CSIRO, 2009.
463
464 Ichikawa S, Takai T, Yashiki T *et al.* Lipopolysaccharide binding of the mite allergen Der
465 f 2. *Genes Cells* 2009; 14: 1055-1065.
466
467 Scheurer S, Toda M, Vieths S. What makes an allergen? *Clin Exp Allergy* 2015; 45:
468 1150-1161.
469
470 Tsukui T, Sakaguchi M, Ohashi S *et al.* Analysis of house dust mite (*D. farinae*)
471 allergens in canine atopic dermatitis. *J Aller Clin Immunol* 2008; 121: S34 (abstract).
472
473 Favrot C, Steffan J, Seewald W *et al.* A prospective study on the clinical features of
474 chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol* 2010; 21: 23-31.
475
476 Day MJ, Corato A, Shaw SE. Subclass profile of allergen-specific IgE antibodies in
477 atopic dogs. *Res Vet Sci* 1996; 61: 136-142.
478
479 Lian TM, Halliwell REW. Allergen-specific IgE and IgGd antibodies in atopic and normal
480 dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; 66: 203-223.
481
482 Goicoa A, Espino L, Rodriguez I *et al.* Importance of house dust and storage mites in
483 canine atopic dermatitis in the geographic region of Galicia, Spain. *Acta Vet Hung* 2008;
484 56: 163-71.
485
486 Farmaki R, Saridomichelakis MN, Leontides L *et al.* Dust mite species in the households
487 of mite-sensitive dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2012; 23: 222-e45.
488
489 Lauber B, Molitor V, Meury S *et al.* Total IgE and allergen-specific IgE and IgG antibody
490 levels in sera of atopic dermatitis affected and non-affected Labrador-and Golden
retrievers. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 149: 112-118.

491 Bjelland AA, Doiva FL, Nødtvedt A *et al.* Prevalence of and risk factors for increased
492 serum levels of allergen-specific IgE in a population of Norwegian dogs. *Acta Vet Scand*
493 2014; 56.
494

495 Cunha VES, Silva MH, Faccini JLH. Serological identification of house dust mite
496 allergens in dogs with atopic dermatitis. *Pesq Vet Bras* 2012; 32: 917-921.
497 Pereira DT, Cunha VES, Schimidt C *et al.* Sensitization study of dogs with atopic
498 dermatitis in the central region of Rio Grande do Sul. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2015;
499 67: 1533-1538.
500

501 Dérer M, Morrison-Smith G, De Weck AL. Monoclonal anti-IgE antibodies in the
502 diagnosis of dog allergy. *Vet Dermatol* 1998; 9: 185-190.
503

504 Masuda K, Tsujimoto H, Fujiwara S *et al.* IgE sensitivity and cross-reactivity to crude
505 and purified mite allergens (Der f 1, Der f 2, Der p 1, Der p 2) in atopic dogs sensitive to
506 *Dermatophagoides* mite allergens. *Vet Immunol Immunopathol* 1999; 72: 303-313.
507

508 Souza CCT; Rosario NA. Perfil de aeroalérgenos intradomiciliares comuns no Brasil:
509 revisão dos últimos 20 anos. *Rev Bras Alerg Immunopathol* 2012; 35: 47-52.
510

511 Dutra BMRS, Filho NAR, Zavadniak AF. Inhalant allergens in Curitiba: a review of its
512 clinical importance. *Braz J Allergy Immunol* 2001; 24: 189-195.
513

514 Farias MR, Barbosa M, Arruda LK *et al.* Evaluation of the concentration of the coat of
515 dogs aeroallergens (*Canis lupus familiaris*) and the dust from families of children with
516 asthma and or allergic rhinitis. *World Allergy Organ J* 2015; 8: A171.

517 Assunção DL, Farias MR, Barbosa M *et al.* Evaluation of the concentration of allergens
518 from mites in fur and households dust of dogs with atopic dermatitis. *Pesq Vet Bras*
519 2017; 37: 41-46.
520

521 Smith AM, Benjamin DC, Hozic N *et al.* The molecular basis of antigenic cross-reactivity
522 between the group 2 mite allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 977-984.

523 Bensignor E, Carlotti DN. Sensitivity patterns to house dust mites and forage mites in
524 atopic dogs: 150 cases. *Vet Dermatol* 2002; 13: 37-42.
525

526 Foster AP, Littlewood JD, Webb P *et al.* Comparison of intradermal and serum testing
527 for allergen-specific IgE using a FcεRIa-based assay in atopic dogs in the UK. *Vet*
528 *Immunol Immunopathol* 2003; 93: 51-30.
529

530 Noli C, Bernadina WE, Willemse T. The significance of reactions to purified fractions of
531 *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* in canine atopic
532 dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 1996; 52: 147-157.
533

534 Possebom J, Cunha V, Lima M *et al.* Serological identification of low molecular weight
535 allergens from domestic mites associated with canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*
536 2016; 27: 49 (abstract).
537

538 Hou CC, Day MJ, Nuttall T *et al.* Evaluation of IgG subclass responses against
539 *Dermatophagoides farinae* allergens in healthy and atopic dogs 2006; 17: 103-110.

540 Hammerberg B. Immunoglobulin E. In: Noli C, Foster A, Rosenkrantz W. *Veterinary*
541 *Allergy*. 1st edition. Chichester: John Wiley & Sons, 2000; 8-15.

542 Roque JB, O'Leary CA, Kyaw-Tanner M *et al.* High allergen-specific serum
543 immunoglobulin E levels in nonatopic West Highland white terriers. *Vet Dermatol* 2011;
544 22: 257-66.

545

546 Okayama T, Matsuno Y, Yasuda N *et al.* Establishment of a quantitative ELISA for the
547 measurement of allergen-specific IgE in dogs using anti-IgE antibody cross-reactive to
548 mouse and dog IgE. *Vet Immunol Immunopathol* 2011; 139: 99-106.
549

550 Pucheau-Haston CM, Bizikova P, Eisenschenk MNC *et al.* Review: the role of
551 antibodies, autoantigens and food allergens in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*
552 2015; 26: 115-e30

553 Sheinkopf LE, Rafi AW, Do LT *et al.* Efficacy of omalizumab in the treatment of atopic
554 dermatitis: a pilot study. *Allergy Asthma Proc* 2008; 29: 530-537.
555

556 Olivry T, Paps JS, Dunston SM. Proof of concept of the preventive efficacy of high-dose
557 recombinant mono-allergen immunotherapy in atopic dogs sensitized to the
558 *Dermatophagoides farinae* allergen Der f 2. *Vet Dermatol* 2017; 28: 183-e40.
559

560 Kawano K, Mizuno T. A pilot study of the effect of pullulan-conjugated Der f 2 allergen-
561 specific immunotherapy on canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2017; 28: 583-e141.

562 Fischer N, Tarpataki N, Leidi F *et al.* An open study on the efficacy of a recombinant Der
563 f 2 (*Dermatophagoides farinae*) immunotherapy in atopic dogs in Hungary and
564 Switzerland. *Vet Dermatol* 2018; 29: 337-e118.
565

566 Willemse T, Bardagi M, Carlotti DN *et al.* *Dermatophagoides farinae*-specific
567 immunotherapy in atopic dogs with hypersensitivity to multiple allergens: a randomized,
568 double blind, placebo-controlled study. *Vet J* 2009; 180: 337-342.
569

570 Mehvar R. Recent trends in the use of polysaccharides for improved delivery of
571 therapeutic agents: pharmacokinetic and pharmacodynamics perspectives. *Curr Pharm*
572 *Biotechnol* 2003; 4: 283-302.
573

574 Wang F, Qiao L, Chen L *et al.* The immunomodulatory activities of pullulan and its
575 derivatives in human pDC-like CAL-1 cell line. *Int J Biol Macromol* 2016; 86: 764-771.
576

577 Marsella R, Nicklin C, Lopez J. Studies on the role of routes of allergen exposure in high
578 IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Vet Dermatol* 2006; 17: 306-
579 312.
580
581 Randall AJ, Hillier A, Cole LK *et al.* Quantitation of house dust mite allergens (Der f 1
582 and group 2) on the skin and hair of dogs. *Am J Vet Res* 2005; 66: 143-149.
583
584 Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em < <http://www.inmet.gov.br/portal/>>.
585
586 Eaton K, Downing FS, Griffiths DA *et al.* Housedust mites (*D. pteronyssinus*) in pets'
587 beds and their relation to dust allergy. *Clin Allergy* 1985; 15: 151-154.
588
589 Randall A, Hillier A, Cole LK *et al.* Quantitation of house dust mites and house dust mite
590 allergens in the microenvironment of dogs. *J Vet Res* 2003; 64: 1580-1588.
591
592 Raffan E, Lawrence H, Henderson T *et al.* Prevalence of the group 1 *Dermatophagoides*
593 allergens Der p 1 and Der f 1 in homes with no dogs, healthy dogs and
594 *Dermatophagoides*-sensitized atopic dogs in Liverpool. *Vet Dermatol* 2005; 16: 253-260.
595
596 Neal JS, Arlian LG, Morgan MS. Relationship among house-dust mites, Der f 1, Fel d 1
597 and Can f 1 on clothing and automobile seats with respect to densities in houses. *Ann*
598 *Allergy Asthma Immunol* 2002; 88: 410-415.
599
600 Teplitzky Vm Mumcuoglu KY, Babai I *et al.* House dust mites on skin, clothes and
601 bedding of atopic dermatitis patients. *Int J Dermatol* 2008; 47: 790-795.
602
603 Clarke D, Burke D, Gormally M *et al.* Dynamics of house dust mite transfer in modern
604 clothing fabrics. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2015; 114: 335-340.

1 **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

2

3 O conhecimento dos alérgenos ambientais associados a sensibilização de cães
4 com dermatite atópica é fundamental para entender a fisiopatogenia da doença e
5 aprimorar a condução terapêutica.

6 Este estudo demonstrou que cães com dermatite atópica em Curitiba são
7 altamente sensibilizados a alérgenos de ácaros de poeira doméstica, neste caso,
8 derivados de *Dermatophagoides farinae*.

9 Mais da metade dos cães foram positivos sorologicamente para o extrato bruto
10 de *D. farinae*, e seus alérgenos purificados, Der f 2 e Zen 1. Assim, podemos considerar
11 que estes são maiores em cães com dermatite atópica na cidade. Este estudo é mais
12 um passo importante na ênfase da importância de alérgenos de baixo peso
13 molecular (Der f 2) na sensibilização de cães.

14 Novos estudos com outros alérgenos purificados derivados de ácaros de poeira
15 doméstica são necessários para melhor mapear a doença na cidade e no mundo, bem
16 como estudos utilizando imunoterapia alérgeno-específica a fim de comprovar
17 clinicamente a importância destes alérgenos na fisiopatogenia da doença.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Termo de consentimento de uso animal

TERMO DE CONSENTIMENTO DE USO ANIMAL

NOME DO (A) PESQUISADOR (A) RESPONSÁVEL: Marconi Rodrigues de Farias

NOMES DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA: Lucas André Ludwig; Izabela Limeira; Juliane Possebom

1. **NATUREZA DA PESQUISA:** *O Sr. (Sra.) está sendo convidada (o) a autorizar a participação de seu(s) animal(is) nesta pesquisa que tem como finalidade de identificar a presença de dois tipos de alérgenos de ácaros de poeira doméstica no sangue de cães com dermatite atópica.*
2. **IDENTIFICAÇÃO DO(S) ANIMAIS(IS):** *Ao todo, serão coletadas 100 amostras de sangue de 100 cães com o diagnóstico clínico de dermatite atópica canina.*
3. **ENVOLVIMENTO NA PESQUISA:** *ao participar deste estudo o Sr. (Sra.) permitirá que o (a) pesquisador (a) colete uma amostra de sangue do animal. O Sr. (Sra.) tem liberdade de se recusar a participar e ainda se recusar a continuar participando em qualquer fase da pesquisa, sem qualquer prejuízo para o seu animal. Sempre que quiser poderá pedir mais informações sobre a pesquisa através do telefone do (a) pesquisador (a) do projeto e, se necessário através do telefone da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).*
4. **SOBRE OS DADOS NECESSÁRIOS:** *Informações relevantes ao ambiente do animal, locais de lesões clínicas, e histórico de uso de medicamentos para o controle da doença, bem como a idade do animal, raça e sexo.*
5. **RISCOS E DESCONFORTO:** *Estresse para contenção e coleta de amostra sanguínea pela via jugular ou cefálica. Os procedimentos adotados nesta pesquisa obedecem aos Princípios Éticos na Experimentação Animal segundo a Lei Federal 11794, de 08 de outubro de 2008.*
6. **CONFIDENCIALIDADE:** *todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente os pesquisadores terão conhecimento dos dados.*
7. **BENEFÍCIOS:** *esperamos que este estudo traga informações importantes sobre o papel destes ácaros de poeira doméstica na precipitação da coceira e lesões na dermatite atópica canina na cidade de Curitiba e região metropolitana, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa auxiliar no entendimento da doença e facilitar medidas de controle e tratamento, o pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.*

Termo de consentimento de uso animal (continuação)

8. **PAGAMENTO:** o Sr. (Sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação. Os custos das análises laboratoriais serão arcadas pelo laboratório parceiro.

Após estes esclarecimentos, solicitamos o seu consentimento de forma livre para participar desta pesquisa. Portanto preencha, por favor, os itens que se seguem:

Tendo em vista os itens acima apresentados, eu, de forma livre e esclarecida, manifesto meu consentimento em participar da pesquisa.

Eu..... Portador de RG nº
..... CPF nº..... Telefone.....Residente
à Proprietário/responsável pelo(s) animal (is)
..... Espécie Raça
sexo.....autorizo a utilizar o animal como sujeito de pesquisa para fins didáticos e científicos.

Assinatura do Proprietário

Assinatura do Pesquisador

TELEFONES

Pesquisador (es): Lucas André Ludwig (45) 999193712

Orientador: Marconi Rodrigues de Farias

CEUA-PUCPR: (41) 3271-2292 / ceua@pucpr.br

ANEXOS

ANEXO A

Normas do periódico Veterinary Dermatology

O idioma para publicação é o inglês.

Tamanho A4, com margens de 2,5cm, espaço simples, alinhado à esquerda, podendo optar pelas fontes Helvetica, Arial ou Verdana, tamanho 12. Cada linha e página do manuscrito deve ser numerada consecutivamente desde a página do título.

Para trabalhos científicos, os manuscritos devem ser arranjados na seguinte ordem: título e agradecimentos; resumo com subdivisões (contexto, hipótese/objetivos, animais, métodos, resultados, conclusões e importância clínica; texto com subdivisões (introdução, material e métodos, resultados e discussão), referências; legendas de ilustrações.

As legendas das ilustrações devem ser dadas ao final do manuscrito. Símbolos e abreviações devem ser identificados. Fotografias devem ter resolução de 300dpi.

Em relação às referências, quando houver mais de três autores, os três primeiros devem ser citados seguido de “et al”. Os nomes dos periódicos devem ser referenciados abreviados, de acordo com Index Medicus e a National Library of Medicine (NLM website).

As normas encontram-se, em inglês, disponíveis no link <<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13653164/homepage/ForAuthors.html#Submissions>>

ANEXO B

Parecer do CEUA



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

Curitiba, 23 de novembro de 2017.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01185 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: *AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS ALÉRGENOS DER F 2 E ZEN 1 NO SORO DE CÃES COM DERMATITE ATÓPICA*

01185 A - AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE IN VITRO AOS ALERGENOS DER F 2 E ZEN 1 EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

MARCONI RODRIGUE DE FARIAS

EQUIPE DE PESQUISA

Lucas André Ludwing, Isabela Lorusso Caversan Limeira, Juliane Possebom de Oliveira

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CURSO

Medicina Veterinária

VIGÊNCIA DO PROJETO	Novembro 2017 a Novembro 2018	QUANTIDADE DE ANIMAIS	130
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Canis lupus familiaris</i>	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	Aleatório	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	Aleatório	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	CVE - PUCPR	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi APROVADO pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização.

Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil
Telefone: (41) 3271-2292 www.pucpr.br

Parecer do CEUA (continuação)



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética em Pesquisa no Uso de Animais

O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.

Atenciosamente,
Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

