

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

JULIANE POSSEBOM

**IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS
DOMICILIARES ASSOCIADOS À SENSIBILIZAÇÃO EM CÃES COM
DERMATITE ATÓPICA**

(Serological identification of allergens of domestic mites in sensitized dogs with atopic dermatitis)

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

JULIANE POSSEBOM

**IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS
DOMICILIARES ASSOCIADOS À SENSIBILIZAÇÃO EM CÃES COM
DERMATITE ATÓPICA**

(Serological identification of allergens of domestic mites in sensitized dogs with atopic dermatitis)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias.

Co-orientador: Dr. Victor do Espírito Santo Cunha.

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2015

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	vi
AGRADECIMENTOS.....	vii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	ix
RESUMO GERAL.....	x
GENERAL ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xii
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
CAPÍTULO 1	1
1 INTRODUÇÃO	1
2 TAXONOMIA E ECOLOGIA DOS ÁCAROS	3
3 PRINCIPAIS ALÉRGENOS DE ÁCAROS DA POEIRA DOMICILIAR.....	5
4 ALÉRGENOS DE ÁCAROS COMO FATORES EXTRÍNSECOS	8
CAPÍTULO 2.....	13
RESUMO	13
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO	15
2 OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1 COMITÊ DE ÉTICA.....	17
3.2 TIPO DE ESTUDO.....	17
3.3 GRUPO EXPERIMENTAL.....	17
3.3.1 Grupo de cães com dermatite atópica.. (GDA).....	17

3.3.1.1 Critérios de inclusão para GDA	17
3.3.1.2 Critérios de exclusão para GDA	18
3.3.2 Grupo de cães saudáveis (GS)	18
3.3.2.1 Critérios de inclusão para GS.....	18
3.3.2.2 Critérios de exclusão para GS.....	18
3.4 TESTE INTRADÉRMICO	19
3.4.1 Seleção dos extratos	19
3.4.2 Protocolo do teste intradérmico	19
3.5 TÉCNICA DE IMMUNOBLOTTING.....	21
3.5.1 Obtenção e acondicionamento da amostra de sangue	21
3.5.2 Separação das proteínas.....	22
3.5.3 Immunolotting	23
3.6 TABULAÇÃO DOS DADOS	24
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4 RESULTADOS.....	25
4.1 PERDA AMOSTRAL	26
4.2 EPIDEMIOLOGIA	26
4.3 TESTE INTRADÉRMICO	27
4.4 IDENTIFICAÇÃO DE REAÇÃO AOS ALÉRGENOS DE ÁCAROS.....	29
4.4.1 Reação aos alérgenos do ácaro <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	30
4.4.2 Reação aos alérgenos do ácaro <i>Dermatophagoides farinae</i>	31
4.4.3 Reação aos alérgenos do ácaro <i>Blomia tropicalis</i>	32
4.4.4 Comparação da reação aos alérgenos entre os grupos GPA e GS	33
5 DISCUSSÃO.....	34

6 CONCLUSÕES.....	38
CAPÍTULO 3	39
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
APÊNDICES	50
APÊNDICE A	51
APÊNDICE B	52
ANEXOS	55
ANEXO A	56

“O sábio nunca diz tudo o que pensa, mas pensa sempre tudo o que diz”

“O ignorante afirma, o sábio duvida, o sensato reflete”

Aristóteles

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado a oportunidade de fazer dessa vida uma jornada de benfeitorias, de estudos e por me dar uma linda família que me apoiou em todos os momentos de alegrias e desafios percorridos até aqui.

Obrigada mãe, por estar ao lado em todos os momentos, por sempre acreditar em meu potencial e ter me proporcionado o melhor estudo que eu pude ter. Ao meu pai, que mesmo não estando presente, sempre estará ao meu lado, me guiando em todos os meus passos!

Agradeço ao meu marido, Gustavo, por todo companheirismo nesses últimos 10 anos, que me acompanhou desde minha jornada no ensino médio até agora no mestrado! Sem sua força eu não seria tão forte para aguentar todo esse percurso.

Às minhas irmãs: Daniele e Gabriela, aos meus sogros, Bento e Sandra, que são como pais para mim, aos meus cunhados e meus primos, que me ajudaram em todos os dias que percorri até aqui.

Aos amigos e colegas médicos veterinários: Helen Raksa, Dévaki L. Assunção, Grazielle Vandresen, Jorge Bárcena, Greicy Duarte, Tielli Magnus, que contribuíram de muitas formas para a realização deste projeto, em especial à minha amiga e companheira de mestrado, Marcia Lima, por toda sua ajuda na realização do experimento e principalmente pelo apoio em todos os momentos de obstáculos que passamos durante esses dois anos.

Aos meus queridos animais, Kevin, Laila, Alex, Alice (in memoriam), fonte de inspiração para todos os dias de estudo.

Ao meu co-orientador, Victor do Espírito Santo Cunha, por sua amizade, paciência, disponibilidade em responder tantos emails e mensagens e pela orientação tão competente, sem a qual esse projeto não teria sido possível.

Aos meus orientados de PIBIC, Thaynara Bortolucci e Fábio Nogueira, pela colaboração na realização do experimento.

À Caroline Nocera, pelo carinho e apoio durante todo o curso.

À empresa FDA Allergenic (Laboratório de Antígenos, Rio de Janeiro, Brasil), pelo apoio, fornecimento dos extratos alergênicos e pela permissão do uso das suas instalações para realização do teste piloto.

À Betty e ao Kees, pelo acolhimento e hospitalidade em sua casa e em sua empresa, à empresa Citeq Biologics (Groningen, Holanda), e à Silvia, técnica do laboratório, que foram imprescindíveis para a realização do *Western blotting*, realizado neste experimento.

E principalmente, ao meu orientador, Marconi Rodrigues de Farias, que antes mesmo de orientador de mestrado, foi um grande mestre que muito me ensinou como profissional e como pessoa. Muito obrigada!

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos, a metodologia aplicada nos mesmos foi de acordo com as normas de Vancouver Modificada.

O capítulo 1 trata-se de revisão de literatura, abordando alérgenos de ácaros da poeira domiciliar.

O capítulo 2 intitula-se Identificação Sorológica de Alérgenos de Ácaros Domiciliares Associados à Sensibilização de Cães com Dermatite Atópica.

O Capítulo 3 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros

As referências de todos os capítulos encontram-se em lista única ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

Alérgenos de ácaros domiciliares são uma causa comum de sensibilização e de precipitação de eczema em cães com dermatite atópica (DA). As principais espécies de ácaros da poeira domiciliar em Curitiba, Paraná são *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) *Dermatophagoides farinae* (Df) e *Blomia tropicalis* (Bt), e a identificação dos seus alérgenos é fundamental para padronização de testes intradérmicos (ID) e resposta a protocolos de imunoterapia. O objetivo desse estudo foi identificar IgE específica aos principais alérgenos dos ácaros domiciliares (Dp, Df e Bt), no soro de cães com dermatite atópica *strictu sensu*. Foram selecionados 33 cães, sendo 22 com dermatite atópica *strictu sensu* (GDA), os quais obedeciam pelo menos seis dos oito critérios de Favrot (2010), não apresentaram melhora dos sinais clínicos após exclusão de outras dermatopatias pruriginosas e após dieta com proteína original por pelo menos oito semanas. Todos esses cães foram positivos no teste ID para ao menos um dos ácaros domiciliares. Outros 11 cães saudáveis pertenciam ao grupo controle (GS) e não apresentavam nenhum sinal de doença dermatológica, além de serem negativos no teste ID. Coletou-se sangue dos 33 cães e o soro foi separado e mantido refrigerado a -20°C até a análise. Realizou-se SDS-PAGE a partir de um gel de poliacrilamida a 15%, seguido de *Immunoblotting*, utilizando anti-IgE canino monoclonal. Todos os dados foram analisados pelo Teste Exato de Fischer, considerando significativo $p < 0,05$. Entre os 22 cães com DA, 63,3% (14) reagiram a Dp, 59% (13) a Bt e 45,5% (10) a Df. Observou-se que os cães do GDA que eram sensíveis a Dp e Df, reagiram de forma significativa ($p < 0,05$) a alérgenos com peso molecular entre 21,5 e 30,9 kDa, quando comparado aos outros intervalos de peso molecular. Enquanto que cães do GDA sensíveis a Bt, tiveram reação significativa a bandas nos intervalos 21,5 – 30,9 kDa, 66,2 – 97,4 kDa e acima de 97,4 kDa. Quando comparamos os intervalos entre os grupos GDA e GS, foi observada diferença estatística ($p < 0,05$), somente para o ácaro Df no intervalo de 14,4 a 21,4 kDa. O presente trabalho permitiu sugerir que os ácaros Dp e Bt são responsáveis pela precipitação de eczema atópico nos cães, e que alérgenos de baixo peso molecular são importantes causadores de sensibilização em cães. Cães com DA e saudáveis expõem-se no ambiente domiciliar de forma similar a alérgenos de ácaro, entretanto eczema atópico é observado somente nos cães alérgicos.

Palavras-chaves: *Blomia tropicalis*. *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Dermatophagoides farinae*. Alérgenos. *Western blotting*

GENERAL ABSTRACT

Allergens from house dust mite are a common cause of sensitization and eczema precipitation in dogs with atopic dermatitis (AD). The main house dust mites in Curitiba, Paraná are *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), *Dermatophagoides farinae* (Df) and *Blomia tropicalis* (Bt). The identification of their allergens is essential for standardization of intradermal testing (IDT) and response to immunotherapy protocols. The aim of this study was to identify specific IgE to major allergens of house dust mites in the serum of dogs with atopic dermatitis *sensu stricto*. Thirty three dogs were selected, 22 with atopic dermatitis *sensu strictu* (GDA) which fulfilled six of eight clinical features of canine AD, as described by Favrot et al (2010), showed no improvement in clinical signs after exclusion of other pruritic skin diseases and after at least eight weeks of exclusion diet with original protein. All these dogs were positive in IDT to at least one of the house dust mites. Other 11 animals belonged to the control group (GS) and did not have any signs of skin disease, besides being negative in IDT. Blood was collected from all 33 dogs, and serum was separated and kept refrigerated at -20° C until analysis. It was performed SDS-PAGE in a 15% polyacrylamide gel, followed by Immunoblotting, using monoclonal anti-IgE. All data were analyzed by Fisher's Exact Test, considering significant $p < 0,05$. Among the 22 dogs with AD, 63.3% (14) of the dogs reacted to Dp, 59% (13) reacted to Bt and 45.5% (10) to Df. It was observed that GDA dogs were sensitive to Dp and Df, reacted significantly ($p < 0.05$) to allergens with molecular weight between 21.5 and 30.9 kDa, when compared to other molecular weight ranges. While GDA dogs susceptible to Bt had significant reaction to bands that ranged from 21.5 to 30.9 kDa, from 66.2 to 97.4 kDa and up to 97.4 kDa. When we compared intervals between GDA and GS groups, a statistical difference was observed ($p < 0.05$) only for Df, in the range 14.4 to 21.4 kDa. This study suggests that DP and Bt mites are responsible for precipitation of atopic eczema in dogs, and that low molecular weight are important allergens causing sensitization in dogs. Dogs with AD and healthy are similarly exposed to mite allergens at home environment, but atopic eczema is observed only in allergic dogs.

Keywords: *Blomia tropicalis*. *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Dermatophagoides farinae*. Allergens. Western blotting

LISTA DE ABREVIATURAS

AD	<i>Atopic dermatitis</i>
APA	Ácaros de produtos armazenados
APD	Ácaro da poeira domiciliar
<i>B. tropicalis</i>	<i>Blomia tropicalis</i>
Bt	<i>Blomia tropicalis</i>
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
<i>Cut off</i>	Ponto de corte
<i>D. farinae</i>	<i>Dermatophagoides farinae</i>
<i>D. pteronyssinus</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
DA	Dermatite atópica
DC	Células dendríticas
Df	<i>Dermatophagoides farinae</i>
<i>Dp</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
GDA	Grupo de cães com dermatite atópica
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos
GS	Grupo de cães saudáveis
I.U.I.S	União Internacional das Sociedades Imunológicas
ID	Intradérmico
IDT	<i>Intradermal testing</i>
IgE	Imunoglobulina-E
IgG	Imunoglobulina-G
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon-gama
kDa	Quilodalton
mA	Miliampere
mg	Miligrama

min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Minimolar
PBS	Fosfato salina tamponada (<i>phosphate buffered saline</i>)
PG	Prostaglandina
PR	Paraná
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
RJ	Rio de Janeiro
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes
Th0	Linfócito T auxiliar (helper) precursor
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TNF α	Fator de necrose tumoral alpha
U	Unidade
UBE	Unidade Biológica Equivalente
V	Volts
W.H.O.	Organização Mundial de Saúde
μ g	Micrograma
μ L	Microlitro
μ m	Micrômetro
° C	Grau Celsius

LISTA DE QUADROS E TABELAS

	Página
CAPÍTULO 1	
Quadro 1. Critérios de Favrot (2010) para o diagnóstico da DA em cães.....	2
Tabela 1. Principais alérgenos de ácaros identificados para a espécie humana e depositados no banco de dados da União Internacional das Sociedades Imunológicas (I.U.I.S).....	6
CAPÍTULO 2	
Tabela 2. Codificação dos intervalos de pesos moleculares.....	25
Tabela 3. Resultado dos testes intradérmicos realizado para os ácaros DP (<i>D. pteronyssinus</i>), DF (<i>D. farinae</i>) e BT (<i>B. tropicalis</i>) para cada animal do GDA.....	27
Tabela 4. Proporção de cães que reagiram para o ácaro Dp	30
Tabela 5. Resultados dos p-valores para o ácaro Dp, GDA e GS	30
Tabela 6. Proporção de cães que reagiram para o ácaro Df	31
Tabela 7. Resultados dos p-valores para o ácaro Df, GDA e GS	31
Tabela 8. Proporção de cães que reagiram para o ácaro Bt.....	32
Tabela 9. Resultados dos p-valores para o ácaro Bt, GDA e GS	32
Tabela 10. Resultado dos p-valores para o teste de comparação entre os grupos GDa e GS em cada intervalo e para cada ácaro.	33

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Resposta imunológica na fase aguda da dermatite atópica.....	11
Figura 2. Resposta imunológica na fase crônica da dermatite atópica.....	12
Figura 3. Demonstração da realização do teste ID.	21
Figura 4. Eletroforese em um Sistema Mini-Protean II, Bio-Rad de extratos alergênicos de ácaros, numa corrente elétrica de 20 mA.....	23
Figura 5. <i>Immunoblotting</i>	24
Figura 6. Distribuição entre as raças de cães com dermatite atópica e cães saudáveis selecionados para o estudo.....	27
Figura 7. Resultado dos testes ID nos cães atópicos selecionados para o projeto.	29
Figura 8. Teste intradérmico realizado em cão do GDA, apresentado resultado positivo aos três ácaros testados	29

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) é uma doença muito comum, afetando 10% da população mundial canina (Hillier e Griffin 2001). Ela é definida como uma doença de pele inflamatória, geneticamente predisposta, pruriginosa, crônica, com sinais clínicos característicos e associados à imunoglobulina-E (IgE), mais comumente direcionadas contra alérgenos ambientais (Halliwell, 2006). Porém, devido à DA ser uma doença multifatorial, que envolve defeitos de barreira cutânea, desregulação imunológica e colonização microbiana, a sensibilização alérgica e a formação de IgE alérgeno-específica não são pré-requisitos para o seu desenvolvimento (Nuttall *et al.*, 2013).

Muitos estudos já foram realizados tentando determinar uma predisposição racial para a DA. Porém, há diferenças de raças nas várias áreas geográficas (Bizikova *et al.*, 2015). Zur *et al.* (2002), avaliaram nos Estados Unidos que as raças Labrador, Golden Retriever, West Highland White Terrier, Springer Spaniel inglês, Shar-pei chinês, Bull terrier, Bichon-frisé e Tibetan Terrier, são mais acometidos com DA, que animais mestiços. Estudo, na Suíça, observou também que os cães das raças: Boxer, Bulldog francês, Basset Hound e Vizsla são predispostos (Picco *et al.*, 2008)

A maioria dos cães com DA manifestam sinais clínicos entre seis meses e três anos de idade, independente do gênero sexual. Estes geralmente são perenes e sofrem exacerbações sazonais, dependendo dos alérgenos envolvidos (Favrot *et al.*, 2010)

Cães com DA têm histórico de prurido crônico, alésional, intenso a grave, acompanhado ou não de infecções de pele de origem bacteriana e/ou fúngica, bléfarconjuntivite e otite bilateral crônica, intermitente ou persistente. As lesões primárias associadas à DA consistem de pápulas e máculas eritematosas; e escoriações e alopecia podem ser observadas secundariamente ao prurido. Em casos crônicos, hiperqueratose, descamação e liquenificação podem ocorrer (Olivry *et al.*, 2010).

A distribuição das lesões varia de acordo com a cronicidade da doença e dos alérgenos precipitantes, mas normalmente os locais mais envolvidos são: face, porção

côncava dos pavilhões auriculares e condutos auditivos, superfície cervical ventral, inguinal, axilas, abdome, períneo, regiões flexurais e extremidade distal dos membros, principalmente os torácicos (Olivry *et al.*, 2010).

O diagnóstico da DA em cães é baseado no histórico e nos sinais clínicos, de acordo com os critérios estabelecidos por Favrot *et al.* (2010), com a subsequente exclusão de outras dermatopatias pruriginosas, como descrito no quadro abaixo:

Quadro 1: Critérios de Favrot (2010) para o diagnóstico da DA em cães

- 1- *prurido inicia antes de três anos de idade*
- 2- *prurido melhora com predniso(lo)na (0,5-1mg/kg sid)*
- 3- *cão domiciliado*
- 4- *prurido não lesional*
- 5- *prurido em membros torácicos*
- 6- *prurido em condutos auditivos*
- 7- *margens dos pavilhões auriculares não afetadas*
- 8- *região dorsolombar não afetada.*

A combinação de 5/8 critérios tem uma sensibilidade de 85% e especificidade de 79%. Adicionando um critério, ou seja, 6/8, a especificidade aumenta para 89%, e a sensibilidade decresce para 58%.

Fonte: adaptado de Favrot *et al.*, 2010.

Olivry *et al.* (2010), subdividiram a DA em cães em quatro grupos: “dermatite atópica *lato sensu*”, definida como uma doença de pele inflamatória, geneticamente predisposta, pruriginosa, crônica, com sinais clínicos característicos e associados à imunoglobulina-E (IgE); “dermatite atópica *stricto sensu*” que está relacionada especificamente à sensibilização a alérgenos ambientais; “dermatite atópica *simil*” caracterizada por cães com DA que não demonstram IgE alérgeno-específicas, e “dermatite atópica induzida por alimentos” relacionada ao eczema atópico que é precipitado e involui significativamente após a exclusão dietética.

Existe um consenso de que testes que detectam IgE alérgeno-específicas, como o sorológico ou ID, não podem ser usados como diagnóstico inicial da DA em cães (Lian e Halliwell 1998; DeBoer e Hillier, 2001; Hill e DeBoer, 2001), pois muitos cães saudáveis e cães com DA apresentam uma reação positiva para ambos os testes, o que leva a diagnósticos equivocados (Olivry *et al.*, 2010).

Entretanto, os testes sorológico e ID podem ser usados para implementação de medidas de controle ambiental, e para selecionar os alérgenos que serão incluídos em protocolos imunoterápicos (Cunha *et al.*, 2012b).

Vários fatos têm evidenciado que a sensibilização a alérgenos de ácaros desempenham um importante papel na patogênese da DA em cães (Nuttall *et al.*, 2013), como a reatividade nos testes ID (Hill e DeBoer, 2001; Zur *et al.*, 2002; Cunha *et al.*, 2007), sorológico IgE alérgeno-específico (Mccall *et al.*, 2002; Hou *et al.*, 2006); e a resposta à imunoterapia alérgeno-específica (Hilliery Griffin, 2001; Loewestein e Muller, 2009).

Sabe-se que muitos componentes dos ácaros podem induzir uma resposta inflamatória nos tecidos, e isto pode ser capaz de conduzir à sensibilização em indivíduos predispostos (Bizikova *et al.*, 2015). Porém, no Brasil há poucos estudos correlacionando os ácaros e os seus alérgenos que precipitem a DA em cães.

Esta revisão tem como objetivo mostrar a importância relativa dos alérgenos de ácaros da poeira domiciliar como fatores extrínsecos na patogênese da DA em cães.

2 TAXONOMIA E ECOLOGIA DOS ÁCAROS

Os ácaros são artrópodes pertencentes ao subfilo Chelicerata, classe Arachnida, ordem Acari, subordem Astigmata, e fazem parte de um grupo muito diversificado de organismos que exploram vários tipos de microambientes (Arlian e Platts-Mills, 2001).

Sua alimentação é encontrada na poeira domiciliar, e consiste principalmente de descamações da pele humana, que tornam-se colonizadas por fungos, bactérias e leveduras (Cunha *et al.*, 2012b).

O termo “ácaros domiciliares” foi sugerido no Terceiro Workshop Internacional sobre alérgenos e asma (Platts-Mills *et al.*, 1997) para representar os ácaros da poeira doméstica (APD) e os de produtos armazenados (APA) encontrados nos domicílios. Dentre estes, estão os ácaros da poeira doméstica (família Pyroglyphidae), os ácaros de estoque (famílias Acaridae, Glycyphagidae e Chortoglyphidae), e os ácaros predadores (família Cheyletidae) (Cunha *et al.*, 2012b).

Os gêneros *Tyrophagus* e *Acarus* pertencem à família Acaridae, enquanto os gêneros *Lepidoglyphus*, *Blomia* e *Austroglycyphagus* fazem parte da família Glycyphagidae (Nuttall *et al.*, 2006).

Os ácaros da família Pyroglyphidae são considerados os mais prevalentes no ambiente domiciliar, possuem em geral 0,3mm e vivem em roupas de cama, travesseiros, colchões, carpetes, tapetes e outros materiais têxteis do domicílio (Zavadniak, 2000; Arlian e Platts-Mills, 2001). Esta família está dividida nas subfamílias Pyroglyphinae (com os gêneros *Gymnoglyphus*, *Euroglyphus* e *Hughesiella*) e Dermatophagoidae, que inclui os gêneros *Malayoglyphus*, *Sturnophagoides*, *Hirstia* e *Dermatophagoides* (Nuttall *et al.*, 2006).

Os ácaros do gênero *Dermatophagoides spp.* medem aproximadamente 300 µm, vivem no material têxtil do domicílio, como colchões, almofadas, travesseiros, sofás e camas. O microclima ideal para a maioria destes ácaros é temperatura entre 20 - 30°C, e umidade de 80 - 90% (Nuttall *et al.* 2006). *D. pteronyssinus* é vulnerável a flutuações de umidade (Arlian e Morgan, 2003), sendo predominante em países de clima temperado e tropical (Colloff, 1987), enquanto *D. farinae* é mais frequente em ambientes secos (Noli, *et al.*, 1996) com temperaturas de 25–30°C, e umidade relativa do ar de 50 – 60% (Hart, 1998).

Os ácaros de produtos armazenados desenvolvem-se em ambientes úmidos, com umidade relativa ideal em torno de 80% e temperatura entre 25 e 30° C, e são encontrados em meio rural, mas também podem ser encontrados na poeira domiciliar, quando as condições ambientais são adequadas (Tee, 1994).

O Brasil possui condições ambientais favoráveis ao desenvolvimento dos ácaros

da poeira domiciliar, com umidade relativa e temperatura média anual em torno de 70% e 27° C, respectivamente (Cunha *et al.*, 2012b).

Os gêneros mais comumente encontrados no país são pertencentes às famílias Pyroglyphidae, Glycyphagidae, Cheyletidae, e Acaridae, e as principais espécies são o *D. pteronyssinus* e *D. farinae* (Binotti *et al.*, 2001).

O *D. pteronyssinus* é encontrado em todo território nacional e sua prevalência de 3,7 a 89,3% dos ácaros encontrados nos diversos Estados (Baggio *et al.*, 1992). Já o *D. farinae* apresenta prevalência de 0,05 a 39,2%, sendo encontrado em quase todo o território nacional (Baggio e Ambrosio, 1992).

A família Glycyphagidae é a segunda mais descrita no Brasil, sendo representada principalmente pelas espécies *B. tropicalis* e *Glycyphagus domesticus*, com prevalência entre 3,8 a 79,5% (Chagas *et al.*, 2000) nos diversos Estados.

3 PRINCIPAIS ALÉRGENOS DE ÁCAROS DA POEIRA DOMICILIAR

Alérgenos de ácaros da poeira doméstica (APD) são causa comum de sensibilização e desenvolvimento de doença alérgica respiratória, oftálmica e tegumentar, tanto nos seres humanos como nos cães (Jackson *et al.*, 2005). Alérgenos principais ou 'major' são definidos, por convenção, como aqueles reconhecidos por mais que 50% dos soros de pacientes atópicos, e alérgenos secundários ou 'minor' são aqueles reconhecidos por menos que 50% dos pacientes (Thomas *et al.*, 1998).

Através de reações positivas por teste ID, níveis séricos aumentados de IgE ou IgGd alérgeno-específicas, ou demonstração de IgE específicas para proteínas antigênicas por eletroforese com gel de poliacrilamida e immunoblotting (Cunha *et al.*, 2012b), foi demonstrado que os alérgenos de *D. farinae* e *D. pteronyssinus* (família Pyroglyphidae) respondem por 30 a 100% da sensibilização de cães com DA (Hill e DeBoer, 2001; Randall *et al.*, 2003).

Embora a função biológica dos alérgenos de ácaros não esteja totalmente elucidada, podemos classificar estas proteínas alergênicas em quatro famílias

principais: proteases, proteínas com afinidade lipídica, enzimas não proteolíticas e componentes não enzimáticos (Thomas *et al.*, 2002).

Os alérgenos de ácaros são nomeados pelas três primeiras letras do gênero, a primeira letra das espécies, e um número que representa a ordem na qual eles foram purificados ou classificados (Chapman *et al.*, 2007). A Tabela 1 contém a lista dos principais alérgenos de *D. fariane*, *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* já identificados para seres humanos até o momento (Colloff, 2009) e depositados no banco de dados do subcomitê para nomenclatura de alérgenos (www.allergen.org), o qual encontra-se sob o auspício da União Internacional das Sociedades Imunológicas (I.U.I.S.) e da Organização Mundial de Saúde (W.H.O.).

Tabela 1. Principais alérgenos de ácaros identificados para a espécie humana e depositados no banco de dados da União internacional das Sociedades Imunológicas (I.U.I.S).

Ácaros	Nome	Peso molecular (kda)	Identidade
<i>Blomia tropicalis</i>	Blo t 1	25	Protease cisteína
	Blo t 2	14	Proteína ligante de lipídio
	Blo t 3	24	Tripsina
	Blo t 4	56	Alfa-amilase
	Blo t 5	14	Proteína estrutural
	Blo t 6	25	Quimotripsina
	Blo t 8	27	Glutaciona S-transferase
	Blo t 9	24	Colagenase
	Blo t 10	33	Tropomiosina
	Blo t 11	110	Paramiosina
	Blo t 12	14	Proteína ligante de quitina
	Blo t 13	14,8	Proteína ligante de ácido-graxo
	Blo t 14	40	Vitelogenina
	Blo t 18	49	Quitinase

	Blo t 19	7	Peptídeo antimicrobiano
	Blo t 21	13	Proteína estrutural
<i>Dermatophagoides sp</i>	Der p 1	24	Protease-cisteína
	Der f 1	27	Peptidase-cisteína
	Der p 2	15	Família NPC2
	Der f 2	15	Proteína ligante de lipídio
	Der p 3	31	Tripsina
	Der f 3	29	Tripsina
	Der p 4	60	Alfa-amilase
	Der p 5	14	Função desconhecida
	Der p 6	25	Quimotripsina
	Der f 6	25	Quimotripsina
	Der p 7	26, 30 e 31	Função desconhecida
	Der f 7	30 – 31	Função desconhecida
	Der p 8	27	Glutaciona S-transferase
	Der f 8	32	Glutaciona S-transferase
	Der p9	29	Colagenase
	Der p 10	36	Tropomiosina
	Der f 10	37	Tropomiosina
	Der p 11	103	Paramiosina
	Der f 11	98	Paramiosina
	Der f 13	15	Proteína ligante de ácido-graxo
	Der p 14	177	Apolipoforina
	Der p 15		Quitinase
	Der f 15	98 / 109	Quitinase
	Der f 16	53	Gelsolina
	Der f 17	53	Proteína ligante de cálcio
	Der p 18		Quitinase

Der f 18	60	Quitinase
Der p 20		Arginina-quinase
Der f 20	40	Arginina-quinase
Der f 21		
Der p 21		
Der f 22		
Der p 23	14	Proteína peritrofina
Der f 24	13	Ubiquinol - citocromo c redutase homólogo da proteína de ligação
Der f 25	34	Triosefosfato isomerase
Der f 26	18	Miosina de cadeia leve alcalino
Der f 27	48	Serpina
Der f 28	70	Proteína de choque térmico
Der f 29	16	Ciclofilina
Der f 30	16	Ferritina
Der f 31	15	Cofilina
Der f 32	35	Pirofosfatase inorgânica secretado
Der f 33	52	Alpha-tubulina

Fonte: adaptado de Allergen Nomenclature

4 ALÉRGENOS DE ÁCAROS COMO FATORES EXTRÍNSECOS

Em cães com DA, a via epicutânea é a principal via de penetração dos alérgenos na pele (Farias, 2007; Marsella *et al.*, 2009; Miller *et al.*, 2013).

O estrato córneo é responsável pela função de barreira cutânea, e para isso, é fundamental que ele esteja íntegro (Elias, 2008). Tal integridade é mantida por desmossomas modificados, queratinócitos terminalmente diferenciadas e lipídeos intercelulares (Nemes e Steinert, 1999). Os lipídeos são tipicamente compostos por colesterol, ceramidas, ácidos graxos e ésteres de colesterol, e ajudam a evitar a perda

de água interna e limitar a penetração de material exógeno (por exemplo, alérgenos) (Proksch *et al.*, 2008).

Disfunção da barreira cutânea tem sido extensivamente estudada em seres humanos com DA (Proksch *et al.*, 2006). Também suspeita-se que este defeito na permeabilidade permite uma penetração aumentada de alérgenos ambientais, aumentando assim o risco de sensibilização em indivíduos geneticamente predispostos (Cork *et al.*, 2006; Hudson, 2006).

Vários estudos já foram publicados para caracterizar o infiltrado de células inflamatórias, associado em cães com DA (Marsella *et al.*, 2009), e identificaram-se células com morfologia dendrítica na epiderme e na derme dos cães, sendo que elas estão em maior quantidade na pele dos cães com DA quando comparado com cães saudáveis (Olivry *et al.*, 1996;1997).

É bem conhecido que as células dendríticas (DC) desempenham um papel essencial na ativação de células T-*helper* 2 (Th2) e na inflamação alérgica, e que geralmente estão presentes nos tecidos expostos ao ambiente, como a pele e os epitélios das vias aéreas e gastrintestinal, e são responsáveis por detectar antígenos a partir de sua entrada nestes tecidos (Jacquet, 2013).

Uma vez em contato, as DC absorvem os alérgenos dos ácaros, fato que pode ser facilitado pela interação dos alérgenos com os anticorpos IgE específicos, e pela elevada afinidade dos receptores de IgE presentes na superfície destas (Jacquet, 2013).

As DC migram para os glânglios linfáticos, processam as proteínas em pequenos peptídeos, os quais são conjugados junto a moléculas de histocompatibilidade do tipo 2 e apresentadas aos linfócitos T *naive*, que diferenciam-se em células Th2 (Jacquet, 2013).

As respostas das DC durante a fase de sensibilização são influenciadas por múltiplos fatores, como a presença de fatores microbianos (como os lipopolissacarídeos) e citocinas inflamatórias produzidas por queratinócitos e outras células inflamatórias (Pucheu-Haston *et al.*, 2015).

As DC ativadas na presença de TNF α , IL-2, IL-4, IL-12p40, IL-13, interferon- γ , fator de crescimento β e CCL8 resultam na diferenciação de células T *naive* em células Th2 (Wang *et al.*, 2007), as quais vão estimular a proliferação de linfócitos B, a formação de plasmócitos e a produção de IgE alérgeno-específica (Alberts *et al.*, 2004).

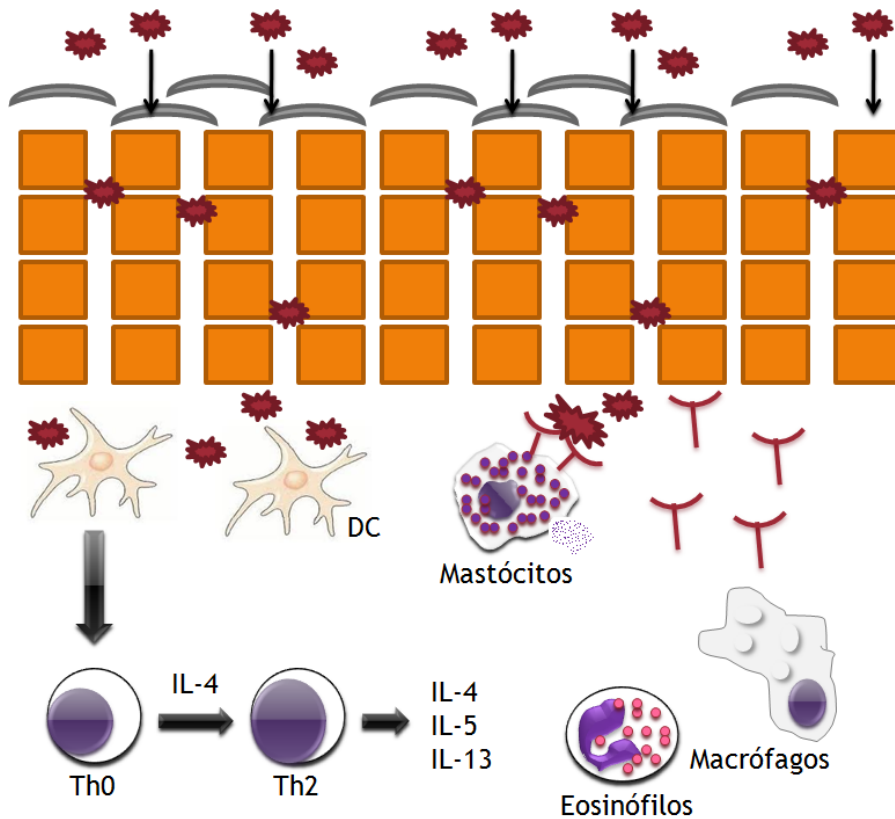
A IgE liga-se aos mastócitos teciduais, resultando em sua desgranulação e consequente liberação de mediadores inflamatórios (Marsella, 2006; Farias, 2007). Porém, a desgranulação mastocitária também pode ocorrer de forma não IgE-dependente (Pucheu-Haston *et al.*, 2008) (Figura 1).

Nos mastócitos dos cães já foi detectada presença de histamina, TNF α , eicosanoides (como as prostaglandinas (PG) D₂, PGE₂ e leucotrienos B₄ e C₄), proteases (quimase e triptase), IL-3, IL-4, IL-6, IL-13, fator estimulante de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), CCL5, CCL3 e CCL2 (Pucheu-Haston *et al.*, 2015).

A combinação dos mediadores inflamatórios pré-formados e derivados do ácido araquidônico resulta no desenvolvimento de sinais de inflamação, como eritema, edema e prurido (Marsella, 2006; Farias, 2007).

O número de mastócitos encontrados na pele pode variar de acordo com a localização corporal, sendo mais encontrados nos ouvidos e pavilhões auriculares, regiões: interdigital ventral, perineal, genital, e na cabeça e face - todas áreas normalmente afetadas em cães com DA (Pucheu-Haston *et al.*, 2015).

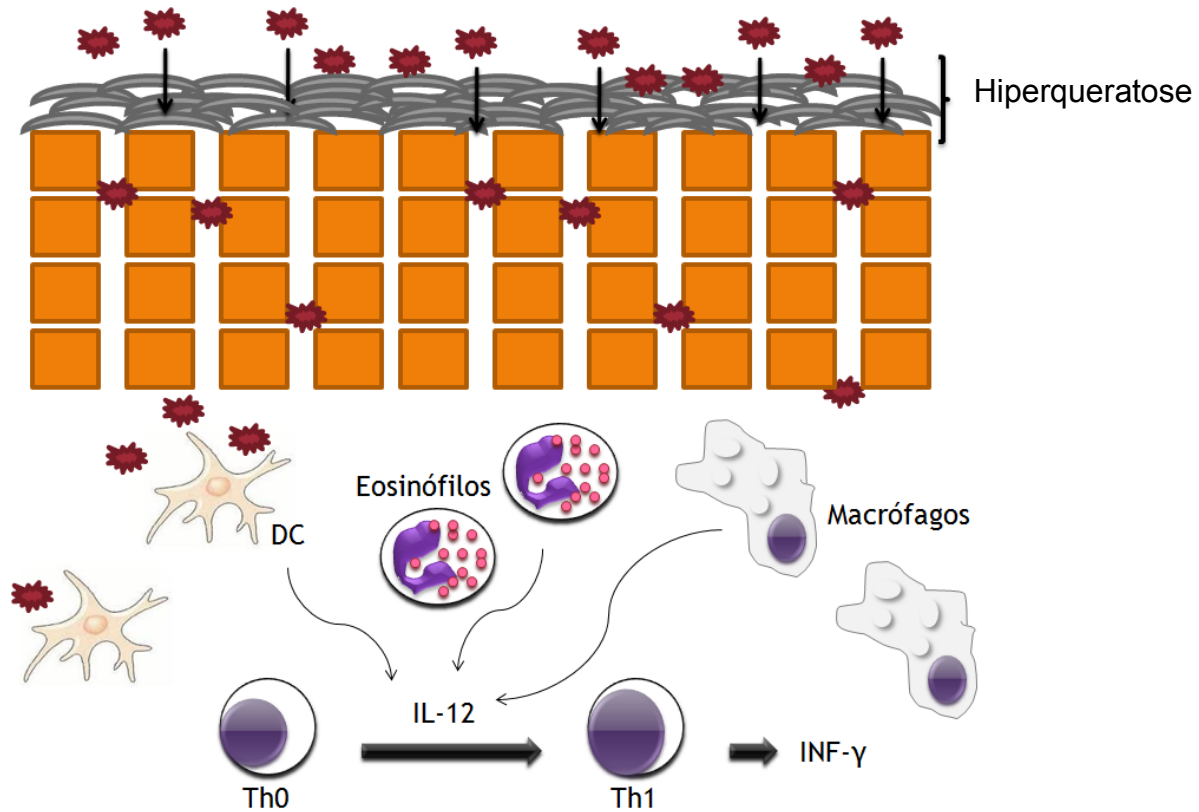
Figura 1: Resposta imunológica na fase aguda da DA. O alérgeno do ácaro quando penetra na pele encontra as células dendríticas (DC) na derme. As DC fagocitam o alérgeno e no linfonodo regional apresentam fragmentos compostos de peptídeos para o linfócito Th0, que devido ao estímulo pela IL-4, transforma-se em Th2. Os linfócitos Th2 liberam citocinas: IL-4, IL-5 e IL-13. A IL-4 é essencial para a produção de IgE, a IL-5 conduz à diferenciação e à sobrevivência de eosinófilos, e a IL-13 promove a remodelação de tecidos.



Fonte: Elaborado pela autora

O grande infiltrado de eosinófilos, DC e macrófagos na DA crônica leva a um aumento na expressão de IL-12 e isso muda a resposta imunológica para Th1, com aumento da expressão de IFN- γ (Leung 2000; 2010) (Figura 2). A presença de IFN- γ produzido pelas células T está correlacionada com a cronicidade e a severidade da DA em humanos (Homey et. al., 2006).

Figura 2: Resposta imunológica na fase crônica da dermatite atópica. Com o infiltrado de eosinófilos, células dendríticas (DC) e macrófagos, ocorre produção de IL-12, que estimula os linfócitos Th0 a converterem-se em Th1, que liberam INF- γ .



Fonte: Elaborado pela autora

CAPÍTULO 2

IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE ALÉRGENOS DE ÁCAROS DOMICILIARES ASSOCIADOS À SENSIBILIZAÇÃO EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA

(*Serological identification of allergens of domestic mites in sensitized dogs with atopic dermatitis*)

RESUMO

Alérgenos de ácaros domiciliares são uma causa comum de sensibilização e de precipitação de eczema em cães com dermatite atópica (DA). As principais espécies de ácaros da poeira domiciliar em Curitiba, Paraná são *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) *Dermatophagoides farinae* (Df) e *Blomia tropicalis* (Bt), e a identificação dos seus alérgenos é fundamental para padronização de testes intradérmicos (ID) e resposta a protocolos de imunoterapia. O objetivo desse estudo foi identificar IgE específica aos principais alérgenos dos ácaros domiciliares (Dp, Df e Bt), no soro de cães com dermatite atópica *strictu sensu*. Foram selecionados 33 cães, sendo 22 com dermatite atópica *strictu sensu* (GDA), os quais obedeciam pelo menos seis dos oito critérios de Favrot (2010), não apresentaram melhora dos sinais clínicos após exclusão de outras dermatopatias pruriginosas e após dieta com proteína original por pelo menos oito semanas. Todos esses cães foram positivos no teste ID para ao menos um dos ácaros domiciliares. Outros 11 cães saudáveis pertenciam ao grupo controle (GS) e não apresentavam nenhum sinal de doença dermatológica, além de serem negativos no teste ID. Coletou-se sangue dos 33 cães e o soro foi separado e mantido refrigerado a -20°C até a análise. Realizou-se SDS-PAGE a partir de um gel de poliacrilamida a 15%, seguido de *Immunoblotting*, utilizando anti-IgE canino monoclonal. Todos os dados foram analisados pelo Teste Exato de Fischer, considerando significativo $p < 0,05$. Entre os 22 cães com DA, 63,3% (14) reagiram a Dp, 59% (13) a Bt e 45,5% (10) a Df. Observou-se que os cães do GDA que eram sensíveis a Dp e Df, reagiram de forma significativa ($p < 0,05$) a alérgenos com peso molecular entre 21,5 e 30,9 kDa, quando comparado aos outros intervalos de peso molecular. Enquanto que cães do GDA sensíveis a Bt, tiveram reação significativa a bandas nos intervalos 21,5 – 30,9 kDa, 66,2 – 97,4 kDa e acima de 97,4 kDa. Quando comparamos os intervalos entre os grupos GDA e GS, foi observada diferença estatística ($p < 0,05$), somente para o ácaro Df no intervalo de 14,4 a 21,4 kDa. O presente trabalho permitiu sugerir que os ácaros Dp e Bt são responsáveis pela precipitação de eczema atópico nos cães, e que alérgenos de baixo peso molecular são importantes causadores de sensibilização em cães. Cães com DA e saudáveis expõem-se no ambiente domiciliar de forma similar a alérgenos de ácaro, entretanto eczema atópico é observado somente nos cães alérgicos.

Palavras-chaves: *Blomia tropicalis*. *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Dermatophagoides farinae*. Alérgenos. Western blotting

ABSTRACT

Allergens from house dust mite are a common cause of sensitization and eczema precipitation in dogs with atopic dermatitis (AD). The main house dust mites in Curitiba, Paraná are *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), *Dermatophagoides farinae* (Df) and *Blomia tropicalis* (Bt). The identification of their allergens is essential for standardization of intradermal testing (IDT) and response to immunotherapy protocols. The aim of this study was to identify specific IgE to major allergens of house dust mites in the serum of dogs with atopic dermatitis *sensu stricto*. Thirty three dogs were selected, 22 with atopic dermatitis *sensu stricto* (GDA) which fulfilled six of eight clinical features of canine AD, as described by Favrot et al (2010), showed no improvement in clinical signs after exclusion of other pruritic skin diseases and after at least eight weeks of exclusion diet with original protein. All these dogs were positive in IDT to at least one of the house dust mites. Other 11 animals belonged to the control group (GS) and did not have any signs of skin disease, besides being negative in IDT. Blood was collected from all 33 dogs, and serum was separated and kept refrigerated at -20° C until analysis. It was performed SDS-PAGE in a 15% polyacrylamide gel, followed by Immunoblotting, using monoclonal anti-IgE. All data were analyzed by Fisher's Exact Test, considering significant $p < 0,05$. Among the 22 dogs with AD, 63.3% (14) of the dogs reacted to Dp, 59% (13) reacted to Bt and 45.5% (10) to Df. It was observed that GDA dogs were sensitive to Dp and Df, reacted significantly ($p < 0.05$) to allergens with molecular weight between 21.5 and 30.9 kDa, when compared to other molecular weight ranges. While GDA dogs susceptible to Bt had significant reaction to bands that ranged from 21.5 to 30.9 kDa, from 66.2 to 97.4 kDa and up to 97.4 kDa. When we compared intervals between GDA and GS groups, a statistical difference was observed ($p < 0.05$) only for Df, in the range 14.4 to 21.4 kDa. This study suggests that DP and Bt mites are responsible for precipitation of atopic eczema in dogs, and that low molecular weight are important allergens causing sensitization in dogs. Dogs with AD and healthy are similarly exposed to mite allergens at home environment, but atopic eczema is observed only in allergic dogs.

Keywords: *Blomia tropicalis*. *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Dermatophagoides farinae*. Allergens. Western blotting

1 INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) é uma dermatopatia multifatorial, crônica, inflamatória e pruriginosa, que envolve interações genéticas complexas, disfunção de barreira da pele e hiper-reatividade imunológica (Gonzales *et al.*, 2013), caracterizada pela produção de IgE alérgeno-específica a alérgenos ambientais, alimentares e antígenos microbianos (Nuttall *et al.*, 2001; Halliwell, 2006).

Suas características clínicas incluem: prurido intenso a grave, crônico, primário e perene, associado a eritema, eritrodermia, pápulas, feotriquia por lambedura, alopecia autoinduzida, escoriações e, em casos crônicos, hiperqueratose ou liquenificação. Piodermites recorrentes (caracterizadas por pústulas, colarinhos epidêmicos, crostas melicéricas e pápulo-crostas foliculocêntricas), supercrescimento de *Malassezia sp.* e comorbidades, como conjuntivite e otite externa, podem também ser observadas (Olivry *et al.*, 2010).

Do ponto de vista topográfico, a DA apresenta prurido e lesões em um padrão bem característico, mormente na face, região côncava dos pavilhões auriculares e condutos auditivos, superfícies ventrais (regiões: cervical ventral, axilar, inguinal, abdominal, perianal, ventral da cauda), interdígitos e áreas flexurais (Olivry *et al.*, 2010).

Alérgenos dos ácaros domiciliares são causa comum de sensibilização e desenvolvimento de doença alérgica respiratória, oftálmica e tegumentar, tanto nos seres humanos como nos cães (Jackson *et al.*, 2005). Alérgenos principais ou 'major' são definidos, por convenção, como aqueles reconhecidos por mais que 50% dos soros de pacientes atópicos, e alérgenos secundários ou 'minor' são aqueles reconhecidos por menos que 50% dos pacientes (Thomas *et al.*, 1998).

Em cães acometidos por DA e com hábitos predominantemente domiciliares, os alérgenos de ácaros da poeira domiciliar (família Pyroglyphidae), principalmente os ácaros das espécies *Dermatophagoide spp.*, respondem pela sensibilização alérgica e respostas de hipersensibilidade em 30 a 100% dos casos (Randall *et al.*, 2003). Estes são ubiqüitários (Hillier, 2002), perenes, possuem peso molecular variável, natureza

epitelial ou enzimática, e são capazes de penetrar ativamente na pele (Farias, 2007; Favrot *et al.*, 2010).

Os alérgenos de ácaros das espécies *Dermatophagoide spp*, já associados à sensibilização em cães com DA, são: Der p 1 (25 kDa) e Der p 2 (14 kDa), provenientes do *D. pteronyssinus* (Dp), e Der f 1 (25 kDa), Der f 2 (14 kDa), Der f 10 (37 kDa), Der f 15 (98 kDa) e Der f 18 (60 kDa), provenientes do *D. farinae* (Df) (Noli *et al.*, 1996; Mccall *et al.*, 2001; Weber *et al.*, 2003).

Ácaros da família Glycyphagidae, particularmente a *Blomia tropicalis* (Bt), são frequentemente encontrados em regiões de clima tropical e subtropical (Binotti *et al.*, 2001). Alguns alérgenos dessa espécie são reconhecidos como importante causa de reações alérgicas em humanos, mormente Blo t 5. Em cães, Cunha *et al.* (2012a), identificaram alérgenos de peso molecular entre 52 e 76 kDa no soro de cães com DA, supondo que um desses alérgenos seja o Blo t 4, de peso molecular 56 kDa.

Como a DA canina é uma doença de alta ocorrência e que não apresenta cura, apenas controle, a identificação precisa de quais alérgenos de ácaros participam da sensibilização e prurido dos cães acometidos é um passo importante para o desenvolvimento de testes alérgicos, como o sorológico e o intradérmico (ID) mais precisos, definição de protocolos de imunoterapia mais eficientes, e melhoria na qualidade de vida dos pacientes (Cunha, *et. al*, 2012a).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar os principais alérgenos, por *immunoblotting*, de ácaros domiciliares (*D.pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*) envolvidos na sensibilização de cães com DA *strictu sensu* na região de Curitiba, Paraná.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar em cães com DA *strictu sensu*, o intervalo de peso molecular dos principais alérgenos dos ácaros domiciliares.

- b) Verificar qual é o principal ácaro responsável por sensibilização em cães com dermatite atópica através do teste intradérmico na cidade de Curitiba, Paraná.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COMITÊ DE ÉTICA

O protocolo experimental do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob o registro de número 833 (Anexo A).

3.2. TIPO DE ESTUDO

Foi desenvolvido um estudo experimental, transversal, controlado, não-pareado, com amostra de conveniência e não randomizado.

3.3. GRUPO EXPERIMENTAL

No presente estudo foram selecionados inicialmente 67 cães domiciliados em Curitiba, vacinados e vermifugados regularmente, sendo que 55 tinham diagnóstico de DA e 12 cães eram saudáveis.

Estes cães foram subdivididos em dois grupos experimentais, após seleção baseada em critérios de inclusão e exclusão.

3.3.1. Grupo de cães com dermatite atópica (GDA)

3.3.1.1 Critérios de inclusão para GDA

Foram incluídos neste grupo, cães com diagnóstico clínico de DA *strictu senso* que apresentaram:

- a. No mínimo seis dos oito critérios estabelecidos por Favrot (2010);
- b. Presença de prurido mesmo após:
 - Controle de outras dermatopatias pruriginosas, de origem infecciosa ou parasitária;

- Rotina frequente de hidratação da pele com produtos hidratantes, emolientes, umectantes e não irritantes;
- Cães que não apresentaram melhora dos sinais clínicos através do estabelecimento de dieta com proteína original, pelo prazo de oito semanas;
- c. Resultado positivo a pelo menos um dos ácaros testados (*D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. tropicalis*) no teste ID utilizado.

3.3.1.2. Critérios de exclusão para GDA

Foram excluídos do estudo os cães com DA que apresentaram:

- a. Medicação prévia com anti-histamínicos pelo prazo de duas semanas, e glicocorticoides sistêmicos ou tópicos por três semanas;
- b. Medicação prévia com glicocorticoides de longa duração (injetáveis), pelo prazo de quatro semanas;
- c. Período de estro, gestação ou lactação;
- d. Temperamento agitado ou agressivo, que impossibilitasse a contenção manual para a realização dos testes.

3.3.2. Grupo de cães saudáveis (GS)

3.3.2.1. Critérios de inclusão para GS

Foram incluídos neste grupo, cães saudáveis, domiciliados, sem histórico de prurido e de dermatopatias progressivas.

3.3.2.2. Critérios de exclusão para GS

Foram excluídos os cães saudáveis que apresentaram:

- a. Reação positiva a algum dos ácaros avaliados no teste ID;
- b. Qualquer sinal clínico de doença tegumentar;
- c. Medicação prévia com glicocorticoides sistêmicos, tópicos ou com anti-histamínicos, pelo prazo de duas semanas;
- d. Medicação prévia com glicocorticoides de longa duração (injetáveis), pelo prazo de quatro semanas;

- e. Período de estro, gestação ou lactação;
- f. Temperamento agitado ou agressivo, que impossibilitasse a contenção manual para a realização dos testes.

3.4. TESTE INTRADÉRMICO

3.4.1. Seleção dos extratos

Para a realização do teste ID, foram utilizadas como controle negativo uma solução salina fenolada e, como controle positivo, uma solução contendo 0,1 mg/mL de histamina base, baseado em estudo prévio de limiar irritativo (Ferreira, 2013).

Os extratos para teste alérgico foram produzidos a partir do corpo total de ácaros, e possuíam as seguintes concentrações:

- *D. pteronyssinus* – 100 UBE/mL
- *D. farinae* – 100 UBE/mL
- *B. tropicalis* – 50 UBE/mL

Tanto os controles positivo e negativo, quanto os extratos alergênicos, foram produzidos e fornecidos pelo FDA Allergenic (Laboratório de Antígenos, Rio de Janeiro, Brasil).

3.4.2. Protocolo do teste intradérmico

Anteriormente ao início do experimento, a equipe executora foi treinada e submetida a teste de proficiência para realização do teste ID, como descrito por Cunha *et al.* (2013), devendo apresentar coeficiente de variação menor de 10%.

O teste alérgico intradérmico foi realizado conforme o estabelecido por Hillier e DeBoer (2001) em todos os cães selecionados.

Primeiramente, foi realizada a tricotomia com auxílio de máquina de tosa¹, na região lateral do tórax.

¹ Máquina de tosa da marca Oster ou outra marca disponível no local do atendimento.

Após a tricotomia e a higienização local com solução fisiológica, foram feitas as marcações dos pontos de aplicação com intervalos de três centímetros de distância entre cada um, com caneta dermatográfica.

As aplicações, contendo 50 microlitros(μ L), foram então feitas no espaço intradérmico, com seringas de 30 U e agulhas de 6 mm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro².

Os cães foram contidos manualmente por cinco minutos, sem a necessidade de anestesia ou sedação. Em seguida, foram realizadas cinco aplicações intradérmicas em cada cão (controles positivo, negativo e os extratos alergênicos dos três ácaros), nas áreas delineadas (Figura 3A).

Quinze minutos após as aplicações, foram novamente contidos por mais cinco minutos para a leitura do teste.

O ponto de corte (*cut off*) foi estabelecido através do cálculo da média entre os valores obtidos para o controle negativo (CN) e o controle positivo (CP), conforme a fórmula abaixo:

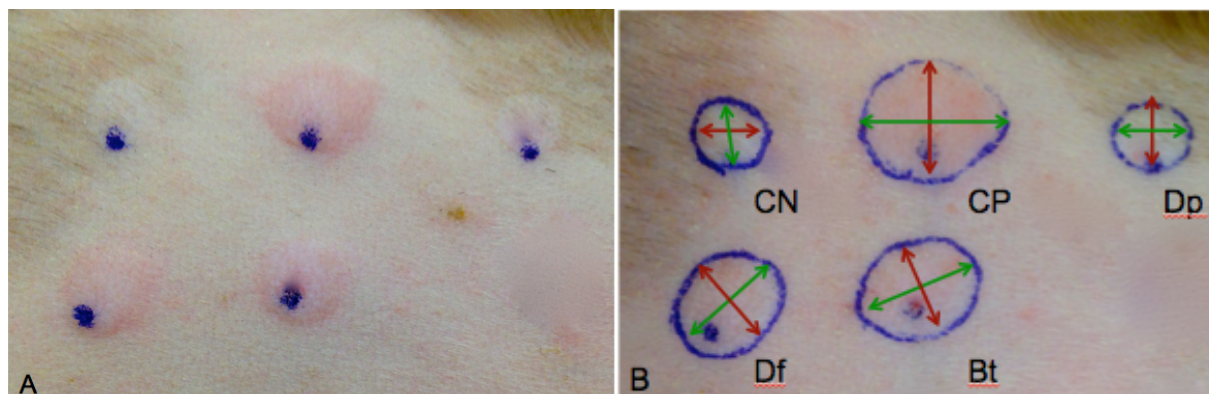
$$Cut\ off = \frac{\bar{X}CN + \bar{X}CP}{2}$$

Os resultados foram avaliados através da aferição e registro através do diâmetro ortogonal médio das pápulas formadas (Figura 3B).

Foram consideradas resultados positivos, as reações papulares no local da aplicação com média igual ou superior ao valor do ponto de corte calculado para cada paciente. Resultados negativos apresentaram valores menores que o do ponto de corte estabelecido.

²Seringa BD Ultra-fine II ®(6 mm x 0,25 mm).

Figura 3– Demonstração da realização do teste ID. **A.** Aplicação de 50 µL dos controles negativo e positivo e dos extratos alergênicos na lateral do tórax para realização do teste cutâneo intradérmico em um cão com dermatite atópica; **B.** Marcações das pápulas no local da aplicação após 15 minutos da aplicação e aferição do diâmetro maior (setas em verde) e perpendicular (setas em vermelho) a ele. CN. Controle negativo; CP. Controle positivo; Dp. Reação negativa para *D. pteronyssinus*; Df. Reação positiva para *D. farinae*; Bt. Reação positiva para *B. tropicalis*.



Fonte: Elaborado pela autora

3.5 TÉCNICA DE IMMUNOBLOTTING

3.5.1. Obtenção e acondicionamento da amostra de sangue

Os cães foram contidos manualmente para tricotomia, higienização cutânea com algodão embebido em solução de clorexidine alcoólico, e coleta de 10 mL de sangue da veia jugular com agulha 25x7 e seringa de 10 mL.

O sangue coletado foi armazenado em frasco sem anticoagulante e mantido na posição vertical à temperatura ambiente por trinta minutos em suporte próprio. Após a coagulação, o soro foi separado por centrifugação a 3.000 rpm, aliquoteado em amostras de 500 µL em eppendorf³ e mantido a -20°C até o momento da análise que foi realizada no laboratório da empresa Citeq Biologics, na cidade de Groningen, Holanda.

³ Eppendorf Safe-Lock Tubes™

3.5.2 Separação das proteínas

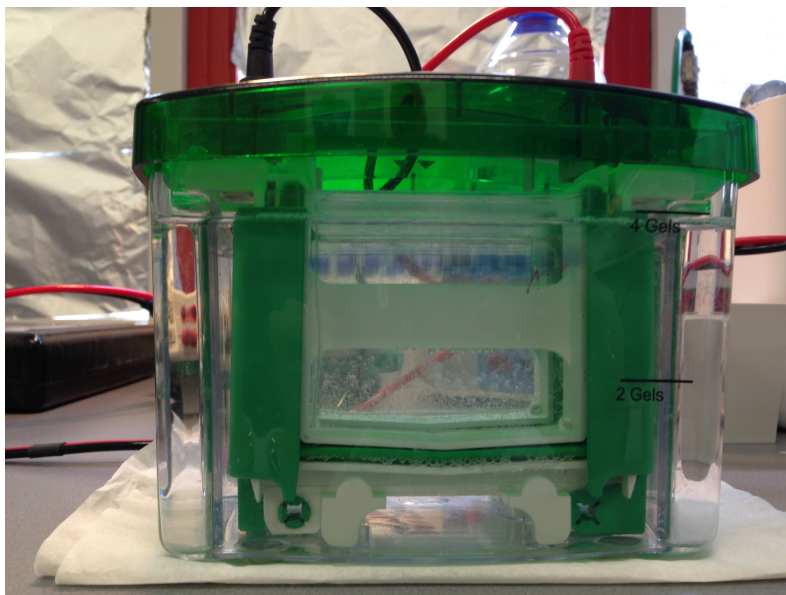
Os extratos alergênicos de *D. pteronyssinus*, *D. farinae* e *B. Tropicalis*, foram filtrados e concentrados por meio do Amicon YM 10, em uma membrana de nitrocelulose, com poros para separação de proteínas com peso molecular acima de 10 kDa. Em seguida, a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford (1976) modificado, com albumina sérica bovina (Sigma Chemical Co., EUA) como padrão.

Os extratos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) para separação das proteínas (Laemmli, 1970). Foram preparados géis de poliacrilamida a e 4% e 15%, para empilhamento e separação das proteínas, respectivamente.

Resumidamente, os géis foram preparados em unidades verticais e as amostras dos extratos foram preparadas em solução tampão contendo dodecil-sulfato de sódio 2% (SDS) e 2-mercaptoetanol 5%. As amostras foram fervidas por 10 minutos e então aplicadas no gel de empilhamento (20 µg de proteína/poço).

Para determinação do peso molecular, foi utilizado 10µL de padrão de pesos moleculares (Biotinylated SDS PAGE Standards, Low Range, Bio-Rad). A separação das proteínas nos géis ocorreu na presença de solução tampão (Tris/Glycine/SDS Buffer, Bio-Rad) e através da aplicação de corrente elétrica com 20 mA por duas horas (Sistema Mini-Protean II, Bio-Rad) (Figura 4).

Figura 4: Eletroforese em um Sistema Mini-Protean II, Bio-Rad de extratos alergênicos de ácaros, numa corrente elétrica de 20 mA.



Fonte: Autora

3.5.3 Immunoblotting

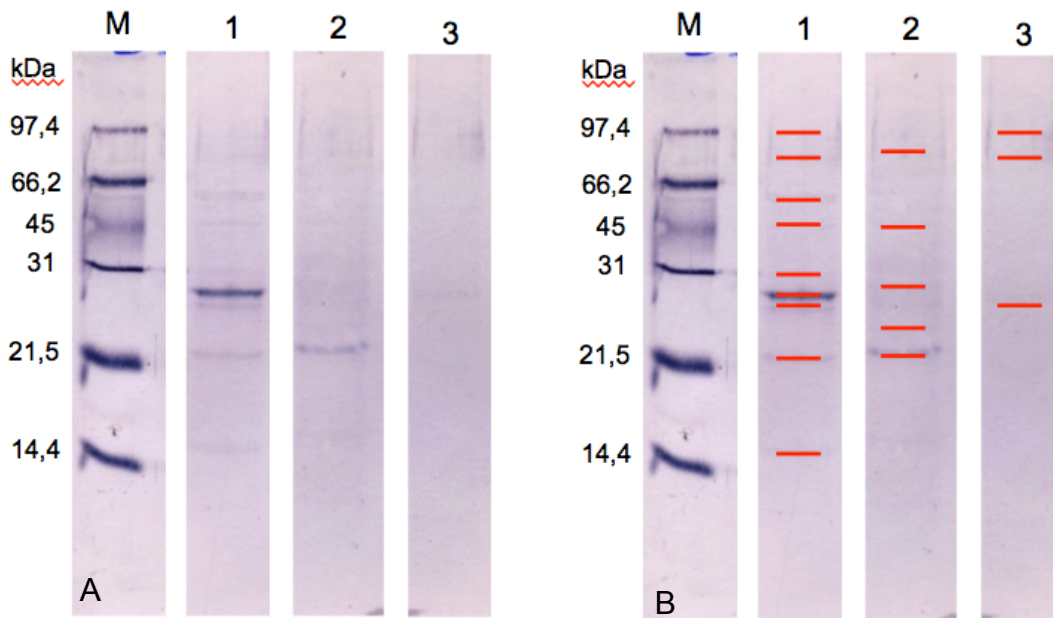
Após a separação das proteínas no gel de poliacrilamida, as mesmas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Milipore), com poros de 0,45 μm , através do sistema Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell (Bio-Rad). A membrana foi umedecida com tampão de transferência (Tris 15.6mM, glicina 120 mM e metanol 20%) e as proteínas foram transferidas a 200 V por uma hora.

As membranas foram bloqueadas com leite em pó (*skim milk powder*) a 3% em solução salina tamponada com fosfato contendo Tween (PBS/Tween), sob agitação durante uma hora. Em seguida, foram lavadas três vezes por cinco minutos com PBS/Tween, para posterior incubação com o soro do cão a ser testado, o qual foi diluído 1:5 à temperatura ambiente, por uma hora, sob agitação.

Após nova lavagem com PBS/Tween, as membranas foram incubadas com conjugado anti-IgE monoclonal de cão (diluição 1:10.000) *overnight* a 4°C e sob agitação. As membranas foram novamente lavadas com PBS/Tween e, em seguida, foi adicionada estreptavidina (Mediwiss Alanytic GmbH), permanecendo sob agitação por

30 minutos. Logo após, realizou-se nova lavagem com PBS/Tween e a membrana foi exposta ao substrato Farbstoff BCIP/NBT (Mediwiss Alanytic GmbH) durante cinco minutos, para detecção das bandas de proteínas (Figura 5).

Figura 5: *Immunoblotting* A. Identificação de bandas utilizando soro de cão com dermatite atópica e anti-IgE canina monoclonal. B. Marcações em vermelho indicam reação positiva; kDa. Quilodáltons; M. Padrão de pesos moleculares; 1.Extrato alérgenico de *D. pteronyssinus*; 2.Extrato alérgenico de *D. farinae*; 3.Extrato alérgenico de *B. tropicalis*.



Fonte: Autora

3.6 TABULAÇÃO DOS DADOS

Na técnica de *immunoblotting*, utilizou-se como padrão os seguintes pesos moleculares dos alérgenos: 14,4; 21,5; 31; 45; 66,2 e 97,4 kDa.

Utilizando esses pesos moleculares, tabularam-se os dados, dividindo as bandas observadas nos seguintes intervalos: menor que 14,4 kDa; entre 14,5 e 21,4 kDa; entre 21,5 e 30,9; entre 31 e 44,9; entre 45 e 66,1; entre 66,2 e 97,4 e maior que 97,4.

Para facilitar as nomenclaturas, os intervalos foram codificados conforme a tabela a seguir:

Tabela 2: Codificação dos intervalos de pesos moleculares.

<i>Intervalo</i>	<i>Código do Intervalo</i>
< 14,4 kDa	1
14,5 - 21,4 kDa	2
21,5 – 30,9 kDa	3
31 – 44,9 kDa	4
45 - 66,1 kDa	5
66,2 - 97,4 kDa	6
> 97,4 kDa	7

Fonte: Elaborado pela autora.

As avaliações dos intervalos de peso molecular de cada ácaro, através da técnica de *immunoblotting*, foi realizada quando os cães apresentaram resultado positivo ao ácaro no teste intradérmico.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, realizou-se uma análise descritiva dos dados, seguida do Teste Exato de Fisher para comparação de proporções. Tal teste foi feito em pares e sucessivas vezes, a fim de determinar qual o intervalo que mais cães reagiram para cada ácaro. Os dados foram descritos em proporções para uma devida comparação entre os grupos, visto que cada grupo apresentou um número diferentes de animais.

O Teste Exato de Fisher é uma adaptação do teste de comparação de duas proporções, para quando o número de eventos é inferior a 5 ou quando o número de ensaios menos o número de eventos é inferior a 5, pois, quando isso acontece, a aproximação com a distribuição normal não é válida. O teste em questão é baseado na distribuição hipergeométrica.

As hipóteses utilizadas no teste serão:

$$H_0 : p_1 = p_2 \text{ vs } H_1 : p_1 > p_2$$

onde p_1 e p_2 são as proporções das populações 1 e 2, respectivamente.

Para a realização do teste, foi utilizado o *software* estatístico Minitab®16 e foi considerado um nível de significância padrão para esse tipo de análise de $\alpha = 5\%$. A regra de rejeição utilizada foi de que se $p\text{-valor} < \alpha$, rejeita-se a hipótese nula em favor da alternativa.

4. RESULTADOS

4.1 PERDA AMOSTRAL

Foi realizado teste ID em 67 cães, sendo que 17,9% (12) eram cães saudáveis e 82% (55) eram cães com DA.

Foram excluídos do estudo 33 cães com DA que apresentaram resultados negativos no IDT aos três ácaros testados, e dois cães por não completarem o prazo mínimo de oito semanas de dieta de exclusão.

No GS, um cão foi excluído por apresentar resultado positivo no teste ID aos ácaros *D. farinae* e *B. tropicalis*.

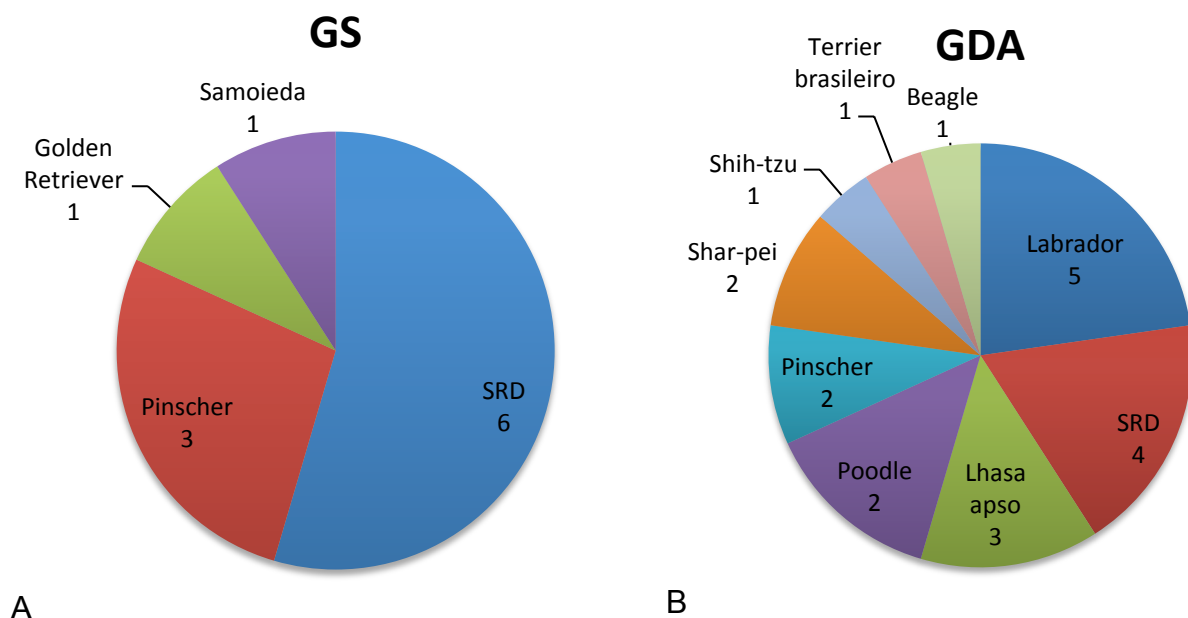
4.2 EPIDEMIOLOGIA

Trinta e três cães completaram o estudo, sendo 22 cães no GDA, e 11 cães no GS. Dentre os animais do GDA, observou-se que 23% (05) dos cães eram da raça Labrador, 14% (03) eram da raça Lhasa apso, 14% (03) da raça Poodle, e os outros 31% eram das raças: Pinscher (02), Shar-pei (02), Shih-tzu (01), Terrier brasileiro (01) e Beagle (01), e 18% (04) eram cães mestiços. A mediana da idade desses animais foi de quatro anos.

No GS, 27,2% (03) dos cães eram da raça Pinscher, 9% (01) eram da raça Golden Retriever, 9% (01) da raça Samoieda, e 63,6% (07) dos cães eram mestiços. A mediana da idade foi de nove anos (Figura 6).

No GS 54,5% (06) dos cães eram fêmeas, enquanto o GDA teve 59% (13) de cães machos.

Figura 6: Distribuição das raças. A. Cães do grupo saudáveis (GS); B. Cães do grupo com dermatite atópica (GDA).



Fonte: Elaborado pela autora

4.3 TESTE INTRADÉRMICO

O resultado do teste intradérmico dos 22 cães do GDA estão dispostos na tabela abaixo:

Tabela 3: Resultado dos testes intradérmicos realizado para os ácaros DP (*D. pteronyssinus*), DF (*D. farinae*) e BT (*B. tropicalis*) para cada animal do GDA.

Animal / Ácaro	Resultado teste intradérmico		
	DP	DF	BT
1		X	
2	X	X	X
3	X	X	

4	X		
5			X
6	X		
7	X		
8			X
9	X		X
10	X	X	X
11		X	X
12		X	X
13	X		
14	X	X	X
15	X		X
16			X
17	X		
18	X	X	
19			X
20	X		
21	X	X	X
22		X	X

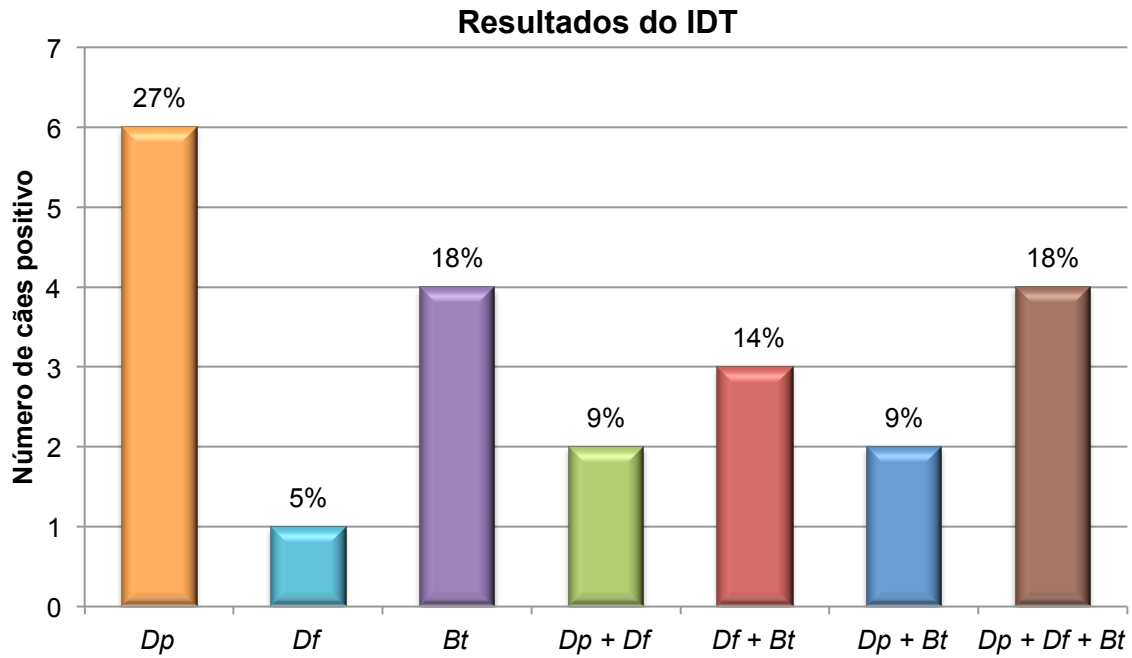
Fonte: Elaborado pela autora

A reação ao ácaro *D. pteronyssinus* ocorreu em 63,3% (14) dos animais, sendo que 42,8% (06) dos cães apresentaram reação somente a esse ácaro.

Reação a *B. tropicalis* foi positiva em 59% (13) dos cães, sendo presente como fonte única de sensibilização em 30,7% (04) dos cães.

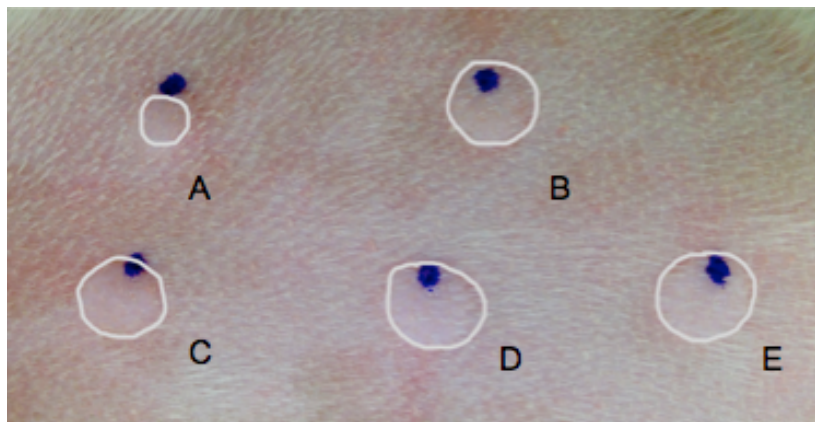
A reação a *D. farinae* ocorreu em 45,5% (10) dos cães, e somente 10% (01) reagiram somente a esse ácaro (Figura 7).

Figura 7: Resultados do teste ID nos cães atópicos selecionados para o projeto. *Dp* (*D. pteronyssinus*), *Df* (*D. farinae*) e *Bt* (*B. tropicalis*).



Fonte: Elaborado pela autora

Figura 8: Teste intradérmico realizado em cão do GDA, apresentado resultado positivo aos três ácaros testados. A. Controle negativo; B. Controle positivo; C. *D. pteronyssinus*; D. *D. farinae*; E. *B. tropicalis*.



Fonte: Autora

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE REAÇÃO AOS ALÉRGENOS DE ÁCAROS

Dos 22 cães com DA positivos no teste ID para pelo menos algum dos três ácaros testados, identificaram-se bandas com peso molecular que variaram de menor que 14,4 kDa a maior que 97,4 kDa.

Separando os dados por ácaro, foram calculadas as proporções de cães que reagiram nos determinados intervalos de pesos moleculares nos grupos atópico e controle. As tabelas a seguir mostram os valores obtidos.

4.4.1 Reação aos alérgenos do ácaro *Dermatophagoides pteronyssinus*

A Tabela 4 mostra que 92,8% (13) dos cães do GDA reagiram no intervalo de peso molecular de 21,5 a 30,9 kDa. No GS, todos os cães reagiram ao mesmo intervalo do GDA. Os outros intervalos tiveram quantidades bem inferiores de cães que reagiram.

Tabela 4: Proporção e o número absoluto de cães que reagiram para o ácaro Dp.

Dp	Intervalos						
	1	2	3	4	5	6	7
Grupo	< 14,4 kDa	14,4 - 21,4 kDa	21,5 – 30,9 kDa	31 – 44,9 kDa	45 - 66,1 kDa	66,2 - 97,4 kDa	> 97,4 kDa
GDA	0,0714 /1	0,5000 /7	0,9286 /13	0,2143 /3	0,0714 /1	0,2857 /4	0,0000 /0
GS	0,0000 /0	0,1818 /2	1,0000 /11	0,0000 /0	0,1818 /2	0,1818 /2	0,0909 /1

Fonte: Elaborado pela autora.

Tanto no GDA quanto no GS, a maior proporção de cães está no intervalo 3. Portanto, este intervalo foi testado contra o intervalo 2, que apresentou a segunda maior proporção para ambos os grupos. A Tabela 5 apresenta os p-valores para cada par de intervalos testados.

Tabela 5: Resultados dos p-valores para o ácaro Dp, GDA e GS.

GDA		GS	
Intervalos	p-valor	Intervalos	p-valor
3 e 2	0,016*	3 e 2	<0,001*

Fonte: Minitab®16.

A marcação do asterisco indica que o p-valor é estatisticamente significativo, ou seja, o primeiro intervalo testado é estatisticamente maior que o segundo. Assim, a proporção do intervalo 3 é maior que o intervalo 2, conseqüentemente, maior que todas as outras. Portanto, para ambos os grupos, o intervalo de peso molecular que mais cães reagiram foi o de 21,5 a 31 kDa para o ácaro Dp.

4.4.2 Reação aos alérgenos do ácaro *Dermatophagoides farinae*

Para o ácaro Df, conforme mostrado na Tabela 6, 100% (10) os cães reagiram no intervalo de 21,5 a 30,9 kDa. Foi visto também que 50% (5) dos cães reagiram no intervalo de 66,2 a 97,4 kDa. Da mesma forma, para o GS, 100% (11) dos cães reagiram no intervalo de 21,5 a 30,9 kDa e 60% (6) dos cães também reagiram no intervalo > 97,4 kDa.

Tabela 6: Proporção e o número absoluto de cães que reagiram para o ácaro Df.

Df	Intervalos						
	1	2	3	4	5	6	7
Grupo	< 14,4 kDa	14,4 - 21,4 kDa	21,5 – 30,9 kDa	31 – 44,9 kDa	45 - 66,1 kDa	66,2 - 97,4 kDa	> 97,4 kDa
GDA	0,1000 /10	0,4000 /4	1,0000 /10	0,0000 /0	0,3000 /3	0,5000 /5	0,4000 /4
GS	0,0000 /0	0,0000 /0	1,0000 /11	0,1818 /2	0,1818 /2	0,4545 /5	0,5455 /6

Fonte: Elaborado pela autora.

O maior número de animais (100% /10) que tiveram reações, foram encontradas no intervalo 3, para ambos os grupos. Sendo assim, a Tabela 7 mostra a comparação entre o intervalo 3 e o segundo intervalo com maior proporção, o intervalo 6 para o GDA e o 7 para o GS.

Tabela 7: Resultados dos p-valores para o ácaro Df, GDA e GS.

GDA		GS	
Intervalos	p-valor	Intervalos	p-valor
3 e 6	0,016*	3 e 7	0,018*

Fonte: Minitab®16.

A proporção do intervalo 3 é maior que a do próximo de proporção inferior, conseqüentemente, maior que todas as outras. Portanto, para ambos os grupos, o intervalo de peso molecular que mais cães reagiram foi o de 21,5 a 31 kDa para o açúcar Df.

4.4.3 Reação aos alérgenos do açúcar *Blomia tropicalis*

A Tabela 8 mostra os resultados para o açúcar Bt. De forma semelhante aos outros dois açúcares, para o Bt, tem-se que 46% (6) dos cães reagiram no intervalo de 21,5 a 30,9 kDa. E, para o GS, diferentemente dos outros açúcares, teve uma maior proporção diferente que o GDA, tendo 45% (5) dos cães reagiram no intervalo de 66,2 a 97,4 kDa.

Tabela 8: Proporção e o número absoluto de cães que reagiram para o açúcar Bt.

Bt	Intervalos						
	1	2	3	4	5	6	7
Grupo	< 14,4 kDa	14,4 - 21,4 kDa	21,5 – 30,9 kDa	31 – 44,9 kDa	45 - 66,1 kDa	66,2 - 97,4 kDa	> 97,4 kDa
GDA	0,0000 /0	0,0769 /1	0,4615 /6	0,0000 /0	0,0000 /0	0,3846 /5	0,1538 /2
GS	0,0000 /0	0,0000 /0	0,1818 /2	0,0000 /0	0,0909 /1	0,4545 /5	0,0000 /0

Fonte: Elaborado pela autora.

A tabela 9 mostra a comparação entre os valores de maior proporção para o GDA e para GS.

Tabela 9: Resultados dos p-valores para o açúcar Bt, GDA e GS.

GDA		GS	
Intervalos	p-valor	Intervalos	p-valor
3 e 6	0,5	6 e 3	0,181
3 e 7	0,101	6 e 5	0,074
3 e 2	0,037*	6 e 1	0,018*

Fonte: Minitab®16.

Seguindo a mesma lógica das análises anteriores, para o GDA foi identificado que as proporções dos intervalos 3, 6 e 7 não diferem estatisticamente, ou seja, as proporções de cães que reagiram nos intervalos 3, 6 e 7 são iguais. Porém, a proporção encontrada no intervalo 3 é maior que no intervalo 2, sendo assim, é possível afirmar que: $3 = 6 = 7 > 2$.

Já para o grupo controle, os intervalos 6, 3 e 5 foram estatisticamente diferentes, porém o intervalo 6 foi considerado maior que 1, sendo assim, $6 = 3 = 5 > 1$.

Portanto, para ambos os grupos, não existe um único intervalo de peso molecular que mais cães reagiram, uma vez que os intervalos 3, 6 e 7 e os intervalos 6, 3 e 5 foram considerados estatisticamente iguais para os grupos GDA e GS, respectivamente.

4.4.4 Comparação da reação aos alérgenos entre os grupos GPA e GS

Para fazer a comparação entre os grupos GDA e GS no mesmo intervalo de peso molecular, também foi utilizado o Teste Exato de Fisher. A Tabela 10 apresenta os resultados.

Tabela 10: Resultado dos p-valores para o teste de comparação entre os grupos GDa e GS em cada intervalo e para cada açúcar.

Ácaro	Intervalos						
	1 < 14,4 kDa	2 14,4 - 21,4 kDa	3 21,5 – 30,9 kDa	4 31 – 44,9 kDa	5 45 - 66,1 kDa	6 66,2 - 97,4 kDa	7 > 97,4 kDa
Dp	0,560	0,110	1,000	0,158	0,407	0,452	0,440
Df	0,476	0,035*	1,000	0,262	0,450	0,740	0,410
Bt	1,000	0,542	0,256	1,000	0,458	0,270	0,283

Fonte: Minitab®16.

Conforme mostrado na Tabela 9, apenas o intervalo de 14,4 a 21,5 kDa foi considerado estatisticamente diferente para os grupos GDA e GS, para o açúcar Df. Ou

seja, o grupo de cães com DA teve uma proporção maior de indivíduos que reagiram, quando comparado com o grupo controle.

Com as análises realizadas, pode-se verificar que para os ácaros Dp e Df, o intervalo de peso molecular que mais cães reagiram foi o de 21,5 a 31 kDa, para ambos os grupos: GDA e GS. Para o ácaro Bt não foi encontrado um intervalo de peso molecular que mais cães reagiram. E, fazendo a comparação entre ambos os grupos, para cada intervalo, apenas para o ácaro Df, o intervalo de 14,4 a 21,5 kDa foi considerado que a proporção de cães que reagiram foi maior no grupo atópico que no grupo controle.

5. DISCUSSÃO

O microclima ideal para a maioria dos ácaros domésticos é de 20-30°C e 80-90% de umidade. O Brasil é um país tropical com condições adequadas para a proliferação dos ácaros domiciliares, com umidade relativa de 70% e temperatura média de 27°C (Cunha, *et al.*, 2012b). Essas condições são favoráveis à proliferação de *D. pteronyssinus*, que é mais comum em países de clima temperado e tropical (Colloff, 1987), e de *B. tropicalis*, frequentemente encontrado em áreas de clima tropical e subtropical (Binotti *et al.*, 2001). *D. farinae* é mais frequente em ambientes secos (Préloud, 2014) em climas continentais (Farmaki *et al.*, 2012) com temperaturas de 25–30°C e umidade relativa do ar de 50 – 60% (Hart, 1998).

No teste ID, os cães com DA incluídos no estudo mostraram maior sensibilidade aos ácaros *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*, e menor sensibilidade a *D. farinae*, fato que corrobora com a prevalência desses ácaros em Curitiba.

Segundo Assunção (2014), Der p 1 é o principal alérgeno encontrado na poeira domiciliar no microambiente de cães com dermatite atópica, em Curitiba/PR, quando comparado a Der f 1 e Blo t 5.

Cães com DA, no presente trabalho, reconheceram significativamente alérgenos com peso molecular entre 21,5 e 30,9 kDa de todos os ácaros testados. A grande incidência de reações a alérgenos de baixo peso molecular também foi vista no estudo

de Martins *et al.*(2015), que mapearam os alérgenos do ácaro *D. pteronyssinus* capazes de desencadear resposta imunológica nos cães com DA, e observaram 75% (15/20) e 95% (19/20) de cães reagindo a proteínas com peso de 23,5 kDa e 32,5 kDa, respectivamente.

Os principais alérgenos que possuem pesos moleculares entre o intervalo de 21,5 a 31 kDa, pertencem aos grupos 1 (Der p 1, Der f 1), 3 (Der p 3, Der f 3, Blo t 3), 6 (Der p 6, Der f 6 , Blo t 6) e 9 (Der p 9) (Colloff, 2009).

Alérgenos de ácaro do grupo 1 são proteases-cisteína, com peso molecular de 25 kDa (Colloff, 2009). Estes apresentam uma alta permeabilidade epitelial através de vários mecanismos, como degradação das ocludinas, claudinas e das *tight junctions*, além de facilitar a ação de proteases que degradam a α_1 -antitripsina (Bizikova, *et al.*, 2015).

Os alérgenos dos grupos 3, 6 e 9 (Der p 3, Der p 6, Der p 9, Der f 3, Der f 6, Blo t 3, Blo t 6) são proteases-serina (Colloff, 2009; Cunha *et al.*, 2012), mais especificamente: tripsina, quimiotripsina e colagenase, respectivamente (Bizikova, *et al.*, 2015), e compõem cerca de 80% das proteases encontradas em extratos da poeira doméstica (Yamashita *et al.*, 2002).

Da mesma forma que os alérgenos do grupo 1, tem sido demonstrado que proteases-serina podem interferir na integridade epitelial, pela destruição das *tight junctions* (Bizikova *et al.*, 2015). Estas ações podem permitir a penetração destes alérgenos por via percutânea, levando à sensibilização e à exarcebação da inflamação (Bizikova *et al.*, 2015).

Os cães saudáveis também reconheceram bandas com peso molecular entre 21,5 e 30,9 kDa, o que denota que estes alérgenos são encontrados em vários domicílios, e que cães saudáveis, ao serem expostos, produzem anticorpos contra os mesmos alérgenos que pacientes alérgicos.

Porém, como não foi observada reação positiva nos testes ID nos animais saudáveis e nem sintomas clínicos, acredita-se que esses alérgenos são incapazes de precipitar doença nestes cães, como ocorreu nos animais com dermatite atópica. Isto

pode ser explicado por algumas alterações que encontramos em cães com dermatite atópica, por exemplo, a maior tendência à resposta Th2, o que pode levar a uma maior quantidade de IL-4 e IL-13, e à formação de plasmócitos e de IgE alérgeno-específica, tornando a pele hiper-reativa, e fazendo com que estes animais manifestem síndromes clínicas (Nuttall *et al.*, 2013).

Além disso, cães com DA apresentam um maior número, funcionalidade e proliferação de mastócitos, quando comparados com cães normais (Abramo *et al.*, 2014). Os mastócitos dos cães expressam aos receptores alta afinidade para IgE (FceRI). A expressão deste receptor em cães é estabilizada e aumentada na presença desta imunoglobulina (Olivry *et al.*, 2008).

Em humanos, sabe-se que há uma maior expressão do receptor FceRI nas células dendríticas em pacientes com DA (Shin e Greer, 2015). Existem outros mecanismos não IgE-dependentes que levam à desgranulação dos mastócitos (Hammerberg *et al.*, 2001).

Pucheu-Haston *et al.* (2015), observaram desgranulação dos mastócitos em cães com DA, após aplicação epicutânea de extratos com alérgenos proteolíticos de ácaros. Através desses estudos, também pode ser explicado o fato de os cães com DA terem testes positivos no ID, enquanto os cães saudáveis não apresentavam reação, mesmo ambos apresentando IgE contra antígenos de ácaros no *immunoblotting*.

No presente trabalho, um número significativo de cães com DA foi sensibilizado a proteínas do ácaro *D. farinae* com peso molecular entre 14,4 e 21,4 kDa, provavelmente sendo o Der f 2, quando comparado aos cães saudáveis. Esse alérgeno é uma proteína ligante de lipídio (Colloff, 2009), proveniente das fezes e das cutículas dos ácaros, com peso molecular de 15 kDa (Bessot e Pauli, 2011).

Ainda, segundo Yamashita *et al.* (2002), alérgenos do Grupo 2, especialmente Der f 2, são um dos principais alérgenos para cães com DA.

O baixo peso molecular desse alérgeno pode ter favorecido sua transposição percutânea em maior quantidade em cães com dermatite atópica, os quais já apresentam defeitos de barreira tegumentar (Nuttall *et al.*, 2013). Em adição, isto pode

ter favorecido sua fagocitose e processamento pelas células dendríticas, estimulação à resposta Th2 e consequente produção de IgE (Morris, 2010; Jacquet, 2013).

A maior frequência de reação observada a alérgenos de baixo peso molecular em cães com dermatite atópica no presente estudo, pode ter ocorrido pela diferença nas concentrações de poliacrilamida utilizada como gel para a eletroforese.

Diferentes concentrações permitem a criação de diferentes tamanhos médios de poros, cujo diâmetro é inversamente proporcional à concentração de acrilamida (Bollag *et al.*, 1996).

Assim, quando utilizado um gel com concentração de 10% de poliacrilamida, os poros são maiores, e evidenciam-se mais facilmente proteínas de alto peso molecular, como observado por Nuttall *et al.* (2001), que identificaram que 50% dos cães com dermatite atópica reconheceram proteínas de alto peso molecular como principais alérgenos.

Já o gel com concentração de 15%, como o utilizado no presente trabalho, cria poros menores, o que faz com que as proteínas de baixo molecular sejam melhor distribuídas e visualizadas, o que permitiu a evidenciação de alérgenos de baixo peso molecular como sendo alérgenos principais, nos cães com dermatite atópica estudados.

Entretanto, a utilização de gel de alta concentração não impediu a evidenciação de reação a proteínas de alto peso molecular, já que reações a estas foram observadas em relação aos ácaros *D. farinae* e *B. tropicalis*.

Reações aos antígenos de peso molecular entre 66,2 a 97,4 kDa e acima de 97,4 kDa, do ácaro *D. farinae*, foram observadas em mais da metade dos cães do GDA e GS, respectivamente, no presente estudo.

Possivelmente estes alérgenos correspondem a Der f 11 e Der f 15, ambos com 98 kDa, e a Der f 28, com 70 kDa. Estudos pregressos também demonstraram que o Der f 15 e Der f 18, que apresentam peso molecular de 98 e 60 kDa, respectivamente, são importantes na sensibilização e na precipitação da DA em cães (Mccallet *al.*, 2001; Weberet *al.*, 2003). Ambos alérgenos são quitinases, presentes no intestino dos ácaros, mas não são encontrados nas suas fezes (Bessot e Pauli, 2011).

Alérgenos do ácaro *B. tropicalis* associados à precipitação ou exacerbação da DA não foram ainda totalmente identificados. Em humanos com rinite e asma, Blo t 5 já foi reconhecido como importante alérgeno (Arruda *et al.*, 1997; Araujo *et al.*, 2015). Cunha *et al.* (2012a) avaliaram IgE sérica de cães com DA sensíveis ao ácaro *B. tropicalis* no teste ID positivo, e observaram que 50% dos cães identificaram uma proteína com peso molecular entre 52 e 76 kDa, o que sugeriu reação ao alérgeno Blo t 4.

No presente estudo, reações a proteínas de alto peso molecular do ácaro *B. tropicalis* também foram evidenciadas, sendo que a maioria dos cães reagiu a proteínas maiores que 66,2 kDa, que podem ser uma paramiosina, identificada como Blo t 11, de peso molecular de 110 kDa (Colloff, 2009). Porém, a mesma nunca foi identificada em cães com DA.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

- a) Os alérgenos dos ácaros *D. pteronyssinus* são os principais responsáveis pela sensibilização de cães com dermatite atópica em Curitiba;
- b) Alérgenos de baixo peso molecular dos ácaros *D. pteronyssinus* e *D. farinae* parecem ser alérgenos maiores em cães com dermatite atópica;
- c) Tanto alérgenos de baixo como de alto peso molecular do ácaro *B. tropicalis* causam sensibilização em cães com dermatite atópica;
- d) Cães com dermatite atópica *strictu sensu* e cães saudáveis são expostos aos mesmos alérgenos em seus microambientes domiciliares, porém, somente os cães com dermatite atópica sensibilizam-se e manifestam síndromes clínicas.

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A identificação dos alérgenos específicos dos ácaros associados à doenças alérgicas é fundamental para o estabelecimento de melhores métodos diagnósticos e protocolos de imunoterapia alérgeno específica, visando à dessensibilização, indução de tolerância, e minimização dos sinais clínicos relacionados à doenças alérgicas.

Para isso, faz se necessário estudos utilizando técnicas de SDS-PAGE e *Immunoblotting* com géis de várias concentrações para identificar à sensibilização a alérgenos maiores e menores para cada ácaro.

O presente estudo permitiu identificar reações a alérgenos de baixo peso molecular em cães com dermatite atópica, porém novos estudos, utilizando esses alérgenos em extratos padronizados são necessários para avaliar a precipitação de eczema atópico nos cães.

O reconhecimento que alérgenos de baixo peso molecular podem sensibilizar cães com dermatite atópica é importante pois esses alérgenos são amplamente encontrados em produtos têxteis do domicílio, como cama, sofá e colchão, e seu controle através de aspiração é essencial para evitar a precipitação de eczema atópico.

Em adição, os alérgenos de baixo peso molecular são os mais associados à sensibilização e precipitação de rinite e asma em seres humanos. Assim o cão com eczema atópico pode servir de sentinela para a exposição humana.

REFERÊNCIAS

Abramo F, Campora L, Albanese F *et al.* Increased levels of palmitoylethanolamide and other bioactive lipid mediators and enhanced local mast cell proliferation in canine atopic dermatitis. *BMC Veterinary Research* 2014; 10: 21.

Alberts B, Gray O, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artes Médicas. 2004; 1394-1396.

Allergen nomenclature [homepage]. USA. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee. 2015. [atualizado em 2015; acessado em 20 jul 2015]. [4 telas]. Disponível em: < <http://www.allergen.org/index.php>>.

Araujo LML, Rosario NA, Mari A. Molecular-based diagnosis of respiratory allergic diseases in children from Curitiba, a city in Southern Brazil. *Allergologia et Immunopathologia*. 2015; 13(15): 00054-3.

Arlan LG, Morgan MS. Biology, ecology, and prevalence of dust mites. *Immunology and Allergy Clinics of North America*. 2003; 23: 443–468.

Arlan LG, Platts-Mills TAE. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2001;107(3 Suppl):S406-13.

Arruda LK, Vailes LD, Platts-Mills TA, Fernandez-Caldas E, Montealegre F, Lin KL, Chua KY, Rizzo MC, Naspitz CK, Chapman MD. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 1997;155(1):343-50.

Assunção. DL. Avaliação da concentração de alérgenos de ácaros na pelagem e na poeira de domicílios de cães (*Canis lupus familiaris*) com dermatite atópica. [Tese] Pontifícia Universidade Católica do Paraná; 2014. 88 p. Mestrado em Ciência Animal.

Baggio D, Ambrozio LC, Cordaro C. Household mites from South American Countries – A review. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*. 1992; 15:A90.

Baggio D, Ambrozio LC. Domestic mites in the Brazilian countries. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*. 1992;15: A93.

Bessot JC, Pauli G. Mite allergens: an overview. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology*. 2011; 43 (5):141-156.

Binotti RS, Muniz, JRO, Paschoal, IA, Prado, AP, Oliveira, CH. House dust mites in Brazil – an annotated bibliography. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2001; 96(8): 1177-1184.

Bizikova P, Pucheu-Haston CM, Eisenschenk MNC, Marsella R, Nuttall T, Santoro D. Review: Role of genetics and the environment in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. 2015; 26:95–e26.

Bollag DM, Rozycki MD, Edelstein SJ. *Protein Methods*. 2^a ed. New York: Wiley-Liss, 1996.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976; 7(72):248-254.

Chagas KN, Muniz JRO, Binotti RS, Oliveira CH, Chagas, KDN, Prado AP. Primeiro levantamento de ácaros em poeira de casas da cidade de Araguaína – Tocantins. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*. 2000; 23:209.

Chapman MD, Pom'és A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and structural biology of allergens. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2007; 119:414–420.

Colloff MJ. Mites from house dust in Glasgow. *Medical and Veterinary Entomology* 1987; 1:163–168.

Colloff, M.J. Dust mites. Collingwood: CSIRO, 2009.

Cork MJ, Robinson DA, Vasilopoulos Y *et al*. New perspectives on epidermal barrier dysfunction: gene–environment interactions. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006; 118: 3–21.

Cunha VES, SilvaMH, FacciniJLH, Serological identification of house dust mite allergens in dogs with atopic dermatitis. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2012a; 32(0):000-000

Cunha VES, Chagas MV, Ferreira RR, Faccini JLH. Dermatite Atópica Canina e Ácaros Domésticos: revisão. *Medvep Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária*. 2012b; 2(4): 1-637.

Cunha VES, Hahnstadt RL, Soares AMB, Faccini JLH. Evaluation of skin sensitivity in dogs bearing allergic dermatitis to standardized allergenic extracts of house dust and storage mites. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2007; 27: 341-344.

Cunha VES, Nunes TAP, Souza PP. Teste de Proficiência para Testes Intradérmicos

em Cães. [Apresentação na Anclivepa; 2013 mês 1-11; cidade, Brasil].

DeBoer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVI): laboratory evaluation of dogs with atopic dermatitis with serum-based “allergy” tests. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001; 81: 277–87.

Elias PM. Skin barrier function. *Current Allergy and Asthma Reports*. 2008; 8: 299–305.

Farias MR. Dermatite atópica canina: da fisiopatologia ao tratamento. *Clínica Veterinária*. 2007; 48-62

Farmaki R, Saridomichelakis MN, Leontides L., Papazahariadou MG, Gioulekas D, Koutinas AF. Dust mite species in the households of mite-sensitive dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. 2012; 23(3):222-e45.

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

Ferreira, RR. Avaliação de diferentes concentrações de histamina e extratos alergênicos em cães saudáveis submetidos a teste intradérmico. [Tese] Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013. Doutorado em Ciências Veterinárias

Gonzales AJ, Humphrey WR, Messamore JE, Fleck TJ, Fici GJ, Shelly JA, Teel JF, Bammert GF, Dunham SA, Fuller TE, McCall RB. Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. 2013; 24: 48–e12.

Halliwell R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2006; 114: 207–208.

Hammerberg B, Olivry T, Orton SM. Skin mast cell histamine release following stem cell factor and high-affinity immunoglobulin E receptor cross-linking in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. 2001; 12: 339–346.

Hart BJ. Life cycle and reproduction of house-dust mites: environmental factors influencing mite populations. *Allergy*. 1998; 53: 13–17.

Hill PB, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001; 81: 169–86.

Hillier A. Definitively diagnosing atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Medicine*. 2002; 97 (3): 198-208.

Hillier A, DeBoer DJ. The ACVD task force on canine atopic dermatitis. (XVII): intradermal testing. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001; 81: 289–304.

Hillier A, Griffin CE. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001; 81:363-383.

Homey B, Steinhoff M, Ruzicka T, Leung DY. Cytokines and chemokines orchestrate atopic skin inflammation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2006; 118(1): 178 – 189.

Hou C, Day MJ, Nuttall TJ, Hill PB. Evaluation of IgG subclass responses against *Dermatophagoides farinae* allergens in healthy and atopic dogs. *Veterinary Dermatology*. 2006; 17:103-110.

Hudson TJ. Skin barrier function and allergic risk. *Nature Genetics*. 2006; 38: 399–400.

Jackson AP, Foster AP, Hart BJ, Helps CR, Shaw SE. Prevalence of house dust mites and Dermatophagoides group 1 antigens collected from bedding, skin and hair coat of dogs in south-west England. *Veterinary Dermatology*. 2005; 16: 32–38.

Jacquet A. Innate Immune Responses in House Dust Mite Allergy. *ISRN Allergy*. Volume 2013

Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227:680-685.

Leung DYM. Atopic dermatitis: New insights and opportunities for therapeutic intervention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2000; 105(5): 860 – 876.

Leung DYM. The infectious aspects of atopic dermatitis. *Immunology And Allergy Clinics of North America*. 2010; 30:309-21.

Lian TM, Halliwell REW. Allergen specific IgE and IgGd antibodies in atopic and normal dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1998; 66:203-223.

Loewestein C, Muller RS. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Veterinary Dermatology*. 2009; 20:84-98.

Marsella R, Nicklin C, Lopez J. Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Veterinary Dermatology*. 2006; 17:306-312.

Marsella R, Samuelson D, Doerr K. Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. 2009; 21:81–88.

Martins LM, Marques AG, Pereira LM, Goicoa A, Semião-Santos SJ, Bento OP. House dust mite allergy: mapping of *Dermatophagoides pteronyssinus* allergens for dogs by two dimensional immunoblotting. *Advances in Dermatology and Allergology*. 2015; 32(2):73-81.

Mccall C, Clarke K, Stedman K, Dreitz S, Sellins K. Epicutaneous exposure of high IgE responder beagle puppies to *D. farinae* induces dermatitis and anti-mite IgE and T cell responses. *Journal of Allergy and Clinical Immunology Practice*. 2002; 109(1): S349 .

Mccall C, Hunter S, Stedman K, Weber E, Hillier A, Bozic C, Rivoire B, Olivry T. Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2001; v.78: 231-247.

Miller WH, Griffin GE, Campbell KL. *Small animal dermatology*. 7th ed. Saint Louis, Missouri: Elsevier Inc. 2013.

Morris DO. Human allergy to environmental pet danders: a public health perspective. *Veterinary Dermatology*. 2010; 21:441–449.

Nemes Z, Steinert PM. Bricks and mortar of the epidermal barrier. *Experimental and Molecular Medicine*. 1999; 31: 5–19.

Noli C, Bernadina WE, Willemse T. The significance of reactions to purified fractions of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 1996; 52: 147–157.

Nuttall T, Uri M, Halliwell R. Canine atopic dermatitis – what have we learned? *Veterinary Record*. 2013; 172: 201-207.

Nuttall TJ, Hill PB, Bensignor E, Willemse T, and the members of the International Task

Force on Canine Atopic Dermatitis. House dust and forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*. 2006; 17: 223–235.

Nuttall TJ, Lamb JR, Hill PB. Characterisation of major and minor *Dermatophagoides* allergens in canine atopic dermatitis. *Research in Veterinary Science* 2001; 71: 51–57.

Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C, Jackson HA, Mueller RS, Nuttall T, Prélard P. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary Dermatology*. 2010; 21: 233–248.

Olivry T, Dunston SM, Pluchino K *et al*. Lack of detection of circulating skin specific IgE autoantibodies in dogs with moderate or severe atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*; 2008; 122: 182–187.

Olivry T, Naydan DK, Moore PF. Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *American Journal of Dermatopathology*. 1997; 19: 477–486.

Olivry T, Moore PF, Affolter VK *et al*. Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Archives of Dermatological Research*. 1996; 288: 579–585.

Picco F, Zini E, Nett C, Naegeli C, Bigler B, Rufenacht S, *et al*. A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Veterinary Dermatology*. 2008; 19, 150-155.

Platts-Mills TAE, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman MD Indoor allergens and asthma: report of the Third International Workshop. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1997; 100:S2–S24.

Prélaud P. Allergens and environmental influence. In: Noli C, Foster A, Rosenkrantz W. *Veterinary Allergy*. 1st ed. John Wiley & Sons, Ltd; 2014; 24 – 31.

Proksch E, Brandner JM, Jensen JM. The skin: an indispensable barrier. *Experimental Dermatology*. 2008; 17: 1063–72.

Proksch E, Folster-Holst R, Jensen JM. Skin barrier function, epidermal proliferation and differentiation in eczema. *Journal of Dermatological Science*. 2006; 43: 159–69.

Pucheu-Haston CM, Jackson HA, Olivry T *et al*. Epicutaneous sensitization with *Dermatophagoides farinae* induces generalized allergic dermatitis and elevated mite-specific immunoglobulin E levels in a canine model of atopic dermatitis. *Clinical Experimental Allergy*. 2008; 38: 667–679.

Randall A, Hillier A, Cole LK, Kwochka KW, Needham G, Wassom DL. Quantitation of house dust mites and house dust mite allergens in the microenvironment of dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 2003; 64:1580–1588.

Shin JS, Greer AM. The role of FcεRI expressed in dendritic cells and monocytes. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015; 72(12): 2349–2360.

Tee, R.D. Allergy to storage mites. *Clinical & Experimental Allergy*, 1994; 24: 636-640.

Thomas WR, Smith WA, Hales BJ, Mills KL, O'Brien RM. Characterization and immunobiology of house dust mite allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*. 2002; 129:1–18.

Thomas, W.R.; Smith, W.; Hales; B.J. House dust mite allergen characterization: Implication for T-cells responses and immunotherapy. *International Archives of Allergy and Immunology*. 1998;15: 9-14.

Wang Y-S, Chi K-H, Chu R-M. Cytokine profiles of canine monocyte-derived dendritic cells as a function of lipopolysaccharide- or tumor necrosis factor-alpha-induced maturation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2007; 118: 186–198.

Weber E, Hunter S, Stedman K, Dreitz S, Olivry T, Hillier A, Mccal C. Identification, characterization, and cloning of a complementary DNA encoding a 60 kDa house dust mite allergen (Der f 18) for human beings and dogs. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 2003; 112: 79-86.

Yamashita K, Fujiwara C, Azuma R *et al.* Determination of antigenic proteins of housedust mites in 90 dogs suffering from atopic dermatitis. *The Journal of Veterinary Medical Science*. 2002; 64: 673–676.

Zavadniak AF. Verificação da potência de extratos alergênicos e da exposição à alérgenos domiciliares: contribuição ao tratamento de doenças alérgicas [Tese] Curitiba, PR: Universidade Federal do Paraná; 2000, Dissertação de Mestrado.

Zur G, Ihrke PJ, White SD, Kass PH. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-98. Part I. Clinical features and allergen testing results. *Veterinary Dermatology*. 2002; 13: 89-102.

APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO DE USO ANIMAL

Eu, _____,
nacionalidade _____, _____ anos, estado civil _____,
profissão _____, endereço _____

_____, portador do RG _____, proprietário do animal _____, estou permitindo a participação do meu animal em um estudo denominado: **“Identificação sorológica de alérgenos de ácaros da poeira domiciliar associados à sensibilização de cães com dermatite atópica”**, cujos objetivos são: Identificar as proteínas alergênicas, no soro de cães com dermatite atópica, utilizando técnica de imunoblotting.

A participação do meu animal no referido estudo será no sentido contribuir para o melhor entendimento dos principais de alérgenos ambientais provenientes de ácaros na precipitação da inflamação e do prurido (eczema) em cães com dermatite atópica.

Fui alertado de que, da pesquisa a se realizar, posso esperar alguns benefícios, tais como: todos os exames que serão realizados serão gratuitos e assim, será capaz de avaliar a saúde geral do animal.

Recebi, por outro lado, os esclarecimentos necessários sobre os possíveis desconfortos e riscos decorrentes do estudo, levando-se em conta que é uma pesquisa, e os resultados positivos ou negativos somente serão obtidos após a sua realização. Assim, o meu animal passará por teste intradérmico em região lateral do tórax e por coleta de sangue.

Estou ciente de que o meu animal será atendido, respeitado e receberá os cuidados necessários, como qualquer outro elemento submetido da mesma forma a procedimentos onde não estejam sendo utilizados para fins de pesquisa.

Também fui informado de que posso recusar a participação do meu animal no estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que recebendo o meu animal.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são: **mestranda Juliane Possebom de Oliveira, mestrandia Márcia Elizabeth Keim Magheli Lima, Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias, Prof. Dr. Victor Cunha do Espírito Santo**, e com poderei manter contato pelo telefone **(41) 9917-0047**.

É assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas conseqüências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da participação da pesquisa com o meu animal.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em permitir a participação do mesmo, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação do meu animal.

Curitiba, ____ de _____ de 20__

Nome e assinatura do proprietário do animal da pesquisa

Nome(s) e assinatura(s) do(s) pesquisador(es) responsável(Responsáveis)

APÊNDICE B

FICHA CLÍNICA PARA SELEÇÃO PROJETO MESTRADO GRUPO DE ESTUDO

Nome: () M () F () castrado () íntegro

Raça: Idade/Nasc:

Responsável: CPF:

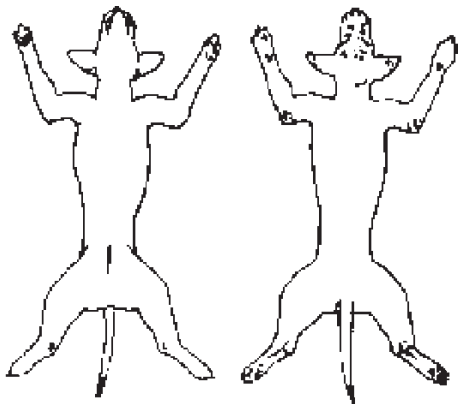
Tel: () Local: () RJ () PR

1) Favrot:

- () início dos sintomas com < 3 anos de idade
- () intradomiciliado
- () melhora com corticóide
- () prurido primário
- () interdígitos torácicos acometidos
- () condutos auditivos acometidos
- () pinas não acometidas
- () dorsolombar não acometida

2) Piodermite: () Sim () Não

3) Lesão de pele: Descrever



Ventral

Dorsal

4) Presença de ectoparasitas? () Não () Sim, qual?

5) Controle de ectoparasitos: () Sim () Não () 15 dias () 30 dias

Qual produto utilizado?

6) Estro, gestação, lactação: () ausentes

7) irritantes:

- onde dorme: () cama de tecido () acesso a sofá e cama () embaixo da cama
() outros:

- ambiente: () piso liso () carpete, tapete felpudo () piso madeira
() outros:

- limpeza semanal: () lavagem () aspirador de pó () hipoclorito de sódio diluído () quaternário de amônio diluído () outros:

8) hidratação da pele:

- banho com () Dermogen () Allercalm () outros:
() q 3ds () q 7ds ()

- hidratante () Hidrapet () Humilac () Allerderm () outro:
() Sid () q 2ds () q 7ds () não realiza

9) Dieta de exclusão de DAIA com:

() dieta comercial, qual?

() dieta caseira, qual?

10) Última administração de medicações:

- corticoide sistêmico- () > 3 semanas

- anti-histamínico sistêmico- () > 2 semanas

- corticóide tópico- () > 3 semanas

11) Animal adpto para teste intradérmico? () Sim () Não

12) Teste intradérmico: início ____:____h

a) Controle positivo - + =/2 =mm

b) Controle negativo - + =/2 =mm

Cut off: Cp + Cn/2 =

c) *Dp* - + =/2 =mm +() -()

d) *Df* - + =/2 =mm +() -()

e) *Bt* - + =/2 =mm +() -()

leitura dos controles – 15 minutos – h

leitura dos alérgenos- 20 minutos - h

...../...../14

Mestranda Juliane Possebom de Oliveira
Médica Veterinária
CRMV-PR 9880

FICHA CLÍNICA PARA SELEÇÃO PROJETO MESTRADO GRUPO CONTROLE

Nome: () M () F () castrado () íntegro

Raça: Idade/Nasc:

Responsável: CPF:

Tel: () Local: () RJ () PR

1) intradomiciliado: () sim

2) animal hígado: () sim

3) sinais de doença tegumentar: () ausentes

4) doença sistêmica ou imunocomprometedora: () não

5) Última administração de medicações:

- corticoide sistêmico- () > 8 semanas () > 12 semanas

- anti-histamínico sistêmico- () > 2 semanas

- corticosteróides tópico- () > 3 semanas

6) Estro, gestação, lactação: () ausentes

7) Teste intradérmico:

a) Controle positivo - + =/2 =mm

b) Controle negativo - + =/2 =mm

Cut off: Cp + Cn/2 =

c) *Dp* - + =/2 =mm +() -()

d) *Df* - + =/2 =mm +() -()

e) *Bt* - + =/2 =mm +() -()

leitura dos controles – 15 minutos – h

leitura dos alérgenos- 20 minutos - h

...../...../14

Mestranda Juliane Possebom de Oliveira

Médica Veterinária

CRMV-PR 9880

ANEXOS

ANEXO A



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 12 de Dezembro de 2013.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 862 – 1ª Versão

TÍTULO DO PROJETO: Identificação sorológica de alérgenos de ácaros da poeira domiciliar associados à sensibilização de cães com dermatite atópica

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marconi Rodrigue de Farias

EQUIPE DE PESQUISA: Marconi Rodrigue de Farias, Victor Cunha do Espírito Santo, Juliane Possebon.

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária / Mestrado

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
<i>Canis Familiaris</i>	M/F	Indefinido	B	60

O colegiado do CEUA em reunião no dia 12/12/2013, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer:

APROVADO.

PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR 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 iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. 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 este CEUA em qualquer tempo.

Lembramos ao pesquisador que é obrigatório encaminhar o relatório anual parcial e relatório final da pesquisa a este CEUA.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Marta Luciane Fischer

Coordenadora

Comitê de Ética no Uso de Animais.

