

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA SOROPREVALÊNCIA AOS ALÉRGENOS Der f 2
e Zen 1 DO ÁCARO *Dermatophagoides farinae* EM CÃES COM
DERMATITE ATÓPICA**

ANA PAULA DI MARTINO FREZZA

Botucatu – SP

2018

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA SOROPREVALÊNCIA AOS ALÉRGENOS Der f 2
e Zen 1 DO ÁCARO *Dermatophagoides farinae* EM CÃES COM
DERMATITE ATÓPICA**

ANA PAULA DI MARTINO FREZZA

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, junto ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Frezza, Ana Paula Di Martino.

Avaliação da soroprevalência aos alérgenos Der f 2 e Zen 1 do ácaro domiciliar (*Dermatophagoides farinae*) ao teste sorológico em animais atópicos / Ana Paula Di Martino Frezza.
- Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado

Capes: 50501062

1. Cães - Doenças. 2. Dermatite atópica. 3. Alérgenos. 4. *Dermatophagoides farinae*. 5. Estudos soropidemiológicos.

Palavras-chave: Der f 2; Dermatite atópica canina; *Dermatophagoides farinae* ; Soroprevalência; Zen 1.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado - Orientador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) - UNESP, Botucatu, SP.

Prof. Dr. Adjunto Marconi Rodrigues de Farias - Membro titular

Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC), Londrina, PR.

Prof. Dr. Antônio Carlos Paes - Membro titular

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) - UNESP, Botucatu, SP.

Profa. Dra. Ana Claudia Balda - Membro suplente

Faculdades Unidas Metropolitanas (FMU), São Paulo, SP.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Fonseca Alves - Membro Suplente

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) - UNESP, Botucatu, SP.

*No mesmo instante em que
estamos recebendo pedras em
nosso caminho, flores estão
sendo plantadas mais longe.
Quem desiste não as vê.*

(William Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, à Força Criadora do Universo que tudo faz por nós, basta aprender a observar as pequenas dádivas da vida, a começar pelo ar que respiramos até o poder que é colocado em nossas mãos para escolhermos o caminho a trilhar em nossas vidas.

Agradeço aos meus filhos amados Matheus Di Martino Frezza e Bárbara Di Martino Frezza, por terem se tornado seres humanos tão repletos de amor, carinho e compreensão para comigo em todos os momentos da minha vida.

Agradeço eternamente ao meu Orientador Professor Doutor Luiz Henrique de Araújo Machado, o qual sempre foi para mim uma fonte de inspiração através de suas aulas, e um exemplo de ser humano empático a ser seguido e que me deu a oportunidade, a qual jamais esquecerei, de ingressar na vida acadêmica mesmo após vários anos de formação e atividade prática na clínica veterinária. Sem a confiança em mim depositada, a realização do meu Sonho em me tornar uma multiplicadora de conhecimento, podendo de alguma forma contribuir para a formação de novos profissionais, não teria sido possível.

Agradeço aos meus professores queridos Maria Lúcia Gomes Lourenço e Antônio Carlos Paes que participaram da minha banca de qualificação, e através de seus comentários e observações contribuíram para a conclusão da minha dissertação.

Agradeço ao professor Doutor Antônio Carlos Paes, que para mim sempre foi um motivo de orgulho e admiração eterna pelo seu saber e capacidade ímpar de ensinar sempre e com muito amor, e por ter feito parte de minha formação acadêmica e agora por ter me dado a honra de estar presente também nessa nova etapa de minha vida na pós-graduação.

Agradeço ao Professor Doutor Marconi Rodrigues de Faria por ter aceitado o convite para fazer parte da minha banca de defesa do Mestrado e por ser um dissipador de conhecimento contagiante através de seu carisma e entusiasmo em cada aula ministrada ao longo de sua carreira, buscando sempre e incansavelmente ensinar a todos cada vez melhor.

Agradeço especialmente também a uma pessoa ímpar que conheci ao longo dessa jornada e que muitas vezes segurou minhas mãos quando não conseguia caminhar sozinha, nunca poupando seu tempo e sua paciência comigo, dotada de uma inteligência inigualável e que me acompanhou em muitos momentos, e muito me ajudou mesmo atuando em área distinta da minha, pois ela é pós-doutoranda em ciências biológicas, Karen Ingrid Tasca, guarde sempre em seu coração o meu agradecimento.

Agradeço às minhas amigas, companheiras, veterinárias e também apaixonadas pela dermatologia que me acompanharam ao longo desse caminho, Camila Rodrigues Faria de Oliveira, Juliana Caltabelota e Alana Lucena de Oliveira, meu sincero e profundo muito obrigado.

Agradeço pelo grande Amor que sempre senti pelos animais desde a minha infância e que me motivou a escolher a medicina veterinária como profissão e pela qual sou eternamente apaixonada.

Por fim, agradeço a cada animal que fez parte desta pesquisa.

LISTAS

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Escala CADESI-445

Quadro 2: Critérios de Favrot (2010)46

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Causas multifatoriais da dermatite atópica	30
Figura 2: Mecanismos efetores na reação de hipersensibilidade do tipo I	35
Figura 3: <i>Dermatophagoides farinae</i>	37
Figura 4: Sinais clínicos da dermatite atópica	43
Figura 5: Localização dos municípios dos 85 animais incluídos no estudo.....	64
Figura 6: Princípio da técnica de ELISA indireto, utilizado no estudo.....	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Distribuição das raças dos animais incluídos no estudo	70
Gráfico 2: Porcentagem da distribuição de idade de aparecimento dos sintomas da dermatite atópica nos 85 animais incluídos no estudo	71
Gráfico 3: Distribuição da soropositividade aos alérgenos Der f 2, Zen 1 e DF no soro de 81 animais com DA incluídos no estudo	72
Gráfico 4: Densidades ópticas de níveis de IgE	72
Gráfico 5. Correlação das densidades ópticas de Ig E	75

LISTA DE ABREVIACÕES

APC: *Antigen-Presenting Cell*

APA: Ácaros de Produtos Armazenados

APD: Ácaros da Poeira Doméstica

ASIT: *Allergen Specific Immunotherapy*

CADESI 4: *Validation of the canine atopic dermatitis extend and severity index 4*

CRD : Com Raça Definida

DA: Dermatite Atópica

DAC: Dermatite Atópica Canina

DAP: Dermatite Alérgica a Picada de Pulga

DAPE: Dermatite Alérgia à picada de Ectoparasitas

Der f : *Dermatophagoides farinae*

Der p : *Dermatophagoides pteronyssimus*

DF: *Dermatophagoides farinae* (ácaro todo)

DO: Densidade Óptica

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FHN: Fator de Hidratação Natural

GM-CSF: Fator Estimulante de Colônias de Granulócitos

HRP: *Horseradish peroxidase*

IFN: *Interferon*

IL: Interleucina

RAST: *Radiallergosorbent Test*

SCIT: *Sub Cutaneous Immunotherapy*

SLIT: *Sub Lingual Immunotherapy*

T reg: Linfócitos T Regulatórios

Th: *T helper*

TID : Teste Intradérmico

TMB: Tetramethylbenzidine

TNF: Fator de Necrose Tumoral

TSLP: Tymic Stromal Lynphopoetin

URA : Umidade Relativa do Ar

VARL: Veterinary Allergen Reference Lab

SUMÁRIO

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE QUADROS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE GRÁFICOS

LISTA DE ABREVIACÕES

1) INTRODUÇÃO	23
2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
2.1. Aspectos gerais da dermatite atópica	28
2.1.1. Fatores genéticos envolvidos na DAC	
2.1.2. Fatores imunopatogênicos envolvidos na DAC	
2.1.3. Fatores ambientais envolvidos na DAC	
2.2. Manifestações clínicas da DAC	42
2.3. Diagnóstico da DAC	46
2.3.1. Testes sorológicos	
2.4. Tratamento da DA.....	49
2.4.1. Redução da exposição aos alérgenos	
2.4.2. Reposição da barreira epidérmica	
2.4.3. Controle de infecções secundárias por bactérias e leveduras	
2.4.4. Redução do prurido com o uso de agentes farmacológicos tópicos ou sistêmicos	
2.4.5. Imunoterapia alérgeno específica: <i>Allergy Specific Immunotherapy</i> (ASIT)	
2.4.5.1. Seleção dos alérgenos	

2.4.5.2. Vias de administração: Sub cutaneous Immunotherapy (SCIT) e Sub lingual Immunotherapy (SLIT)

2.4.5.3. Protocolos da ASIT para uso da via Subcutânea (SCIT)

2.5. Justificativa	59
3) OBJETIVO	62
3.1. Objetivo geral	
3.2. Objetivos específicos	
4) MATERIAL E MÉTODOS.....	64
4.1. Casuística, Local do Estudo e Características Ambientais	64
4.2. Critérios de Inclusão	65
4.3. Critérios de exclusão	65
4.4. Obtenção do Material Biológico	66
4.5. Procedimento Laboratorial	66
4.6. Análise dos Resultados	67
4.7. Questões Éticas	68
5) RESULTADOS.....	70
5.1. Características dos Animais	70
5.2. Níveis de IgE das Amostras de Soro	71
5.2. Correlação das densidades ópticas de IgE dos alérgenos	73
6) DISCUSSÃO	76
7) CONCLUSÃO	82
8) BIBLIOGRAFIA.....	84
9) TRABALHO CIENTÍFICO.....	109
10) ANEXOS	131

RESUMO

FREZZA, A.P.M. Avaliação da soroprevalência aos alérgenos Der f 2 e Zen 1 do ácaro *Dermatophagoides farinae* em cães com dermatite atópica. Botucatu, 2018. 12136p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

A dermatite atópica (DA) é uma doença crônica, inflamatória e pruriginosa da pele resultante da perda de barreira epidérmica, sensibilização e produção exacerbada de anticorpos IgE, direcionados, principalmente, contra alérgenos ambientais, mormente aos ácaros da poeira doméstica. Estudos com alérgenos dos ácaros da poeira doméstica são necessários para aprimoramento de testes sorológicos e intradérmicos e para confeccionar imunoterapia alérgeno específica com alta eficácia. O objetivo deste estudo foi avaliar a soroprevalência aos alérgenos Der f 2, Zen 1 e corpo do ácaro *Dermatophagoides farinae* em cães com DA do estado de São Paulo, Brasil. Foi utilizado o soro de 85 cães, os quais foram submetidos ao teste sorológico ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) indireto para detecção de IgE alérgeno-específica para os alérgenos estudados. A soropositividade foi observada em 96% dos animais para Der f 2, 91% para Zen 1 e 96% para o corpo do ácaro. Devido à esta alta prevalência encontrada, sugerimos que Der f 2 e Zen 1 podem ser considerados alérgenos maiores para cães no estado de São Paulo.

Palavras-chave: Alergia, ELISA, *Dermatophagoides farinae*, canino, soroprevalência.

ABSTRACT

FREZZA, A.P.M. Evaluation of seroprevalence to Der f 2 and Zen 1 allergens of the mite *Dermatophagoides farinae* in dogs with atopic dermatitis. Botucatu, 2018. 12136p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is a chronic, inflammatory and pruritic disease of the skin resulting from the loss of epidermal barrier, sensitization and exacerbated production of IgE antibodies, mainly directed against environmental allergens, especially to house dust mite. Studies with house dust mite allergens are required, aiming at the improvement of both serological and intradermal tests, in order to make specific allergen immunotherapy with high efficacy. The objective of this study was to evaluate the seroprevalence of Der f 2, Zen 1 and body of the *Dermatophagoides farinae* allergens in dogs with AD from the State of São Paulo, Brazil. Serum of 85 dogs were used, which were submitted to indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of allergen-specific IgE for the allergens studied. Serum of 85 dogs were used, which were using the indirect ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) for the detection of allergen-specific IgE. Seropositivity was observed in 96% of the animals for Der f 2, 91% for Zen 1 and 96% for body of the mite. Due to this high prevalence, we suggest that Der f 2 and Zen 1 can be considered as major allergens dogs in the state of São Paulo.

Keywords: Allergy, ELISA, *D. farinae*, canine, seroprevalence.

INTRODUÇÃO

1) INTRODUÇÃO

A dermatite atópica canina (DAC) é uma doença inflamatória crônica e pruriginosa que tem apresentado um evidente aumento no número de caso nas últimas três décadas (OLIVRY & HILL, 2001; MARSELLA & SOUSA, 2001; HILLIER & GRIFFIN, 2001; TAY et al., 2002; GONZALEZ et al., 2016). Ela representa, aproximadamente, 20% dos casos dermatológicos atendidos (CARLOTTI, 2012) e ocupa o segundo lugar entre todas as causas de prurido em cães, sendo que a primeira é a alergia à picada de pulgas (REEDY; MILLER; WILLEMSE, 1997; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

O desenvolvimento da DAC é caracterizado por uma disfunção da barreira epidérmica (CHERVET et al., 2010), sendo que os queratinócitos desempenham um papel fundamental na manutenção do prurido e das lesões da DAC, através da liberação de várias citocinas e quimiocinas, dentre elas a TSLP (*Thymic Stromal Lymphopoietin*), resultando na quimiotaxia de células do perfil Th2 (*T helper 2*), com a intensa produção de interleucina 4 (IL-4) (KAKINUMA et al., 2001). Cabe salientar que o aumento abrupto de IL-31, também considerada citocina do perfil Th2, induz prurido grave, seguido da ação do auto trauma pelo ato de coçar, o que agrava ainda mais a deficiência da barreira (RAAP et al., 2012).

Esta resposta imunológica predominantemente do tipo Th2 ocorre nas fases aguda e crônica da doença, sendo que o perfil Th1 também está envolvido, conforme a doença evolui. As principais reações envolvidas neste desequilíbrio imunológico são as hipersensibilidades do tipo I (imediate) e, possivelmente, do tipo IV (tardia). No entanto, além da participação da resposta imune celular, há prevalência da resposta imune humoral, (HOWELL et al., 2007; MRABET-DAHBI & MAURER, 2010; GUTOWSKA-

OWSIAK et al., 2012; WANG & LANDÉN, 2015) com o envolvimento, principalmente, de elevados níveis séricos de imunoglobulina E (IgE) e ativação de mediadores inflamatórios (LEUNG, 2000). A IgE é produzida mediante ao estímulo de IL-4, no entanto, recentemente identificou-se um subtipo de atopia chamada “intrínseca” ou “não-alérgica”, na qual não há detecção da resposta à IgE apesar da presença de sinais clínicos típicos aparentes de DAC (MARSELLA, 2006).

Levando em consideração as causas multifatoriais envolvidas no surgimento da DAC, além da influência dos fatores imunopatogênicos comentados acima, os fatores genéticos e ambientais também se relacionam ao seu aparecimento e gravidade. Quanto à predisposição genética e a herdabilidade na DAC, a partir das observações clínicas, considera-se que a maior frequência da doença ocorre em certas raças, tais como: West Highland White Terrier, Shih tzu, Lhasa Apso, Pug, Labrador, Scotch Terrier, Dálmata, Setter Irlandês, Golden Retriever, Schnauzer miniatura (SCOTT; MULLER; GRIFFIN, 1996). Com relação ao início dos sinais clínicos, 70% dos animais desenvolvem a doença entre um a três anos (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996; WHITE, 1998).

Quanto aos fatores ambientais envolvidos, destaca-se a alta exposição dos cães aos ácaros da poeira doméstica (APD), principalmente pela maior permanência desses animais “in door” (FRICK & BROOKS, 1983), sendo que há interferência das condições ambientais, pois a temperatura e umidade estão diretamente associadas ao desenvolvimento da APD (EZEQUIEL et al., 2001). Esta é a principal fonte dos alérgenos, que são classificados em “principais” ou “maiores” quando reconhecidos por mais de 50% dos pacientes alérgicos à espécie em questão e, “secundários” ou “menores” quando são reconhecidos por menos de 50 % deles (THOMAS et al., 1998).

Em países ocidentais, o *Dermatophagoides farinae* (Der f) está relacionado a mais de 70% dos casos identificados de DAC (WEBER et al., 2003). Até o momento, no que

concerne o padrão de sensibilização de cães atópicos no Brasil, os alérgenos maiores de *D. farinae* para cães são Der f 15 (98-109 kDa) e Der f 18 (60 kDa) (McCALL et al., 2001; NUTTALL; LAMB; HILL, 2001; WEBER, 2003) e os menores, Der f 2 (14 kDa) e Der f 1 (25 kDa) (OKAMURA et al., 1999; MADHURANTAKAM et al., 2010). Atualmente, outro alérgeno de Der f com alto peso molecular (188 kDa) também é conhecido, o Zen 1, cuja características ainda são pouco estudadas, porém sabe-se que ele pode apresentar reatividade cruzada com Der f 15 (DEBOER & HILLIER, 2001; McCALL et al., 2001; TSUKUI et al., 2007).

A DAC se manifesta de várias formas, de acordo com o estágio agudo ou crônico da doença, presença de infecções secundárias e extensão das lesões (localizadas *versus* generalizada). As lesões consistem inicialmente em eritema, hipotricose, alopecia, escoriação, evoluindo para hiperqueratose e até hiperpigmentação (liquenificação) (WHITE, 1998; GRIFFIN & DEBOER 2001; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001) sendo que o prurido, sinal cardeal da DAC, pode ser perene ou sazonal dependendo dos alérgenos envolvidos (ZUR; IHRKE; WHITE, 2002). A otite externa, eritema e prurido do pavilhão auricular ocorrem em 86% dos animais atópicos, às vezes sendo o único sinal clínico presente (GRIFFIN & DEBOER, 2001). Já a piodermite estafilocócica acomete cerca de 70% dos animais (HILLIER, 2002) e a pele inflamada também favorece a proliferação de *Malassezia sp.* (HALLIWELL, 2000).

O diagnóstico da DAC é obtido a partir de dados da anamnese, exame físico e avaliação clínica fundamentada nos critérios estabelecidos por Favrot et al. (2010), após descartar outras dermatoses pruriginosas. (SCOTT; MILLER; GRIFFIN et al., 2001). Ela não deve ser diagnosticada através de testes alérgicos *in vitro* (sorológicos) ou *in vivo* (teste intradérmico, TID), pois tais testes são úteis apenas após a conclusão do diagnóstico de DAC, com o intuito de selecionar alérgenos para a realização da imunoterapia alérgeno

específica (MARSELLA, 2006; OLIVRY et al., 2010a). Entre os testes sorológicos para detecção de IgE alérgeno específica no soro de um animal estão o RAST (radiollergosorbent test), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) e o VARL (veterinary allergen reference lab).

O tratamento da DAC é multimodal e deve ser individualizado para cada paciente, dependendo do estágio da doença, de sua severidade e da distribuição das lesões (OLIVRY et al., 2010a). No entanto, a única modalidade terapêutica capaz de alterar o curso da doença a longo prazo é a imunoterapia alérgeno específica (ASIT) (GRIFFIN & HILLIER, 1998), onde os extratos alergênicos a serem utilizados na confecção das vacinas são selecionados através de testes no animal atópico, como o sorológico ou TID (CARLOTTI, 2004; DEBOER, 2008).

REVISÃO
BIBLIOGRÁFICA

2) REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Aspectos gerais da dermatite atópica

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória crônica e pruriginosa comum da pele que pode apresentar episódios recorrentes quando há exposição aos alérgenos, sendo que ela tem apresentado um evidente aumento no número de casos nas últimas três décadas (OLIVRY; HILL, 2001; MARSELLA, 2006 ; DECKERS et al., 2012; ANDERSEN; THYSSEN; MAIBACH, 2016; GONZALEZ et al., 2016).

A prevalência de DA em crianças é de cerca de 10% - 20%, e em adultos ela é inferior a 10% (ODHIAMBO et al., 2009; DRAAISMA et al., 2015). As mais altas prevalências se encontram em países desenvolvidos como aqueles na Europa Ocidental, enquanto as mais baixas são encontradas em países especializados em agricultura, incluindo China e Europa Oriental, África rural e Ásia Central (ODHIAMBO et al., 2009), sendo que esta tendência é consistente com a hipótese de higiene (TAY et al., 2002).

Existem muitas semelhanças entre DA em humanos e em cães (DAC), tanto em relação à clínica quanto à imunopatogenia e terapias (MARSELLA & SAMUELSON, 2009). Sabe-se que, em cães, a DAC também é uma doença crônica e muito recorrente e uma das mais comuns e instigantes doenças de pele diagnosticadas por dermatologistas veterinários e clínicos gerais, sendo que ela representa aproximadamente 20% dos casos dermatológicos atendidos (OLIVRY et al., 2010, CARLOTTI, 2012).

Em regiões onde pulgas não representam um problema significativo, a DAC provavelmente é a doença alérgica mais comum em cães e gatos. Estudos sugerem, inclusive, que esta doença ocupa o segundo lugar entre todas as causas de prurido em cães, sendo que a primeira é a alergia à saliva de pulgas. Esses dados variam de acordo

com o delineamento do estudo, região geográfica e o tipo de profissional que realiza o atendimento do animal, seja um especialista ou um clínico geral (HILLIER, 2008). Entre a população canina, as estimativas de morbidade oscilam entre 10 a 20% (LARSSON & LUCAS, 2015). No entanto, surpreendentemente, nenhum desses números baseia-se em dados epidemiológicos confiáveis e, por isso, a real prevalência e incidência de DAC permanecem desconhecidas. Além disso, esta doença de caráter crônico e incurável, afeta muito a qualidade de vida dos animais e de seus tutores, sendo este outro motivo que ressalta a importância de mais estudos sobre a DAC (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

Quanto à etiopatogenia da DAC, há duas vertentes que são discutidas e que, de forma combinada, provavelmente, sejam as responsáveis pelo desenvolvimento da doença na maioria dos pacientes (CORK et al., 2006; KANTOR & SILVERBERG, 2017). A primeira vertente é a que a DAC se desenvolve por uma disfunção de barreira epidérmica (CHERVET et al., 2010). Tal distúrbio pode estar relacionado tanto à ocorrência de alteração na produção e extrusão das ceramidas na pele do cão com DA (MARSELLA & SARIDOMICHELAKIS, 2010), quanto a alterações na filagrina, resultantes de mutações genéticas (MARSELLA & SAMUELSON, 2009). A segunda discussão se baseia em uma alteração imunológica que desencadeia uma resposta imune predominantemente do tipo Th2 (T helper 2) (HOWELL et al., 2007) frente a alérgenos ambientais e alimentares (KANTOR & SILVERBERG, 2017).

Na verdade, apesar de muitos estudos, a patogênese da doença ainda não é totalmente conhecida, sendo sua etiologia multifatorial, onde há o envolvimento de vários tipos celulares, produção desregulada de interleucinas, elevados níveis séricos de IgE, e vários componentes que participam da ativação e manutenção da resposta inflamatória (LEUNG, 2000). Recentemente identificou-se um subtipo de dermatite atópica, chamada

“intrínseca” ou “não-alérgica”, na qual não há detecção da resposta a IgE apesar dos sinais clínicos típicos aparentes de DAC (MARSELLA, 2006). De qualquer forma, entre estas causas multifatoriais da DAC estão os fatores genéticos (WOOD et al., 2010), imunológicos (RAAP et al., 2012) e ambientais (FRICK & BROOKS, 1983), conforme mostra a Figura 1, e que serão discutidos junto à sua etiologia mais detalhadamente, nos tópicos seguintes.

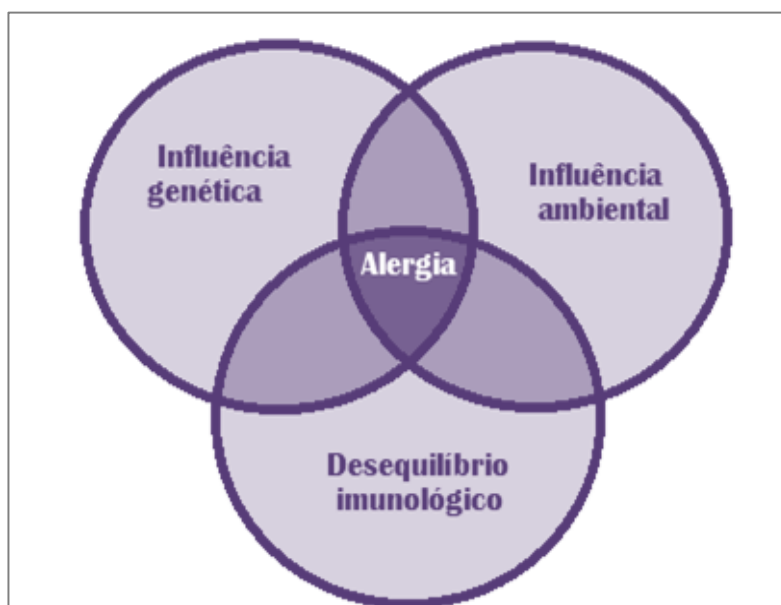


FIGURA 1. Causas multifatoriais da dermatite atópica.

Fonte: Day, 2014.

2.1.1. Fatores genéticos envolvidos na DA

O desenvolvimento da DA, tanto em cães quanto em humanos, parece estar associado a um distúrbio oligogênico ou poligênico (WOOD et al., 2010). Como grande parte dos genes relacionados à DA são hereditários, pacientes com história familiar de DA apresentam maior risco de desenvolver a doença. Além disso, há de se considerar, também, vários fatores desencadeantes e os diferentes cursos da doença, enfatizando assim a influência das diferenças interindividuais (DEBOER & HILLIER, 2001).

A fisiopatogenia da DA está associada com mutações que levam a uma alteração no final do processo de queratinização da epiderme com a posterior perda de função de barreira, sendo que estas mudanças levam a penetração de alérgenos ambientais, antígenos microbianos e irritantes primários, levando à uma intensificação nas respostas imunes inata e adaptativa (HILLIER, 2002; AKDIS et al., 2006; CORK et al., 2006; OLIVRY et al., 2010a).

Tanto na literatura humana quanto veterinária, a especulação sobre a predisposição genética e a herdabilidade da DA tem persistido. Considera-se que a morbidade em cães pode estar relacionada aos componentes genéticos devido à observação clínica de que a doença aparece mais frequentemente em certas raças. No entanto, a maioria desses estudos não conseguiu encontrar uma correlação entre a incidência da doença e a população dessas raças acometidas (MARSELLA & SARIDOMICHELAKIS, 2010). Entre algumas das raças mais predispostas ao seu desenvolvimento, estão: West Highland White Terrier, Shih tzu, Lhasa Apso, Pug, Labrador, Scotch Terrier, Dálmata, Setter Irlandês, Golden Retriever, Schnauzer miniatura, Buldogue Inglês e Francês, dentre outras, além dos cães mestiços (WHITE, 1998). Já em relação à idade em que os sinais clínicos em cães podem surgir, há relatos entre os seis meses a sete anos, sendo que em cerca de 70% deles, tal acometimento ocorre entre um e

três anos de idade (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996). Nos últimos anos, as novas tecnologias de sequenciamento genético foram utilizadas nas pesquisas envolvendo DA (BIN & LEUNG, 2006). Entre os estudos descritos, 65 genes foram associados à DA, e a maioria deles estava relacionada à mutações genéticas da filagrina (ANTUNES et al., 2017). Por isso, é aceito que esta mutação também tenha associação com a manifestação precoce da DA em humanos, bem como o desenvolvimento da forma extrínseca alérgica e a manutenção da doença no adulto (WEIDINGER et al., 2006), o que tem enfatizado a importância da integridade epidérmica (SEHRA et al., 2008; CORK et al., 2009) para a dinâmica da sua evolução clínica.

Além da absorção via percutânea, há a via inalatória ou via oral nestes cães com predisposição genética ao desenvolvimento da DAC (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996, 2001; WHITE, 1998). Em relação à absorção percutânea, alguns autores inferem que há um aumento na penetração dos antígenos devido a uma disfunção da barreira lipídica da epiderme (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996). Isso ocorre por combinação deficiente de organelas lipídicas de superfície, existentes entre os espaços intercelulares, como é sugerido na dermatite atópica humana (OLIVRY & HILL, 2001b), onde há redução do conteúdo de ceramidas no estrato córneo, mormente suas subfrações 1 e 3 (CASTRO et al., 2006; KATAYAMA et al., 2017). Isto pode ser decorrente do aumento da atividade enzimática (glucosilceramida-esfingomielina deacilase, beta-glucocerebrosidase, e a esfingomielinase) ou ser consequente à redução da produção de ceramidas pelos queratinócitos do estrato granuloso (HON; LEUNG; BARANKIN, 2013), levando assim a uma mudança na composição química da barreira lipídica epidérmica e um aumento na perda de água via transepidérmica.

Por outro lado, a filagrina, uma proteína importante para a estrutura do envelope cornificado, é crucial para o alinhamento da queratina (VAN SMEDEN & BOUWSTRA,

2016) e seus metabólitos fazem parte do “fator de hidratação natural” (FHN), que é necessário para a hidratação do estrato córneo (OSAWA; AKIYAMA; SHIMIZU, 2011; VAN SMEDEN & BOUWSTRA, 2016).

Marsella (2006) relata que a deposição da lamina lipídica do estrato córneo na pele de cães com dermatite atópica é marcadamente heterogênea comparada com a pele de cães normais. Olivry *et al.* (2001) realizaram um trabalho por meio do qual compararam a pele de cães com dermatite atópica com a de cães normais, utilizando microscopia eletrônica, e demonstraram as diferenças estruturais dos lipídeos presentes no estrato córneo nestes dois grupos.

2.1.2. Fatores imunopatogênicos envolvidos na DA

A resposta imune da DA é classicamente humoral, porém, observa-se hipersensibilidade do tipo I e tipo IV. Um desequilíbrio do sistema imune adaptativo desempenha papel fundamental na patogênese da doença. Clinicamente, a pele não lesada de pacientes com DAC, apesar de "aparência saudável" exibe infiltração de células T CD4+, principalmente daquelas diferenciadas nos perfis Th2 e Th17, com a produção de mediadores inflamatórios responsáveis pela diminuição da diferenciação epidérmica de produtos gênicos, tais como filagrina, loricrina e corneodesmosina (MRABET-DAHBI & MAURER, 2010; GUTOWSKA-OWSIK et al., 2012; WANG & LANDÉN, 2015).

Os queratinócitos desempenham um papel fundamental na manutenção do prurido e das lesões da DAC, através da liberação de várias citocinas e quimiocinas, dentre elas a TSLP, que promove a migração das células de Langerhans para os linfonodos, estimula produção de IL-5, IL-13 e TNF- α pelos linfócitos T e resultam na quimiotaxia de células do tipo Th2 (KAKINUMA et al., 2001), além de o TSLP ser uma citocina pruritogênica.

Na fase inicial ou aguda da dermatite atópica, na qual há a presença de prurido alérgico, existe interação da IL-17 e IL-22, que são produzidas pela população celular pró-inflamatória, a Th17. As células Th17 são responsáveis, também, por modular a expressão de Th2 e, conseqüentemente, afetar a barreira cutânea, podendo ser considerada uma potencializadora do desenvolvimento da DA (SOUWER et al., 2010; HEO et al., 2015).

A IL-4, citocina típica do perfil Th2, promove a produção de IgE, a qual pode se ligar a receptores de alta afinidade (FcεRI) presente nos granulócitos (Figura 2), incluindo mastócitos e basófilos, provocando degranulação e liberação de vários mediadores inflamatórios pré formados, tais como histamina, heparina, serotonina, cininogenase, proteases neutras, fator quimiotático eosinofílico, fator quimiotático do neutrófilo, fator ativador das plaquetas e triptases (GORMAN, 1997; DEBOER, 2004).

Ocorre também a estimulação da cascata inflamatória do ácido araquidônico (WHITE, 1998; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2006; MURPHY, 2010), levando à formação de leucotrienos e prostaglandinas (GORMAN, 1997), o que aumenta a permeabilidade vascular e a contração da musculatura lisa (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2006; MURPHY, 2010). Esta combinação de mediadores inflamatórios neo formados e os derivados do ácido araquidônico resulta no desenvolvimento dos sinais de inflamação, como eritema, edema e prurido (WHITE, 1998).

Cabe salientar que o aumento abrupto de IL-31, também considerada citocina do perfil Th2, induz prurido grave, seguido da ação do auto trauma pelo ato de coçar, o que agrava ainda mais a deficiência da barreira (RAAP et al., 2012).

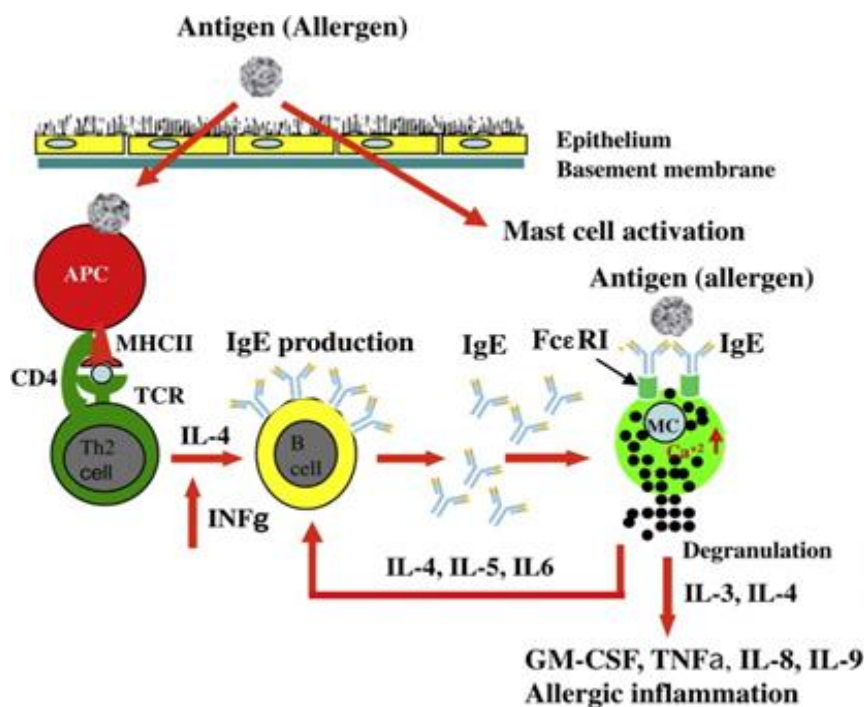


FIGURA 2. Mecanismos efetores na reação de hipersensibilidade do tipo I

Fonte: Adaptado de Amin, 2012.

Sabe-se que o desenvolvimento de um perfil de resposta Th1 ou Th2 é controlado pela produção relativa de IL-12 e IFN- γ (Th1) *versus* IL-4 e IL-10 (Th2) e, na DAC, devido ao predomínio de IL-12 no local da inflamação na fase crônica, ocorre o desvio da resposta para Th1 (WEDI; RAAP; KAPP, 1997). Nessa fase há o aumento de macrófagos, de interferon *gamma* (IFN- γ), IL-12, IL-5 e fator estimulante de colônias de granulócitos (GM-CSF). O IFN- γ está envolvido na manutenção da função barreira da pele, induz a expressão regulada de componentes responsáveis pela maturação e diferenciação de queratinócitos contribuindo, portanto, na regulação da função da barreira. No entanto, a produção exacerbada desta citocina promove o recrutamento de células inflamatórias e a perpetuação da resposta inflamatória na pele (LEUNG & BOGUNIEWICZ, 2003).

Em relação às manifestações histopatológicas da DA, que são típicas das que ocorrem em processos inflamatórios crônicos, é possível observar alterações

microscópicas caracterizadas como dermatite perivascular hiperplásica superficial, onde se apresenta uma hiperplasia difusa, que é o espessamento do estrato espinhoso pelo maior número de queratinócitos (OLIVRY & HILL, 2001b; ZACHARY & MCGAVIN, 2013; MULLER & KIRK, 2013). Na epiderme é comum haver aumento das células de Langerhans e infiltrado inflamatório composto predominantemente por células mononucleares, principalmente linfócitos. Vasos sanguíneos dilatados também podem ser observados na derme, sendo que a presença do edema é variável (GROSS et al., 2005; MULLER & KIRK, 2013).

2.1.3. Fatores ambientais envolvidos na DA

A maior exposição a alérgenos ambientais em associação com a poluição do ar, o fato de as pessoas permanecerem dentro de casa por longos períodos, o aumento da urbanização e a mudança de hábitos alimentares são alguns fatores que têm contribuído para o aumento da incidência da doença atópica no homem, principalmente rinite e asma e, como os cães compartilham o mesmo ambiente, esses fatores se estendem a eles. Os cães estão ficando a maior parte do tempo “in door”, o que aumenta muito a exposição deles aos ácaros da poeira doméstica (APD), além do fato de estarem sujeitos a esquemas de vacinação diversos (FRICK & BROOKS, 1983) e em constante contato com parasitocidas internos e externos. O uso indiscriminado de parasitocidas sugere que infestações por parasitas podem ter um efeito benéfico de proteção contra o surgimento de doenças alérgicas (HAGEL et al., 1993; LYNCH et al., 1993), entretanto essa hipótese tem sido bastante questionada (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009).

Entre os alérgenos ambientais envolvidos na DAC, estão os fungos anemófilos, pólenes de árvores, gramíneas e arbustos, penas, e poeira doméstica, que é uma complexa mistura de restos de fibras de tecidos, células de descamação de seres humanos e animais,

restos de insetos, pelos de animais, partículas alimentares, substâncias inorgânicas, além dos APD e ácaros de produtos armazenados, além de endotoxinas bacterianas (APA) (THOMPSON, 1997; WHITE, 1998; HILLIER & DEBOER, 2001; ALVES; AMANO; MARINO, 2002; HILLIER, 2002).

Os ácaros domiciliares são aracnídeos de vida livre, pertencem à ordem Astigmata (COLLOF M.J., 1992). O *D. farinae* (Figura 3), *D. pteronyssinus* e *Euroglyphus maynei* são pertencentes à família Pyroglyphidae, enquanto as espécies *Bloomia tropicalis*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae*, *Glycyphagus domesticus* são da família Glyciphagidae, o *Chortoglyphus arcuatus*, da família Chortoglyphidae e o *Acarus siro* da família Acaridae (ARLIAN; MARJORIE; NEAL, 2002). As principais fontes de alimento do *D. farinae* são bactérias e fungos, enquanto que o *D. pteronyssinus*, são as células de descamação humanas. (STURE et al., 1995; NOLI; BERNADINA; WILLEMSE, 1996; HILLIER; KWOCHKA; PINCHBECK, 2000; NUTTALL et al., 2006).



FIGURA 3. Ácaro da poeira doméstica *Dermatophagoides farinae*.

Fonte: Sciencesource, 2018.

Os ácaros domiciliares se utilizam de locais da habitação doméstica como: frestas de assoalho, rodapés, colchões, sofás, tapetes para realizarem nidificação e reprodução. As condições climáticas de umidade e temperatura são fatores limitantes ao seu desenvolvimento e crescimento. Altos níveis de umidade relativa do ar (URA) são

necessários para que não ocorra sua dessecação, pois eles perdem água através da cutícula (EZEQUIEL et al., 2001). Ácaros da poeira doméstica necessitam de URA entre 70 e 80% e temperatura ambiente em torno de 25°C a 30°C para se desenvolverem (ARLIAN, PLATTS-MILLS, 2001). Os ácaros dos produtos armazenados são encontrados em grãos e ração, farinhas e fenos e invadiram a poeira domiciliar, sendo que os mesmos se desenvolvem desde que a URA esteja em torno de 80% e temperatura entre 25 °C e 30°C. Portanto, o Brasil, um país tropical com temperatura média de 27 °C e URA ao redor de 70% apresenta estas condições que favorecem o desenvolvimento destes ácaros (BINOTTI et al., 2001). Vale ressaltar ainda, que o *D. farinae* é mais prevalente que o *D. pteronyssinus* em locais de clima seco, enquanto que em regiões úmidas, essa relação se inverte (ARLIAN; MARJORIE; NEAL, 2002).

No Brasil, algumas das principais espécies de APD encontradas na poeira domiciliar são: *Dermatophagoides pteronyssimus* (Der p, prevalência na poeira domiciliar de diferentes localidades variando de 3,7 a 89,3%); *Dermatophagoides farinae* (Der f, variando de 0,05 a 39,2%); *Euroglyphus maynei* (0,2 a 6,1%); *Tyrophagus putrescentiae* (0,2 a 10,5%); *Glyciphagus domesticus* (6,8 a 36,5%) e *Chortoglyphus arcuatus* (0,8 a 18,7%) (BINOTTI et al., 2001).

Os alérgenos dos ácaros são classificados em alérgenos principais ou “maiores”, quando são reconhecidos por mais de 50% dos pacientes alérgicos à espécie em questão e, alérgenos secundários ou “menores”, são aqueles reconhecidos por menos de 50 % deles (THOMAS et al., 1998). Os alérgenos dos ácaros *D. pteronyssimus* e *D. farinae* pertencentes ao grupo 1, com peso molecular de 25 kDa (Der p 1 e Der f 1), são representados por uma cisteína protease (MADHURANTAKAM et al., 2010), e os do grupo 2, de 14 kDa (Der p 2 e Der f 2), são representados por uma proteína epididimal,

também conhecida como proteína ligadora de colesterol NPC2 (OKAMURA et al., 1999) ou proteínas pertencentes ao grupo MD-2 (INOHARA & NUNES, 2002).

Estes alérgenos são todos presentes no material fecal dos ácaros (THOMAS, 2015; BATARD et al., 2016). Os alérgenos “maiores” em humanos são proteínas de baixo peso molecular (THOMAS et al., 1998) relacionadas a manifestações clínicas que envolvem o trato respiratório, como rinite e asma. Já em cães, os alérgenos “maiores”, são de alto peso molecular e, portanto, ficam em maior contato com as regiões corpóreas desses animais, desenvolvendo a dermatite atópica (NOLI; BERNARDINA; WILLEMSE, 1996; NUTTALL et al., 2002).

Os alérgenos de *D. farinae* responsáveis pela sensibilização em cães atópicos no Brasil correspondem ao Der f 15 (98-109 kDa) e Der f 18 (60 kDa). Eles são, portanto, considerados alérgenos “maiores” em cães, e são quitinases que se localizam no sistema digestório dos ácaros. (McCALL et al., 2001; WEBER, 2003; NUTTALL; LAMB; HILL, 2001). Der f 15 foi reconhecido por 85% dos soros de animais atópicos testados no estudo de McCall et al. (2001), sendo que 29% dos soros de cães com DAC reconheceram também o alérgeno Der f 10 (tropomiosina), considerado um alérgeno “menor”.

Até o momento, são conhecidos 28 alérgenos de Der f que estão mantidos no banco de dados do Subcomite da Nomenclatura da Alérgenos da Organização Mundial de saúde e União Internacional da Sociedade de Imunologia (WHO/IUIS, www.allergen.org). São nomeados Der f 1-4, 6-8, 10, 11, 13-18, 20-22 e 24-33. Um estudo no Japão com cães que apresentavam hipersensibilidade à ácaros revelou, ainda, a presença de um alérgeno de Der f, com alto peso molecular (188 kDa; média de 150-250 kDa), que foi denominado Zen 1 (TSUKUI et al., 2007). A descrição detalhada do alérgeno Zen 1 ainda é pouco conhecida, porém sabe-se que ele pode apresentar

reatividade cruzada com Der f 15, pois compartilham repetições ricas nos aminoácidos prolina e treonina (PTTPT) (OLIVRY et al., 2016).

Em países ocidentais, o *D. farinae* está relacionado a mais de 70% dos casos identificados de DAC (WEBER et al., 2003), sendo que, ao contrário do que ocorre em humanos. Os cães mostram baixa resposta positiva contra *D. pteronyssimus*, mesmo em locais onde este ácaro é mais prevalente que o *D. farinae* (JACKSON et al., 2005; NUTTALL et al., 2006; FARMAKI et al., 2012; FERNANDEZ-CALDAS, 2013).

Um estudo de Dévaki et al. (2017) demonstrou alta prevalência de Der p 1 no ambiente doméstico dos cães com dermatite atópica, principalmente no tapete, sofá e cama dos cães em Curitiba. Alérgenos da *Bloomia tropicalis*, também presentes na poeira doméstica, podem causar a sensibilização em indivíduos predispostos, sendo mais frequente em regiões de clima tropical e subtropical (CUNHA et al., 2012).

Algumas pesquisas mostraram que a concentração de 2 µg/grama de poeira do alérgeno de Der p ou Der f é necessária para induzir a sensibilização em pacientes geneticamente predispostos, enquanto que em pacientes normais a concentração necessária do alérgeno de poeira para induzir a sensibilização é de 50 µg/ grama de poeira (GELBER et al., 1993; PLATTS et al., 1997).

Ao contrário do que se observa na população de cães com DA, um estudo japonês mostrou reações positivas aos alérgenos dos grupos 1 e 2 de *D. farinae* (MATSUDA et al., 2010). Outro estudo foi realizado com cães com DA sensíveis ao Der f da Europa Ocidental (França e Suíça) e Estados Unidos, onde foi avaliada a presença de IgE contra Der f 1, Der f 2 e Zen 1 (OLIVRY, et al., 2017), constatando que Zen 1 é um alérgeno maior para cães atópicos reativos a Der f nestes locais, enquanto que Der f 1 e Der f 2 são, de fato, alérgenos menores para cães com hipersensibilidade a este ácaro. Estes resultados corroboram com outros estudos anteriores realizados em cães com DA da

Europa e Estados Unidos, testando tanto alérgenos purificados dos grupos 1 e 2 ou extratos do corpo do ácaro (NOLI; BERNADINA; WILLEMSE, 1996; NUTTALL; LAMB; HILL, 2001; SCHUMANN et al., 2001).

A ocorrência de reatividade cruzada entre os ácaros é suspeitada quando ocorrem sensibilidades simultâneas a vários ácaros nos testes sorológicos e ou intradérmicos (SIDENIUS et al., 2001). Em humanos, foi observada uma forte reatividade cruzada entre os ácaros de produtos armazenados *Lepidoglyphus destructor* e *T. putrescentiae* (TEE, 1994), além de reatividade entre os grupos 1 e 2 de *D. farinae* e *D. pteronyssimus*, a qual também foi observada em cães (DEBOER & HILLIER, 2001). As reações cruzadas também podem ocorrer entre *Bloomia tropicalis* e entre APD e APA, ou ainda, entre os grupos de ácaros de armazenamento (ARLIAN et al., 2003). Contudo, Manolis et al. (2008) observaram que *D. farinae* pode produzir resultados falso positivos para *Acarus siro*, *Tyrophagus putrescentiae* e *D. pteronyssimus*, mas o inverso não ocorre (MANOLIS et al., 2008). Além disso, estudos mostraram que *Acarus siro* inibe *Tyrophagus putrescentiae*, sendo que o inverso também ocorre e, portanto, há reatividade cruzada entre essas duas espécies de ácaros de armazenamento tanto na DA canina como humana (BRAVO et al., 1999; KRONQVIST et al., 2000; SIDENIUS et al., 2001). As sequências dos aminoácidos dos alérgenos de *D. pteronyssimus* e *D. farinae* usualmente tem 80-85% de sequência idêntica, fazendo assim reação cruzada entre eles (YASUEDA, 1989).

A sensibilização a alérgenos de pólenes (gramíneas, árvores e arbustos) é sazonal e é também reportada em vários estudos. Pólenes podem ser importantes fontes alergênicas para manifestação de asma sazonal, afetando sujeitos que são sensibilizados somente aos pólenes (GALAN et al., 2010). Como ocorre em humanos, tem sido observado em cães um aumento de 14,4% (1999 e 2002) para 27,7% (2007 a 2010) no número de animais sensibilizados a pólenes de gramíneas. Masuda et al. (2000), testou 42 cães japoneses pelo

TID, observando que o extrato do pólen do cedro japonês (*cryptomeria japonica*) foi o segundo maior alérgeno. Além disso, outros trabalhos mostraram que a sensibilização aos pólenes esteve relacionada à conjuntivite em 21% dos cães, mas sem associação com asma. Os sinais respiratórios de doença alérgica como rinite e asma são menos frequentes em cães do que humanos. Em pacientes humanos a rinite é a mais frequente manifestação de polinose, às vezes associada à conjuntivite (FAVROT et al., 2010; FURIANI et al., 2011).

2.2. Manifestações clínicas da DAC

A DA se manifesta com maior frequência em determinadas raças de animais e sofre variações segundo a localização geográfica. A diversidade da apresentação clínica está relacionada com os estágios agudo ou crônico da doença, presença de infecções secundárias e extensão das lesões (localizadas *versus* generalizada). Como já discutido anteriormente, a maioria dos cães afetados apresenta o início dos sintomas entre um e três anos de idade (SCOTT; MILLER; GRIEFFIN, 2001), sendo a idade média de ocorrência de 18 meses, com variação entre dois e 96 meses (ZUR; IHRKE; WHITE, 2002). Raramente os sintomas se iniciam antes de seis meses ou após o sétimo ano de vida e não é observada predisposição por gênero (GROSS et al., 2005).

O prurido, sinal cardinal da DA, dependendo dos alérgenos envolvidos pode ser perene ou sazonal, sendo que o primeiro está relacionada à sensibilização aos ácaros da poeira doméstica ou alimento e, a segunda, é desencadeada por alérgenos de pólenes (ZUR; IHRKE; WHITE, 2002). Pode haver períodos de melhoria no caso do animal ser afastado do local onde os alérgenos são presentes, porém há recidiva quando o cão volta ao local de origem ou há nova exposição aos alérgenos aos quais é sensível e em geral cães com DA são polisensibilizados e o prurido é perene (DEBOER, 2008).

Nos casos em que a DA é induzida por alimentos, podem estar presentes sinais gastrintestinais, tais como flatulência, vômito, diarreia, tenesmo, bem como prurido perianal perene (PICCO et al., 2008; FAVROT et al., 2010).

O prurido no início da doença pode ser alesional ou localizado (GRIFFIN & DEBOER, 2001; BENSIGNOR et al., 2013), tornando-se generalizado com sua evolução da doença. Em extremidades distais ocorre em cerca de 75% dos casos e em 60% dos casos pode se localizar nos pavilhões auriculares (GROSS et al., 2005).

O prurido intenso é o sintoma predominante e a maioria das manifestações clínicas resulta de auto trauma. Os locais preferenciais da instalação do prurido são: a face, na região perilabial, as extremidades distais (região palmoplantar), face flexural dos carpos e anticubital; orelhas e região ventral, axilar e inguinal (GROSS et al., 2005; DEBOER, 2008), como exemplificado na Figura 4.

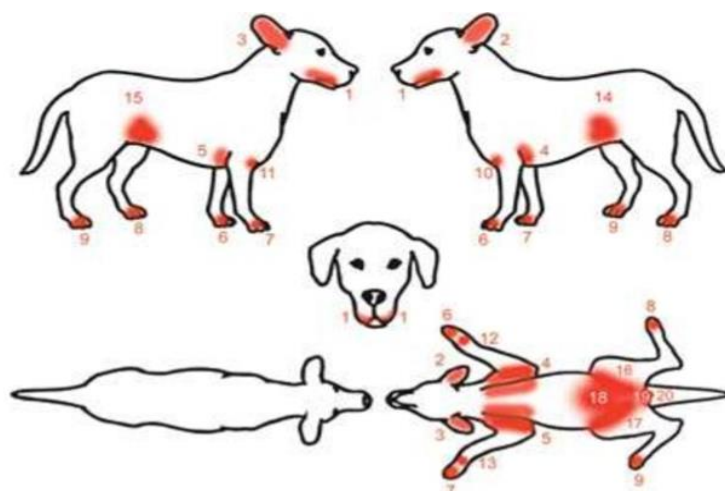


FIGURA 4. Sinais clínicos da dermatite atópica.

CADESI-4: validation of the canine atopic dermatitis extend and severity index.

Fonte: Olivry et al., 2014.

As lesões consistem inicialmente em eritema, pápulas eritomatosas e hipotricose, alopecia e escoriação auto induzida, evoluindo para liquenificação e ate hiperpigmentação ou melanose (nos casos crônicos). Devido à lambedura excessiva

ocorre a discromia do pelame que adquire uma coloração acastanhada (feotriquia). Como o prurido facial é bastante intenso, é comum a observação do animal esfregando a face em móveis, tapete e parede (WHITE, 1998; GRIFFIN & DEBOER 2001; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

A otite externa e o prurido do pavilhão auricular ocorrem em 86% dos animais com DA, as vezes sendo o único sinal clínico presente (GRIFFIN & DEBOER, 2001). Conjuntivite, epífora e blefaroespasmos podem ocorrer em 50% dos cães com DA (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996; GRIFFIN & DEBOER, 2001; OLIVRY & HILL, 2001b). Alguns animais com DA podem demonstrar também manifestações respiratórias associadas ou isoladas, como rinite e asma (GROSS et al., 2005; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996; OLIVRY & HILL, 2001a).

A piodermite estafilocócica acomete cerca de 70% dos cães com DA (HILLIER, 2002), na maioria dos casos é superficial, e as lesões se caracterizam por erupção pápulo pustular e colarinhos epidérmicos. Normalmente, mesmo após controle da infecção bacteriana, o prurido pode persistir. A pele inflamada também favorece a proliferação de *Malassezia ssp.*, o que agrava muito o prurido (HALLIWELL, 2000), ocorrendo preferencialmente em regiões intertriginosas (MENDELSON; ROSENKRANTZ; GRIFFIN, 2006; MILLER & GRIFFIN, 2013). Seborréia pode ocorrer em 12 a 23% dos cães com DA (GRIFFIN & DEBOER, 2001).

Para avaliação da gravidade da DA e extensão das lesões, bem como eficácia de tratamentos, utiliza-se uma escala validada hoje como CADESI-4 (validation of the canine atopic dermatitis extend and severity index) (Quadro 1) e escala analógica de prurido (pVAS).

QUADRO 1. Escala CADESI-4

CADESI-4

A escala de severidade das lesões é usada para graduar a resposta dos animais atópicos a tratamentos, e graduar a extensão das lesões e gravidade da DA.

As áreas corpóreas avaliadas são:

- I- Extremidades distais pélvicas
 - II- Margem côncava das orelhas
 - III- Extremidades distais torácicas
 - IV- Axila
 - V- Região perilabial
 - VI- Áreas flexurais
 - VII- Genitália ou parte ventral da cauda
 - VIII- Região lateral do flanco ou do tórax
 - IX- Cotovelo
 - X- Membros pélvicos
 - XI- Abdomen/região inguinal
- Totalizando 20 áreas corpóreas avaliadas.

As lesões avaliadas foram divididas em: eritema, liquenificação e alopecia / escoriação. Cada lesão recebe uma pontuação de 0 a 3, classificadas em:

0- sem lesão, 1- lesão branda, 2- lesão moderada e 3- lesão severa.

As lesões cutâneas são então avaliadas pelo profissional veterinário, que atribui valores específicos a cada região acometida. Em seguida é realizada a somatória dos valores determinados para cada região anatômica afetada, sendo então estabelecidos os escores :

Escore 1: DISCRETO :valores entre 10-34

Escore 2: MODERADO : valores entre 35-59

Escore 3: GRAVE : valores acima de 60

Cães normais ou com DA em remissão que obtenham valores menores que 10 pela somatória recebem o escore 0

CADESI: *validation of the canine atopic dermatitis extend and severity index.*

Fonte: Olivry et al., 2014.

2.3. Diagnóstico da DAC

O diagnóstico da DAC é obtido a partir de dados da anamnese, exame físico e avaliação clínica fundamentada nos critérios estabelecidos por Favrot et al. (2010), conforme explicitado no Quadro 2.

QUADRO 2. Critérios de Favrot (2010)

CRITÉRIOS DE FAVROT, 2010

- 1- Início dos sinais antes dos três anos de idade;
- 2- Cão vivendo a maior parte do tempo em ambientes internos;
- 3- Prurido responsivo a glicocorticoides;
- 4- Prurido alesional;
- 5- Lesões em extremidades distais dos membros torácicos;
- 6- Lesões na superfície côncava do pavilhão auricular;
- 7- Ausência de lesões nas margens das orelhas;
- 8- Ausência de lesões na região dorso lombar.

O diagnóstico mostra 85% de sensibilidade e 79% de especificidade para cães que cumprirem ao menos cinco dos oito critérios e 58% de sensibilidade e 89% de especificidade quando cumprem seis dos oito critérios.

Fonte: FAVROT et al., 2010.

No entanto, existe um consenso entre os dermatologistas veterinários de que os critérios de Favrot (FAVROT et al., 2010) devem ser utilizados apenas após descartar as outras causas de prurido (SCOTT; MILLER; GRIFFIN et al., 2001), tais como hipersensibilidade à saliva de insetos, dermatite de contato irritante, dermatite alérgica à picada de ectoparasitas (DAPE), hipersensibilidade a parasitas intestinais, hipersensibilidade alimentar, foliculite bacteriana e dermatite por *Malassezia*, doenças ocasionadas por ectoparasitas (otoacariase, escabiose, queiletielose, pediculose,

demodicidose) (DEBOER & HILLIER, 2001). Cada diagnóstico diferencial deve ser confirmado através de métodos de exames complementares adequados e ou tratamentos instituídos (MILLER et al., 2013).

Ao se considerar a exclusão à picada de ectoparasitas (DAPE), na qual as lesões se localizam principalmente em região lombo sacra, base da cauda e região lateral e medial das coxas (BRUET et al., 2012), os clínicos devem ainda estar atentos ao fato de que muitos cães com DA, também apresentam DAPE. Um efetivo controle de ectoparasitas deve ser instituído, tanto no animal como no ambiente, para diagnóstico correto (DRYDEN et al., 2013). Cabe ressaltar que, para a maioria dos cães com DA, a hipersensibilidade alimentar é um diagnóstico diferencial que deve ser considerado. A DA induzida por alimento atinge de 19,6 a 30% dos cães com DA (MARSELLA, 2006). Entretanto, além dos alérgenos alimentares serem a causa, os cães podem, em raros casos, ter apenas hipersensibilidade alimentar e não com dermatite atópica (OLIVRY et al., 2007).

Segundo dados da literatura, a porcentagem de cães com dermatite atópica que se beneficiam com a dieta de restrição com proteína original por oito semanas e posterior desafio dietético é cerca de 32% (VANDRESEN & FARIAS, 2014). Neste caso, a fonte alimentar deve ser uma dieta comercial com proteína hidrolisada ou dieta caseira com proteínas que o animal nunca foi exposto (OLIVRY, DEBOER, PRELAUD et al., 2007).

A DA não deve ser diagnosticada através de testes alérgicos *in vitro* (sorológicos) ou *in vivo* (teste intradérmico, TID). Esses testes são úteis após a conclusão do diagnóstico de DA, com o intuito de selecionar alérgenos para a realização da Imunoterapia Alérgeno Específica (ASIT), determinar se a doença está associada com IgE alérgeno específica (MARSELLA, 2006; OLIVRY et al., 2010a) e ainda evitar a exposição do animal à certos alérgenos ambientais. Muitos cães saudáveis e cães com DA apresentam reações positivas

a esses testes. Nenhum tipo de teste provou ser mais preciso do que o outro, embora o teste intradérmico seja considerado o padrão ouro (HILLIER, 2008; OLIVRY et al., 2010a).

O TID é considerado mais específico do que os testes *in vitro* porque tem a vantagem de testar o órgão alvo que é a pele; ele avalia a presença de IgE aderida à superfície de mastócitos (DEBOER & HILLIER, 2001), onde a presença de uma reação positiva nem sempre indica doença alérgica, podendo algumas vezes indicar hipersensibilidade subclínica (DEBOER & HILLIER, 2001). Os testes intradérmicos parecem ser superiores aos testes de escarificação cutânea, punção ou ainda, aos sorológicos (SCOTT; MULLER; GRIFFIN, 2001).

O TID pode permanecer positivo, meses depois da queda de IgE circulante, porque a IgE permanece por um período de tempo aderida à superfície de mastócitos e basófilos, mas diminui rapidamente na circulação após a exposição ao alérgeno. Com isso o resultado dos testes sorológicos podem mostrar falso negativo a um determinado alérgeno se for realizado muito tempo após a exposição do animal ao alérgeno em questão (WASSON & GRIEVE, 1998). A seleção dos alérgenos testados varia de acordo com a região geográfica onde vive o animal. É importante ressaltar que um resultado positivo não indica que o animal seja atópico, mostra apenas que ele é sensibilizado àquele alérgeno, bem como podem ocorrer resultados falso negativos naqueles animais em que a DA não é mediada por IgE (DEBOER & HILLIER, 2001).

2.3.1. Testes sorológicos

Em um painel de alérgenos a serem investigados, os testes sorológicos são úteis na detecção de IgE alérgeno específica no soro de um animal, sendo que, entre os mais

conhecidos estão o RAST (radiallergosorbent test), ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) e o VARL (veterinary allergen reference lab), que é um ensaio imunoenzimático de fase líquida (DEBOER & HILLIER, 2001; SAEVIK et al., 2003).

Desta forma, para a seleção de alérgenos visando imunoterapia, o ideal é a realização dos testes sorológico e TID no animal atópico e posterior comparação dos resultados com a anamnese criteriosa (HALLIWELL, 2000; ACKERMAN, 1998; DEBOER, 2008). No entanto, podem ocorrer resultados diferentes entre o TID e o teste sorológico, sendo que o TID oferece alta sensibilidade quando comparado com a maioria dos testes *in vitro* (WASSON & GRIEVE, 1998). Os testes sorológicos, apesar de não terem seus resultados afetados por anti-histamínicos ou esteroides, alguns autores sugerem que os níveis de IgE do soro podem estar diminuídos em animais que estão sob terapia esteroidal (WASSON & GRIEVE, 1998).

2.4. Tratamento da DA

O tratamento da DA é multimodal e deve ser individualizado para cada paciente, dependendo do estágio da doença, de sua gravidade e da distribuição das lesões. O veterinário também deve questionar com o tutor os benefícios de cada intervenção recomendada, considerando sempre seus efeitos colaterais, custos de um único tratamento ou combinações e facilidade de administração, além da influência da intervenção na qualidade de vida de ambos, tutor e animal (OLIVRY et al., 2010a).

2.4.1. Redução da exposição aos alérgenos

O reconhecimento dos fatores de precipitação de crises, ou seja, dos alérgenos aos quais o animal é hipersensível, é de fundamental importância no controle da DA. Uma vez identificados, é possível minimizar a exposição (OLIVRY et al., 2010a).

2.4.2-Reposição da barreira epidérmica

- *Uso de xampus e hidratantes tópicos*: A recuperação da barreira epidérmica se dá através da hidratação da pele com o uso de xampus ou sprays contendo princípios ativos hidratantes (emolientes e umectantes) e repositores de ceramidas. Os banhos com o princípio ativo devem ter um período de aplicação de 10 minutos e levam a uma redução do prurido (LOFLATH et.al., 2007). Recomenda-se a aplicação tópica de repositores de lipídeos, pois foi comprovada sua eficácia devido ao aumento da camada lipídica e melhora da função de barreira nos cães com DA (SALVADOR, 2014).

- *Suplementação com ácidos graxos poli-insaturados derivados de ômega 3 e ômega 6*: Podem ter um efeito anti-inflamatório reduzindo o prurido, levando a uma melhora na qualidade da pele e pelo (OLIVRY et al., 2010b). Em geral, dietas enriquecidas com ácidos graxos têm uma maior quantidade deles do que a suplementação oral (ROUDEBUSH et al., 1997; 2001). O benefício da suplementação dietética com os ácidos graxos essenciais pode ser observado dois meses após o início da suplementação (OLIVRY et al., 2001a).

2.4.3. Controle de infecções secundárias por bactérias e leveduras

A piodermite superficial (foliculite) por *Staphylococcus pseudointermedius* é um quadro secundário muito comum em cães com DA e requer tratamento antimicrobiano tópico e por vezes sistêmico. Quando as lesões se apresentam de forma localizada, se faz o uso de xampus à base de clorexidina 2 a 4%, peróxido de benzoíla 2,5% e realização de banhos semanais ou duas vezes por semana, com atenção para a possibilidade de agravar o ressecamento da pele com o uso desses princípios ativos ou ainda a aplicação de sprays, incluindo uma variedade de ácidos (ácido acético, ácido málico, ácido láctico), peróxido

de benzoíla, sulfadiazina de prata ou clorexedine (LOEFFLER et al., 2007). Mupirocina a 2% e ácido fusídico são reservados para aquelas situações em que os antissépticos tópicos falharam ou quando a cultura e antibiograma não indica nenhuma outra classe de antimicrobianos (MUELLER et al., 2012, HILLIER et al., 2014;).

Entretanto, quando as lesões são generalizadas e graves e profundas e não respondem à terapia tópica, é realizado o tratamento com antibioticoterapia sistêmica (HILLIER et.al., 2014). A antibioticoterapia empírica pode ser realizada quando a foliculite é tratada pela primeira vez e a escolha do antibiótico deve ser pertencente à classe dos beta-lactâmicos (cefalosporinas, amoxicilina com clavulanato de potássio), sendo que a seleção terapêutica empírica de fármacos para uso sistêmico é sempre contra indicada quando há suspeita de infecção por *Staphylococcus spp* multiresistente (HILLIER et al, 2014). Vale ressaltar que atualmente, recomenda-se evitar ao máximo o uso de antibioticoterapia sistêmica para tratamento das foliculites devido à expansão dos *Staphylococcus pseudointermedius* meticilina resistentes (MRSP) e *Staphylococcus aureus* meticilina resistentes (MRSA) (YOUNG et al., 2011).

A realização de cultura e antibiograma se faz necessária quando há presença de infecção bacteriana profunda, infecção bacteriana recidivante, falha na resposta à terapia antimicrobiana, história de doença imunossupressora, presença de bacilos na citologia, uso frequente de antibiótico no passado e quando ocorre menos de 50% de resolução das lesões após duas semanas de antibioticoterapia (TOMA et al., 2008; MILLER et al., 2013; MORRIS et al., 2017).

O tempo mínimo de tratamento para piodermites superficiais é de 21 dias, sendo possível prolongar por mais sete dias após a regressão das lesões (MILLER et al., 2013). Para as piodermites profundas, o tempo de tratamento é de quatro a seis semanas, podendo prolongar por mais 14 dias após a regressão das lesões (HILLIER et al., 2014).

A combinação da terapia sistêmica com a terapia tópica é recomendada sempre que possível para evitar contaminação ambiental e para outros hospedeiros (MORRIS et al., 2017), sendo que as infecções recorrentes que acontecem na pele do atópico podem estar correlacionadas com um defeito na imunidade inata e diminuição na produção de peptídeos antimicrobianos, como as beta-defensinas (VAN DAMME et al., 2009).

A infecção tegumentar pela levedura *Malassezia spp.*, também é bastante comum no animal com DA, e seu controle pode ser realizado através do uso de antifúngicos por via oral e banhos também com antifúngicos tópicos, como cetozonazol a 1 a 2%, ou clorexidina 3 ou 4% ou associado ao miconazol 2% (MAYNARD; REME; VIAUD, 2011).

No caso da inflamação crônica dos condutos auditivos externos, que resulta em excessiva produção de cerúmen e pode levar às infecções otológicas ocasionadas por bactérias e ou leveduras, se faz necessário o uso de ceruminolíticos e medicações otológicas contendo em sua formulação corticosteroides, fungicidas e antibióticos tópicos. A escolha dos princípios ativos usados deve ser realizada mediante exame citológico do cerúmen e por vezes, também, cultura e antibiograma (DEBOER, 2004).

2.4.4. Redução do prurido com o uso de agentes farmacológicos tópicos ou sistêmicos

- *Glicocorticóides tópicos*: Os glicocorticóides tópicos são indicados para tratar lesões pruriginosas localizadas ou multifocais e por um curto período de tempo (inferior a dois meses), uma a duas vezes ao dia (OLIVRY et al., 2010a). Recomenda-se o uso de triamcinolona 0,015% spray ou aceponato de hidrocortisona 0,0584% (CORTAVANCE-VIRBAC), sendo que o tempo necessário para seu uso deve levar em consideração a ocorrência dos indesejáveis efeitos colaterais que dependem da sua potência, formulação

utilizada e duração do tratamento (BRYDEN et al., 2008; NUTTALL et al., 2009). Uma opção ao uso de glicocorticoide tópico na forma de creme ou pomada é o Tacrolimus pomada 0,1%, que tem indicação em lesões pruriginosas localizadas (MARSELLA et al., 2004), porém, como ocorre em humanos, seu uso está associado a ocorrência de uma irritação local (BENSIGNOR & OLIVRY, 2005). Ademais, seu uso não é indicado para casos de agudização do prurido devido ao início lento de sua ação antipruriginosa.

- Glicocorticóides orais: Prednisona, prednisolona ou metilprednisolona- A dose recomendada de 0,5 mg/kg a 1 mg/kg a cada 24 horas ou dividido em duas administrações e diminuição da dose de acordo com a melhora do prurido, procurando obter a menor dose possível para manter a qualidade de vida e evitar os efeitos colaterais dos corticoides. Não é recomendado o uso de glicocorticoides injetáveis de ação prolongada (OLIVRY et al., 2010b).

-Anti-histamínicos:- Devido ao seu modo de ação, eles poderiam ter algum efeito benéfico antes da liberação da histamina e em cães com DA branda. Recomenda-se a tentativa de uso dos diversos grupos de anti-histamínicos que agem em receptores H1 no paciente atópico (1ª ou 2ª geração). O uso de anti-histamínicos associados a ácidos graxos e corticosteroides pode fazer com que uma menor dose de corticoide seja usada, reduzindo assim os efeitos colaterais, sendo que há relatos de que 25% dos pacientes atópicos se beneficiam com o uso dos anti-histamínicos (CARLOTTI, 2004; ROSYCHUK, 2004; DEBOER, 2008).

-Ciclosporina- A ciclosporina é um derivado do fungo *Tolypocladium inflatum gams* e um inibidor da calcineurina, promovendo uma diminuição da resposta imune celular mediada por linfócitos T (YASBEK & LARSSON, 2010). A ciclosporina pode ser administrada durante as primeiras duas a três semanas juntamente com corticosteróides. Devido à sua demora de início de ação, recomenda-se a retirada

gradativa dos corticosteróides e tentativa de manter apenas a ciclosporina para controle do prurido, sendo que a mesma pode ainda ser administrada em dias alternados ou em intervalos maiores. Há relatos de que os efeitos colaterais da ciclosporina mais comuns são os efeitos gastrintestinais, mas que são brandos e raramente requerem intervenção (NUTTALL; REECE; ROBERTS, 2014). A ciclosporina parece ter bom efeito no controle a longo prazo da DA (NUTTALL; REECE; ROBERTS, 2014).

-Oclacitinib- É um inibidor da enzima Janus Kinase 1 e possui ação rápida e efeito anti-inflamatório por inibir IL-2, IL-4, IL-6, IL-13 e principalmente a IL-31(WREN et al., 2013). O oclacitinib, além de ter mostrado uma ação mais rápida, apresenta menos efeitos colaterais gastrintestinais quando comparado à ciclosporina (LITTLE et al., 2015; COSGROVE et al., 2015).

-Anticorpo monoclonal caninizado LOKIVETMAB: LOKIVETMAB é um anticorpo monoclonal caninizado anti-IL-31 que tem um efeito na redução do prurido e lesões de pele de cães com DA, inibindo diretamente a liberação da IL-31 (SOUZA, et al., 2018). Foi observado ainda que uma pequena porcentagem de animais pode não se beneficiar com tratamento utilizando apenas um tipo de terapia levando-se em consideração a natureza multifatorial da DA, porém, em animais onde a IL-31 tem uma função mais importante na manifestação do prurido, o benefício do LOKIVETMABE como terapia única pode ser evidente (MICHELS et al., 2016). Como a identidade proteica do anticorpo monoclonal e do anticorpo do cão é de mais de 92%, o risco de reações imunológicas é baixo (BAMMERT et al., 2014). A dose sugerida para uso do LOKIVETMAB segundo estudos pode variar de 0,5 a 2 mg por kg por via subcutânea, a cada 30 dias, sendo observado que o nível de redução do prurido e a duração da resposta aumentam com o aumento da dose (MICHELS et al., 2016).

2.4.5. Imunoterapia alérgeno específica: *Allergy Specific Immunotherapy* (ASIT)

Imunoterapia alérgeno específica é a prática de se administrar quantidades gradualmente aumentadas de um extrato alergênico a um indivíduo alérgico com o objetivo de melhorar os sinais associados a uma posterior exposição ao agente ofensor (BOUSQUET; LOCKEY; MALLING, 1998). Os extratos de alérgenos aos quais o animal é sensível devem ser selecionados mediante os testes “*in vivo*” (TID) e testes “*in vitro*” (teste sorológico), realizados em conjunto ou isoladamente (CARLOTTI, 2004; DEBOER, 2008).

A ASIT produz muitos efeitos na resposta das células T aos alérgenos, como a produção de IFN- γ e outras citocinas (SHIDA et al., 2004) que estimulam a diferenciação de células Th0 para Th1 (VARNEY et al., 1993; EBNER et al., 1997). Além disso, ocorre diferenciação para células T do perfil regulatório (Treg), que suprimem as respostas das células T efectoras (JUTEL et al., 2003; VERHOEF et al., 2005). Assim, o aumento da produção de citocinas pelas células apresentadoras de antígenos (APC) com atividade regulatória como IL10 produzida pelas células Th2 influencia inibição da resposta inflamatória, supressão da produção de IgE alérgeno específica e indução da produção de IgG4 que induz tolerância (AKDIS & BLASER, 1999; JUTEL et al., 2003).

Em medicina, a melhor efetividade da ASIT foi correlacionada com vários fatores, dentre eles: pacientes com apresentação mais branda da doença (antes das mudanças da fase crônica da doença), início precoce da terapia e pacientes com hipersensibilidade para um ou poucos alérgenos (BOUSQUET; LOCKEY; MALLING, 1998). Em cães também a eficácia da ASIT é afetada pela idade de início da doença (NESBITT, 1978; WILLEMSE; VAN DEN BROW; RIJNBEEK, 1984; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001;), idade de início da ASIT (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 1996); duração da doença (MUELLER & BETTENAY, 1996; NUTTALL, 1998; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001), gravidade dos sinais clínicos (GRIFFIN & HILLIER, 1998) e tipo de alérgeno ao

qual o organismo é hipersensível (CHARACH, 1993; MUELLER & BETTENAY, 1996). A ASIT é especialmente indicada nos casos em que a terapia medicamentosa é inefetiva, ou os efeitos colaterais dos fármacos são indesejados. A eficácia da ASIT para cães tem sido bem demonstrada nos últimos 40 anos, sendo que atualmente ela é considerada a principal forma de tratar doenças alérgicas nessa espécie (GRIFFIN & HILLIER, 2001)

Esta terapia, além de não requerer acompanhamento de exames laboratoriais, é capaz de alterar o curso da doença com possível cura, apresenta baixo risco de efeitos colaterais e pode levar a uma diminuição do uso de medicamentos quando comparada com outros fármacos, e não apresentou até o momento, registros de efeitos colaterais à longo prazo (GRIFFIN & HILLIER, 1998). Deste modo, há relatos de que 50 a 80% dos cães tratados com ASIT por um período de seis a 12 meses apresentam melhora dos sinais clínicos e ou redução da dose de medicamentos antipruriginosos usados (LOEWENSTEIN & MUELLER, 2009). Como desvantagem principal estão listados os riscos de não possuir efeito benéfico algum e a remota possibilidade de produzir reação anafilática (GRIFFIN & HILLIER, 1998). Há também, controvérsias correlacionando eficácia da ASIT e o numero de alérgenos selecionados mediante a realização dos testes (NUTTALL, 1998; SCHNABL et al., 2006).

Existem duas fases para administração da ASIT, a fase de indução, com aumento gradual das doses e das concentrações dos extratos alergênicos e a fase de manutenção, quando o paciente recebe uma dose efetiva terapêutica durante um período de tempo, sendo que essa dose terapêutica é incapaz de causar reações adversas locais ou sistêmicas (COX et al., 2011).

2.4.5.1. Seleção dos alérgenos:

Os alérgenos são selecionados, conforme já mencionado, baseado nos resultados dos testes TID e ou sorológico. Entre os mais comuns, estão os APD (Der f, Der p e *Bloomia tropicalis*), pólenes (variando de acordo com a região, como *Cynodon dactylon*, *Lolium perene* e *Lolium multiflorum*) e bolores (como *Cladosporium herbarium*, *Alternaria alternata* e *Penicillium notatum*)

Em relação à especificidade dos tipos de alérgenos, já foi demonstrado que os cães apresentaram uma melhor resposta quando a fonte de alérgeno era proveniente de pólenes (MUELLER & BETTENAY, 1996; REEDY; MILLE; WILLEMSE, 1997). Porém, outros estudos não mostraram diferença na resposta clínica relacionada à especificidade dos alérgenos utilizados na imunoterapia, sejam eles APD, pólenes ou outros tipos de alérgenos (SCHNABL et al, 2006).

Devido ao fato das proteases produzidas pelos fungos degradarem pólenes e ácaros de forma lenta e gradual, recomenda-se que os extratos contendo fungos sejam armazenados em frascos separados para uso da ASIT subcutânea, sendo que para ASIT sublingual, podem ser armazenados juntos devido à presença do glicerol (ESCH, 1992; MUELLER & BETTENAY, 1996; ROSENBAUM; ESCH; SCHWARTZMAN, 1996).

Quanto à dose dos alérgenos, em medicina ela é definida por alérgenos padronizados, porém, em veterinária há formulações com concentrações de alérgenos em diferentes unidades, o que pode levar à falhas na especificidade da concentração absoluta final de cada alérgeno na mistura (REEDY; MILLER; WILLEMSE, 1997; SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001).

Em humanos polissensibilizados, há evidências que sugerem que o tratamento com ASIT utilizando um único alérgeno dominante é tão efetiva quanto ASIT com

múltiplos alérgenos (CALDERON et al., 2012). Essa abordagem de que “o menos é mais” tem sido considerada na Europa e não é comum nos EUA (CIPRIAND et al., 2012).

2.4.5.2. Vias de administração

A via subcutânea é a mais utilizada em cães, embora a sublingual também tenha sido recomendada devido ao grande número de células dendríticas na mucosa oral (MOINGEON et al., 2006; MOINGEON, 2013) e por ser considerada uma modalidade terapêutica mais segura que a subcutânea, porém quando se opta pela utilização da via sublingual, há necessidade de duas aplicações diárias, diretamente na mucosa oral, uso contínuo (CANONICA et al., 2014).

2.4.5.3. Protocolos da ASIT para uso da via Subcutânea (SCIT):

- RUSH: protocolo de indução curto e intenso tem sido usado na dermatologia veterinária levando a uma rápida resposta clínica. Porém, devido o alto índice de reações adversas como prurido e urticária, seu uso tem sido desencorajado. Sugere-se aplicações em intervalos de 15 a 30 minutos, por poucos dias, em pacientes internados (MUELLER et al., 2005). A dose de manutenção é alcançada em alguns dias. (MACDONALD, 1999; MUELLER; BETTENAY; TAN, 2001);

- TRADICIONAL: A indução é obtida com várias aplicações da vacina e a dose de manutenção é alcançada em meses.

- CLUSTER: A indução é obtida com a aplicação de poucas doses (duas a quatro), em dias não consecutivos, e a dose de manutenção é alcançada em semanas.

Estudos têm demonstrado uma ampla variação nos intervalos de aplicação sugeridos em cada protocolo, sendo que os mesmos poderiam ser modificados baseados na resposta do paciente aos alérgenos injetados com o intuito de otimizar o sucesso do tratamento (ROSSER, 1998).

A vacina utilizada pode ser aquosa (com extratos preservados em solução salina de fenol), onde se inicia indução com extrato mais diluído e uma maior frequência de injeções, progredindo para aumento da concentração do extrato e injeções menos frequentes (DEBOER, 2017).

Na vacina DEPOT, os extratos alergênicos estão precipitados em alumínio. A adsorção das moléculas do alérgeno a um adjuvante de hidróxido de alumínio fornece uma liberação mais lenta e tem como vantagem a necessidade de um menor número de aplicações (JENSEN-JAROLIM, 2015).

2.5. Justificativa

A ASIT é atualmente a única modalidade terapêutica capaz de alterar o curso da doença e evitar o surgimento da agudização dos sinais clínicos frente ao desafio alergênico. No entanto, variações nas concentrações e doses insuficientes de alérgenos maiores nas formulações utilizadas têm levado a falhas na resposta terapêutica. Desse modo, os protocolos propostos de imunoterapia devem ter duplo objetivo de promover máxima eficácia além de minimizar a probabilidade de ocorrência de efeitos colaterais, sendo capazes ainda de induzir tolerância alergênica.

Como a exposição aos ácaros e seus alérgenos varia de acordo com o clima e região geográfica é de fundamental importância o estudo do padrão de sensibilização dos

animais com dermatite atópica em diferentes localidades. Esse estudo objetiva a avaliação da sensibilização aos alérgenos do ácaro *Dermatophagoides farinae*, dentre eles o Der f 2, o que pode auxiliar na confecção de vacinas capazes de alterar a resposta imunológica de Th2 para Th1 nos cães com esta doença, e assim contribuir para a minimização dos sinais clínicos frente ao desafio alergênico ou até mesmo a ausência da resposta alérgica, resultando em uma melhor qualidade de vida dos animais bem como dos seus tutores.

OBJETIVO

3) OBJETIVO

Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a soroprevalência aos alérgenos Der f 2, Zen 1 e corpo do ácaro *Dermatophagoides farinae* no soro dos cães com dermatite atópica em regiões do estado de São Paulo, através do teste sorológico para detecção de IgE alérgeno específica.

Objetivos específicos

- Caracterizar a população de cães com dermatite atópica;
- Verificar a soropositividade aos alérgenos de Der f 2, Zen 1 e corpo do ácaro *Dermatophagoides farinae* através da dosagem de IgE por ELISA;
- Verificar se há correlação entre os valores das densidades ópticas de IgE aos alérgenos.

MATERIAL E MÉTODOS

4) MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Casuística, local do estudo e características ambientais

Este estudo foi realizado em 85 cães, sendo 61 provenientes do serviço de Dermatologia da UNESP, Campus de Botucatu, situado na cidade de Botucatu e outros 24 provenientes de clínicas privadas, sendo 14 deles da Clínica de Especialidades VESP, situada na cidade de Campinas, e 10 do Hospital Veterinário Limeira, situado na cidade de Limeira. A localização dos três municípios, pertencentes ao Estado de São Paulo, está ilustrada na Figura 5.

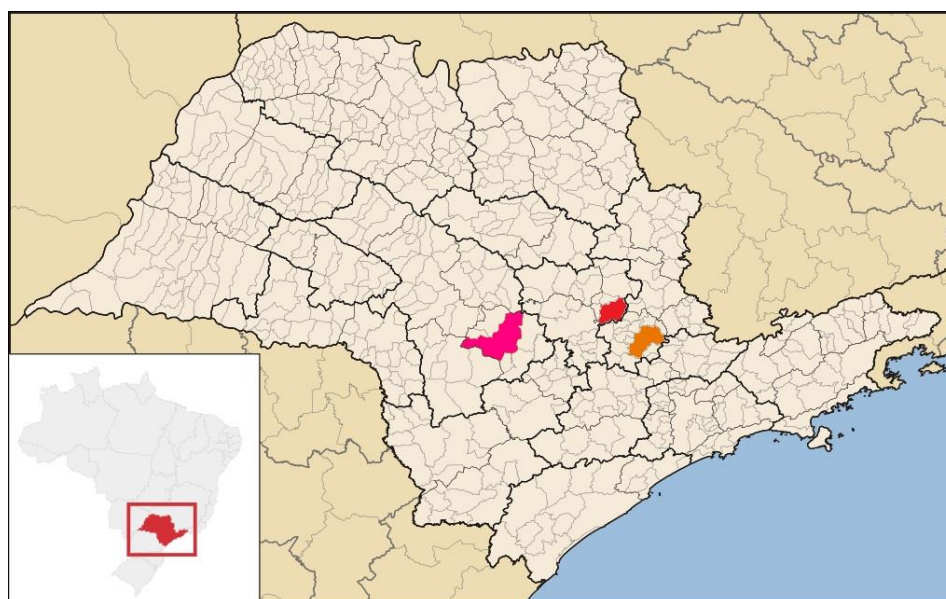


FIGURA 5. Localização dos municípios dos 85 animais incluídos no estudo.

Em rosa, a cidade de Botucatu; em vermelho, a cidade de Limeira; em laranja, a cidade de Campinas; em vinho, a localização do estado de São Paulo no país.

Na cidade de Botucatu, que possui um clima subtropical úmido, a temperatura média do ar anual registrada pela Estação Meteorológica do Departamento de Solos e Recursos Ambientais – Faculdade de Ciências Agrônômicas, UNESP (Lageado) é de 20,3

°C, com máxima de 35,1 °C e mínima de 6,6 °C), enquanto a umidade relativa do ar média anual é de 74% (FCA – Unesp, 2017). Em Limeira, cujo clima é tropical de altitude com inverno seco, a descrição realizada pela Faculdade de Tecnologia da Unicamp referente ao ano de 2017 foi de temperatura média anual de 21,5 °C, com máxima de 27,3 °C e mínima de 16 °C (FTI – Unicamp, 2017). A cidade de Campinas possui clima tropical de altitude, a temperatura média anual referente ao período de 1988 até 2008 registrada pela Faculdade de Engenharia Agrícola da Unicamp foi de 22,4 °C, com máxima de 28°C e mínima de 16,8 °C, sendo que a umidade relativa do ar anual atingiu, em média, 47% (FEAGRI - Unicamp, 2017).

4.2. Critérios de inclusão

Todos os cães incluídos neste estudo foram diagnosticados com DA preenchiam pelo menos cinco de oito critérios estabelecidos por Favrot, *et al.*, 2010 (FAVROT, 2010); após exclusão de outras dermatoses pruriginosas (WILLEENSE, 1986). Os cães receberam por um período de oito semanas dieta de restrição com proteína inédita a fim de descartar a hipersensibilidade alimentar bem como foi instituído rigoroso controle de pulgas e carrapatos para descartar a alergia à saliva de ectoparasitas. Os animais que participaram do estudo tinham uma faixa etária variável e eram de ambos os gêneros e diferentes raças. Exceto por apresentarem a DA, os cães deste estudo eram hígidos quanto aos demais sistemas orgânicos.

4.3. Critérios de exclusão

Na ocasião da coleta do sangue por venopuntura jugular e, posterior obtenção do soro, os animais poderiam estar submetidos a terapia para DA com o uso de anti-histamínicos, ômega 3, glicocorticoides sistêmicos ou tópicos, oclacitinib, excluindo tão

somente aqueles que no momento estivessem recebendo imunoterapia alérgeno específica.

4.4. Obtenção do material biológico

Para obtenção das amostras, foi realizada a coleta de 10 mL de sangue por venopuntura de jugular de cães em tubo seco. Para separação do soro, as amostras foram submetidas à centrifugação de 2530 rpm durante quatro minutos, aliquotadas e devidamente armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C) até o momento de envio das mesmas para a empresa *Zenoaq*, no Japão, onde foi realizado o teste sorológico para detecção de IgE alérgenos específica para Der f 2, Zen 1, e DF. As amostras foram coletadas em diferentes estações no decorrer do ano de 2017.

4.5. Procedimento Laboratorial

O teste sorológico utilizado no presente estudo para detecção de IgE alérgeno específica dos cães foi o ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto (Figura 6). No teste ELISA indireto, o anticorpo da amostra é colocado entre o antígeno revestido na placa e um conjugado anti-imunoglobulina espécie específico marcado com enzima. A adição de um reagente cromogênico / substrato da enzima faz com que a coloração ocorra. Esta intensidade de cor é diretamente proporcional à quantidade de anticorpo da amostra que se ligou, formando o complexo. Este ensaio é usado para estimar quantitativamente os anticorpos no soro e em outros fluidos corporais.

A metodologia detalhada do ensaio encontra-se no Anexo 1. Resumidamente, após o processo de sensibilização das placas com 100 µL do antígeno (Der f 2 recombinante, na concentração final de 50 µg/mL; Zen 1, na concentração de 1 µg/mL; DF, na concentração de 0,1 µg/mL), foram utilizados 100 µL das amostras diluídas (1:10)

para a realização do teste, além dos controles positivos e negativos (soro de cães sensibilizados com o antígeno e soro de cães saudáveis provenientes do laboratório, respectivamente). Após sucessivas incubações e lavagens, foi aplicado 100 μ L do anticorpo anti-IgE canino (1:10.000) conjugado com a enzima *horseradish peroxidase* HRP. O substrato *tetramethylbenzidine* (TMB) foi adicionado, e o bloqueio da reação ocorreu utilizando adição de ácido sulfúrico. A reação foi lida em comprimento de onda de 450 nm e 630 nm. Os resultados foram considerados positivos quando a DO ultrapassou 0,2.

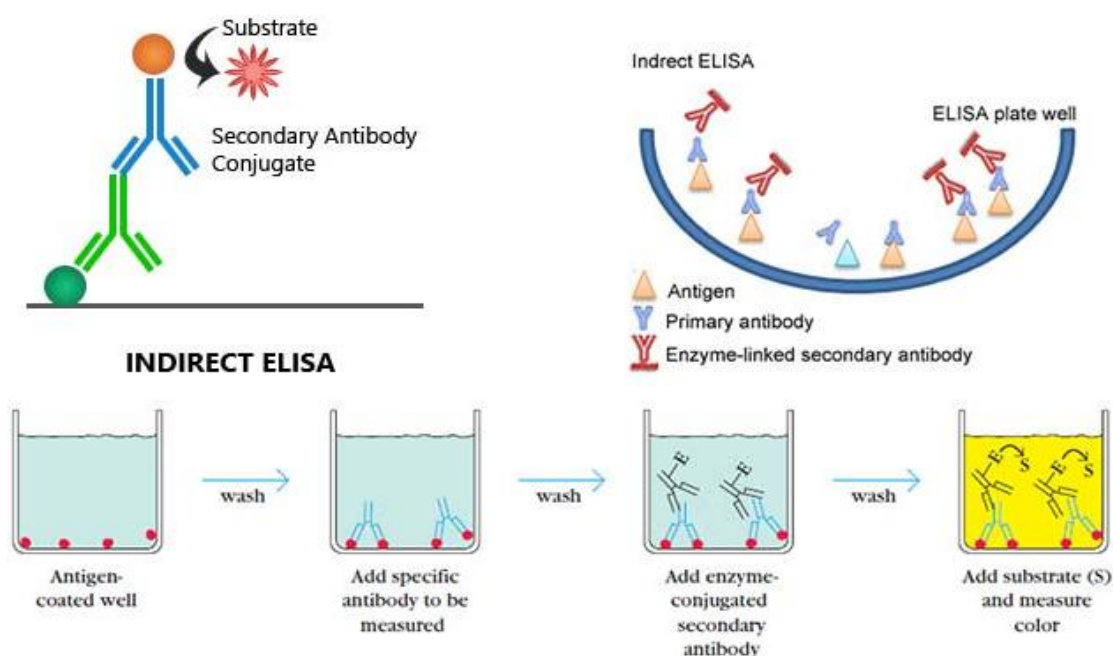


FIGURA 6. Princípio da técnica de ELISA indireto, utilizado no estudo.

Fonte: <https://immunologynotes.com/indirect-elisa-introduction-steps-advantages-and-protocol/>

4.6. Análise dos Resultados

Foi realizada estatística descritiva dos dados com frequência e porcentagem para as variáveis qualitativas e média, mediana, desvio padrão e valores de mínimo e máximo para as variáveis quantitativas.

Foi realizado testes de normalidade (Shapiro-Wilk). Dados não paramétricos das densidades ópticas (DOs) de cada alérgeno foram analisados por prova de Friedman e os resultados foram representados por mediana e percentis. Foi avaliada a correlação entre as DOs de cada alérgeno pelo teste de Spearman. Posteriormente, as DOs foram categorizadas em positivo ou negativo utilizando o ponto de corte de 0,20. Associações entre os dados categorizados foram avaliadas utilizando o teste de Fisher. Todas as análises foram realizadas no Statistical Analysis Software – SAS (SAS Institute, 2011). Foi considerado o nível de significância quando $p < 0,05$.

4.7. Questões Éticas

Este estudo tem aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) de Botucatu, sob protocolo nº198/2016. O termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelos tutores dos animais participantes, encontra-se no anexo 2.

RESULTADOS

5) RESULTADOS

5.1. Características dos animais

Em relação ao gênero dos 85 animais incluídos neste estudo, a maioria eram fêmeas (n=52, 61,2%). Estes cães não tinham informações prévias quanto à esterilização.

A maior prevalência de cães com DA se deu em animais com raça definida (CRD; n=57; 67%), distribuídos nas seguintes raças (acometendo principalmente Shih Tzu, Lhasa Apso e Poodle), conforme demonstrado no Gráfico 1.

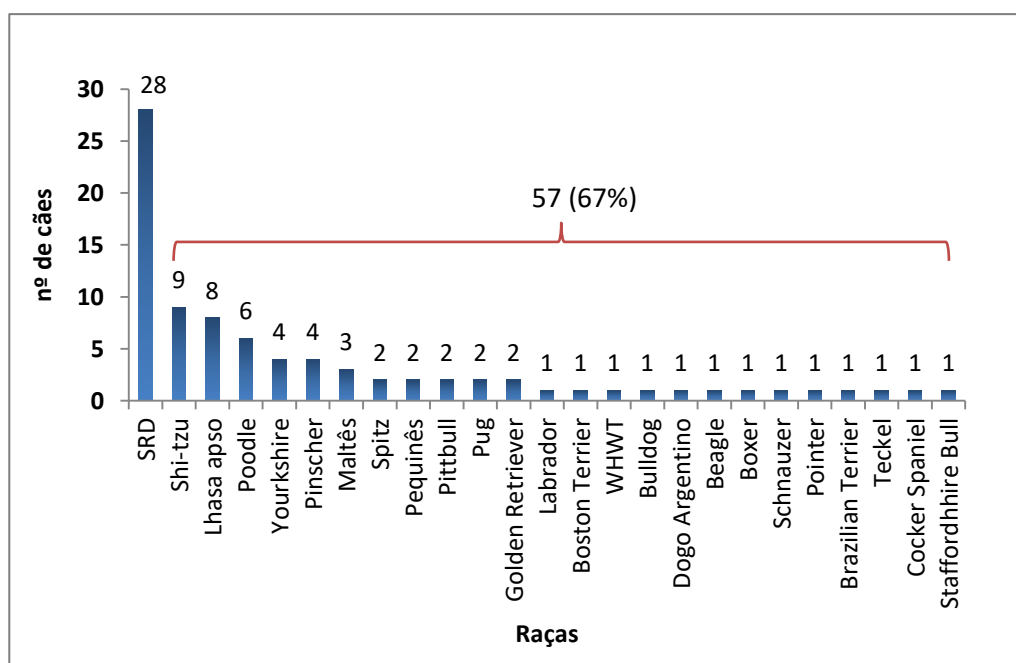


GRÁFICO 1. Distribuição das raças dos 85 animais incluídos no estudo. SDR: sem raça definida; WHWT: West Highland White Terrier.

A média de idade destes animais, no momento da consulta e inclusão no estudo, foi de 81 (± 40) meses (6 anos). Em relação ao início da manifestação da dermatite atópica, os sinais apareceram, aproximadamente, com 40 (± 29) meses, variando entre dois e 134 meses de idade, sendo a maior prevalência observada nos primeiros 48 meses (4 anos), somando 69% dos pacientes (Gráfico 2).

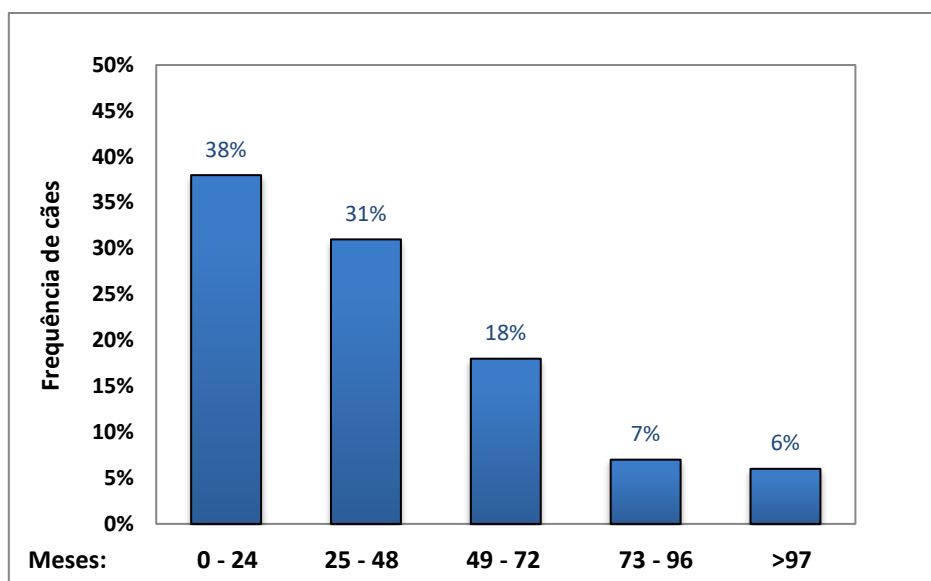


GRÁFICO 2. Porcentagem da distribuição de idade de aparecimento dos sintomas da dermatite atópica nos 85 animais incluídos no estudo.

5.2. Níveis de IgE das amostras de soro

Das 85 amostras de soro de cães com DA, quatro delas foram desprezadas no momento da realização do ensaio (ELISA) por apresentarem alterações de viscosidade. Assim, foram analisados 81 soros, onde 78 (96%) foram positivos ao teste sorológico para detecção de IgE contra o alérgeno Der f 2, enquanto que 74 (91%) foram positivos para o alérgeno Zen 1 e 78 (96%) foram positivos para o corpo do ácaro (DF: *D. farinae*). Esses resultados estão apresentados no Gráfico 3. Os valores positivos das DO analisadas variaram de 0,235 a 3,316 para Der f 2; 0,205 a 1,969 para Zen 1 e 0,232 a 1,798 para o corpo do ácaro. Os valores das densidades óticas positivas para IgE não apresentaram diferença significativa entre os alérgenos Der f 2, Zen 1 e *D. farinae* (Gráfico 4).

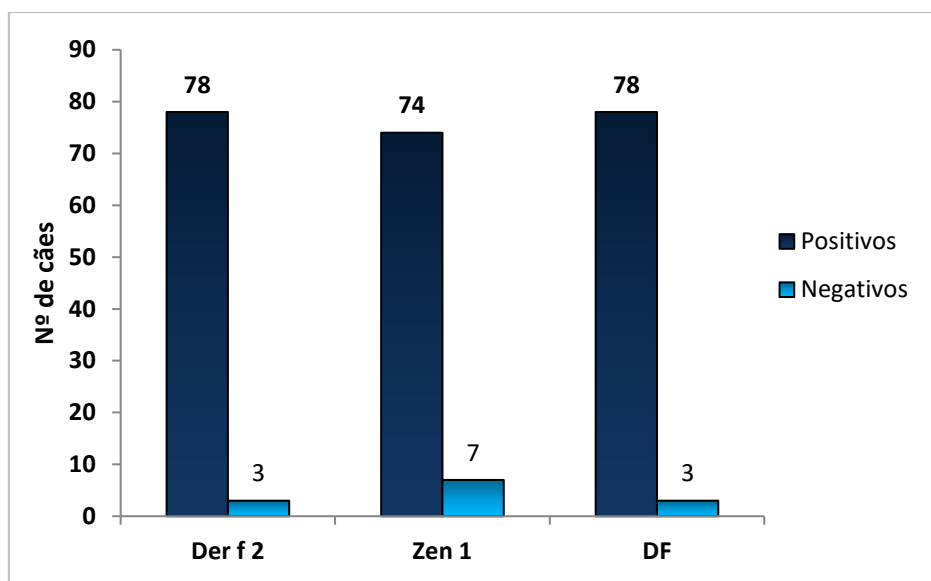


GRÁFICO 3. Distribuição da soropositividade aos alérgenos Der f 2, Zen 1 e corpo do ácaro no soro de 81 animais com DA incluídos no estudo. Der f 2: alérgeno *D. farinae* do grupo 2; Zen 1: alérgeno Zen 1; DF: *D. farinae*.

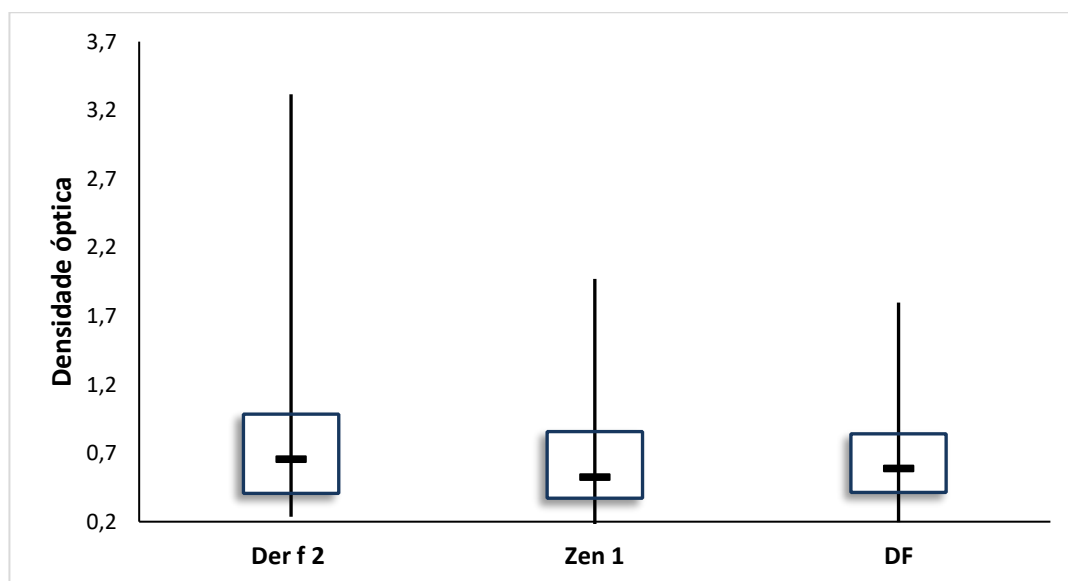


GRÁFICO 4. Densidades ópticas de níveis de IgE das 81 amostras positivas para os alérgenos. Resultados estão representados em mediana e percentis. Extremos da linha vertical são os valores máximo e mínimo, os *box plot* representam os percentis 25 e 75% e a linha horizontal é a mediana. $p < 0.05$. Der f 2: alérgeno *D. farinae* do grupo 2; Zen 1: alérgeno Zen 1; DF: *D. farinae*.

5.3 Correlação das densidades ópticas de IgE dos alérgenos

Para os dados categorizados, foram encontradas associações estatisticamente significantes entre Der f 2 e Zen 1 ($p=0,01$) e *D. farinae* e Zen 1 ($p=0,0004$). Não houve associação estatisticamente relevante entre *D. farinae* e Der f 2 ($p=1,00$).

Foram observadas correlações moderadas, porém, significativas, entre Zen 1 e Der f 2 ($R^2 = 0,37$, $p = 0,0006$) e *D. farinae* e Der f 2 ($R^2 = 0,51$, $p < 0,0001$). Uma forte correlação foi observada entre *D. farinae* e Zen 1 ($R^2 = 0,91$, $p < 0,0001$) (Gráfico 5).

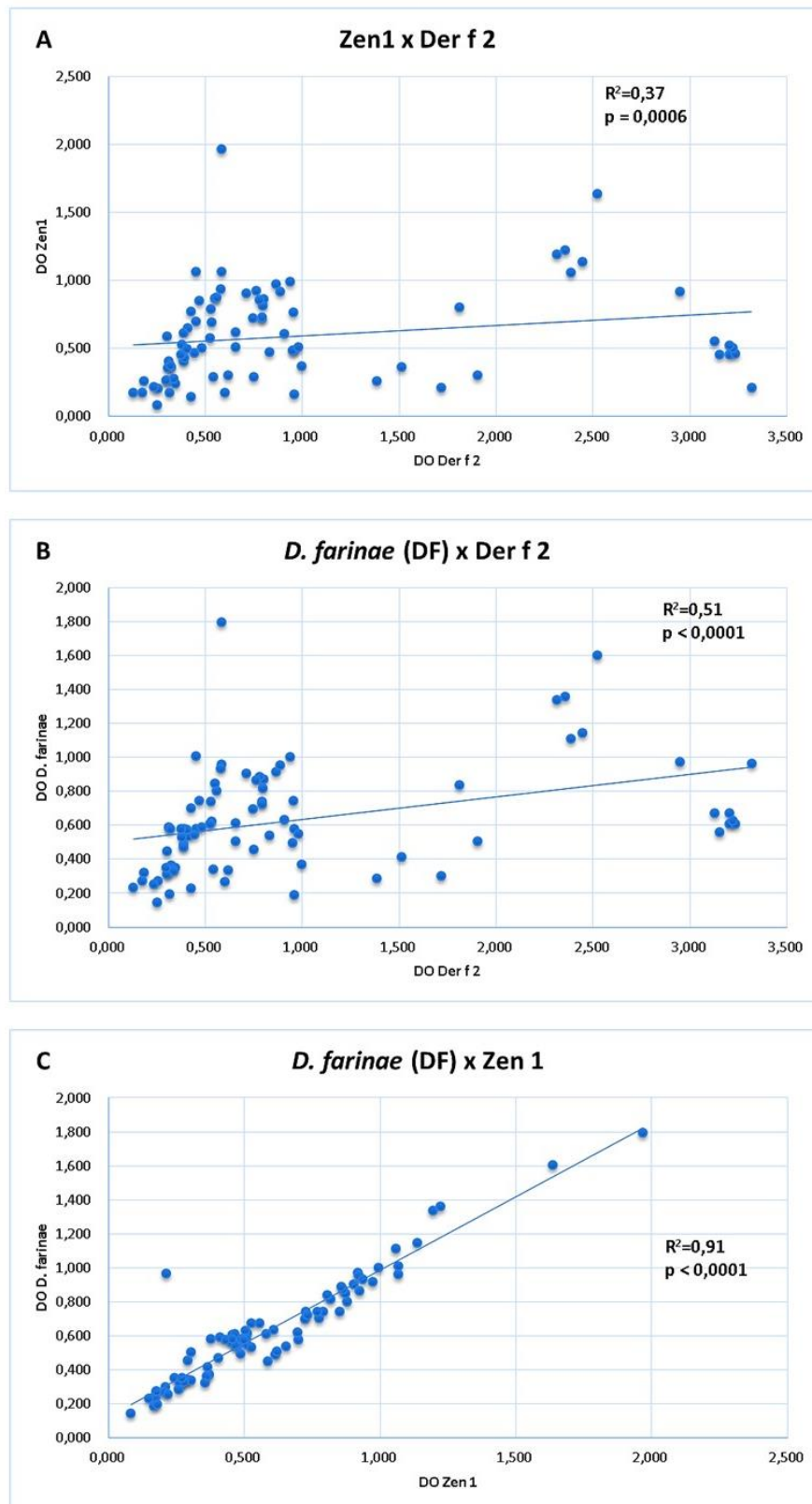


GRÁFICO 5. Correlação das densidades ópticas de Ig E entre os alérgenos Zen 1 e Der f 2 (A), *D. farinae* e Der f 2 (B) e entre *D. farinae* e Zen 1 (C). R^2 – Coeficiente de correlação de Spearman, $p < 0.05$.

Discussão

6) DISCUSSÃO

A DA é uma doença genética e afeta principalmente cães com raça definida, porém a maioria dos estudos realizados não associou a real prevalência da doença à frequência com que estas raças se encontram na população geral de cães (SOUZA E MARSELLA, 2001). No grupo de 85 cães selecionados com DA do presente estudo, 57 animais apresentavam definição racial (CRD) e 28 sem raça definida (SRD), corroborando com dados da literatura citados. Dentre os animais CRD, as raças mais comumente afetadas foram: Shihtzu, Lhasa apso, e Poodle.

A DAC é uma doença que não apresenta predileção por gênero, afetando igualmente machos e fêmeas (GROSS et al., 2005), embora no grupo estudado, 52 animais eram fêmeas e 33 machos. Esse resultado pode ser devido a maior predileção dos tutores de adotar fêmeas ao invés de machos.

Nosso estudo mostrou que 69% dos animais apresentaram o início dos sinais nos primeiros 48 meses de vida (4 anos), resultados semelhantes aos encontrados por Scott, Miller e Griffin (2001), nos quais a maioria dos cães afetados pela DA apresentaram os primeiros sinais entre um (12 meses) a três anos de idade (36 meses).

Taxas de hipersensibilidade para Der f variam de 20 a 100% nos cães atópicos (HILLIER & DEBOER, 2001; NUTTALL et al., 2006) sendo que este ácaro é mais alergênico para os cães com DA das regiões ocidentais, segundo Weber et al., (2003). No entanto, o real perfil de sensibilização de cães com DA aos alérgenos dos APD no Brasil, conta com poucos estudos disponíveis. No entanto, estudo mostrou a importância da quantificação dos alérgenos na poeira doméstica para determinação do índice de exposição alergênica e posterior sensibilização (DÉVAKI, MARCONI, MICHELLE, et al., 2017).

Estudo demonstrou a importância de *D. farinae* e *Blomia tropicalis* na patogênese da DAC no Brasil (CUNHA, SILVA, FACCINI, et al., 2012). No presente estudo detectou-se uma alta prevalência de soropositividade para DF, Der f 2 e Zen 1 em cães com DA, como observado em pesquisa realizada no Japão, que apontou alta soropositividade de IgE para alérgenos dos grupos 1 e 2 Der f em cães com DA. Assim, estes autores sugeriram que Der f 2 é um alérgeno maior para cães com DA no Japão (MASUDA et al., 1999; YAMASHITA et al., 2002). Em contraste, estudos realizados na Europa e EUA apontaram baixa prevalência de IgE alérgeno específica contra alérgenos do grupo 1 e 2 de Der f, mostrando que cães com DA reagem mais frequentemente aos alérgenos de alto peso molecular, pertencentes aos grupos 15 (98-109 kDa) e 18 (60 kDa) (McCALL et al., 2001; WEBER et al., 2003; THOMAS, 2015; BATARD et al., 2016) fato também observado por Cunha, Silva e Faccini em 2012. Portanto, ainda permanece controverso o fato dos cães com DA desenvolverem ou não uma resposta de produção de IgE específica contra alérgenos de baixo peso molecular de Der f 1 e 2.

Quatro proteínas foram registradas em 2007 como alérgenos maiores em cães com hipersensibilidade ao Der f no Japão, sendo que uma dessas foi identificada com alto peso molecular (188 kDa; média 150-250 kDa) e foi provisoriamente referida como Zen 1 (TSUKUI et al., 2007). No presente estudo, alta soropositividade foi detectada para este novo alérgeno, dado condizente com os encontrados na Europa e EUA, em estudo que utilizou testes sorológicos e intradérmicos em cães com DA (OLIVRY et al, 2016). Isso leva a suspeita de que altas taxas de positividade de IgE contra Der f bruto nesses animais poderiam estar relacionadas a presença do alérgeno Zen 1. Além disso, suspeita-se que Zen 1 pode fazer reações cruzadas com Der f 15, pois compartilha repetições dos aminoácidos prolina e treonina e epítomos de superfície (OLIVRY et al, 2016).

A divergência dos resultados entre os estudos acima apresentados, pode se dar por vários aspectos. Neste sentido, o número de amostras, as características da população estudada, as diferentes condições geográficas e climáticas e a própria metodologia para detecção dos anticorpos IgE alérgeno específicos, podem ser responsáveis por esta diversidade nos dados. Em relação ao método utilizado, muitos registros têm demonstrado que os testes sorológicos têm alta sensibilidade e relativamente baixa especificidade, o que pode levar a resultados falsos positivos (DEBOER & HILLIER, 2001; NUTTALL; URI; HALLIWELL, 2013), porém tal fato não se reveste de importância, pois este não é considerado um teste para diagnóstico da DAC e sim usado para seleção de alérgenos candidatos para imunoterapia alérgeno específica em cães fortemente suspeitos de apresentarem a doença.

De acordo com alguns estudos (KIM et al., 2011 ; PARK et al., 2012; CANONICA et al., 2013) os tipos de ácaros aos quais o animal com DA é sensível variam amplamente, dependendo das condições climáticas, geográficas, de higiene ou poluição ambiental e ambiente doméstico. Para a sua sobrevivência, é necessária alta URA, pois um clima seco ou muito frio é desfavorável ao seu crescimento, enquanto que áreas com alta umidade e invernos moderados favorecem a sua proliferação (GARRET et al., 1998).

A temperatura ideal para a proliferação de *D. farinae* é de 25 a 30 °C e URA de 50 a 60% (JACKSON et al., 2005). Houve uma pequena variação nas condições climáticas encontradas no presente estudo. A alta soroprevalência dos alérgenos ocorreu em regiões com temperatura média de 21,6 °C e URA variando de 47 a 74% ao longo do ano de 2017. Apesar destes dados estarem próximos aos encontrados na literatura, um outro estudo realizado em Uberlândia – MG (BR) também demonstrou alta prevalência de Der f 1 num clima tropical, caracterizado por um inverno seco e suave, com URA variando entre 31% a 95%, e uma temperatura média de 18 a 30 °C (SOPELETE et al.,

2000). Esses dados revelam a variabilidade de temperatura e URA, onde o ácaro *D. farinae* consegue se proliferar.

Ainda que não tenha sido avaliada neste estudo a influência das estações do ano, sabe-se que as flutuações sazonais estão relacionadas com flutuações nos níveis dos alérgenos dos APD aos quais o animal é exposto (MAHMIC A & TOVEY ER, 1998). Além do mais, foi observado que ocorre uma variação nos níveis destes alérgenos entre as casas da mesma região climática, provavelmente devido às características internas das habitações como o material têxtil utilizado, mobília entre outros os quais favorecem variações da URA e, conseqüentemente, o crescimento dos ácaros (GARRET et al., 1998).

As espécies de ácaros que estão mais envolvidas com processos alérgicos situam-se dentro dos domicílios, mais do que em locais de transporte, escolas, locais de trabalho e outros locais públicos (ARLIAN, MORGAN; NEAL, 2002). Além disso, a densidade deles varia muito, tanto entre diferentes regiões geográficas, como entre os domicílios de uma mesma região e os diferentes locais do mesmo domicílio (MOYER DB et al., 1985; NELSON HS & FERNANDEZ-CALDAS, 1995; O'ROURK MK et al., 1996), o que faz com que os dados da literatura sobre a prevalência dos alérgenos dos ácaros e real exposição e sensibilização nos indivíduos predispostos seja tão variável.

Apesar de todos os fatores intrínsecos e extrínsecos que fazem com que proteínas se transformem em um alérgeno permanecerem desconhecidas, cabe salientar que o sistema imune dos cães e humanos processam suas proteínas de formas distintas, portanto, a interação com sistema imune inato pode ser diferente entre os indivíduos (MOYA et al., 2016) e este fato também pode levar a diferentes padrões de resposta à exposição aos alérgenos.

Por fim, este estudo apresentou algumas limitações, como a ausência de um grupo controle saudável para comprovação dos valores positivos ou negativos do teste sorológico. O desenvolvimento simultâneo de outro teste para detecção de IgE alérgeno específica na população estudada, como o intradérmico que é comumente utilizado na rotina clínica, talvez pudesse melhorar os valores preditivos positivos. Além disso, a escolha do anticorpo secundário policlonal permite aumentar a sensibilidade do teste, no entanto diminui a especificidade pois não apresenta um sítio específico de ligação com IgE canina. Outra limitação foi a falta de cálculo amostral no delineamento inicial para podermos afirmar a real significância dos dados encontrados, levando em consideração a população geral de cães atópicos do estado de São Paulo.

CONCLUSÃO

7) CONCLUSÃO

Nosso estudo revelou que cães com DA apresentam altos níveis de IgE alérgeno específica contra Der f2, Zen 1 e corpo do ácaro em cães com DA provenientes de regiões do interior do estado de São Paulo (Botucatu, Limeira e Campinas).

Por essa razão, são necessários mais estudos que avaliem a exposição e sensibilização aos diferentes alérgenos dos ácaros, em diferentes cidades e estações do ano, uma vez que a fauna dos ácaros está sujeita às variações climáticas, geográficas e até mesmo sócio econômicas.

Tal conhecimento certamente levará a uma melhor compreensão da associação existente entre exposição e sensibilização, permitindo assim, estabelecer a qualidade adequada dos extratos alergênicos para os testes de diagnóstico. Estes extratos contendo os alérgenos que são relevantes para os cães, bem como uma melhor seleção destes para protocolos de ASIT, tornaria este tratamento mais efetivo e promissor.

BIBLIOGRAFIA

8) BIBLIOGRAFIA

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. **Imunologia molecular e celular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.

ACKERMAN, L. Canine Allergic Disorders, In: NESBITT, G.H.; ACKERMAN, L. **Canine and Feline Dermatology: Diagnosis and Treatment**. Veterinary Learning Systems, 1998, p.110-120.

AKDIS, C. A.; BLASER, K. IL-10 induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines : two key steps in specific immunotherapy. **FASEB J.**, v. 13, p. 603-609, 1999.

AKDIS, C.A. et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/PRACTALL Consensus Group. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 61, n. 8, p. 969-987, aug. 2006.

ALVES, F. A. R.; AMANO, L. Y; MARINO, C. T. Alergias: uma visão geral. **Nosso Clínico**, v. 5, n. 28, p. 14-20, jul./ago. 2002.

AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respir. Med.**, v.106, n. 1, p. 9-14, jan. 2012.

ANDERSEN, R.M.; THYSEN, J.P.; MAIBACH, H.I. Qualitative vs. Quantitative atopic dermatitis criteria - in historical and present perspectives. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 30, n. 4, p.604–618, apr. 2016.

ANTUNES, A.A. et al. Guia prático de atualização em dermatite atópica - Parte I: etiopatogenia, clínica e diagnóstico. Posicionamento conjunto da Associação Brasileira de Alergia e Imunologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Arq. Asma. Alerg. Imunol.**, v. 1, n. 2, p. 131-156, fev. 2017.

ARLIAN, L.G.; PLATTS-MILLS T.A.E. The biology of dust mite and the remediation of mite allergens in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*, v. 107, p. 406-413, 2001.

ARLIAN, L.G.; MARJORIE, S.M.; NEAL, JS. Dust Mite Allergens: Ecology and Distribution . **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 2, n. 401–411, 2002.

ARLIAN, L.G. et al. Serum immunoglobulin E against storage mite allergens in dogs with atopic dermatitis. **Am. J. Vet. Res.**, v.64, n. 1, p. 32-36, jan. 2003.

BAMMERT, G. et al. Identification and characterization of anti-canine interleukin-31 neutralizing monoclonal antibodies. **Vet. Dermatol.**, v. 25, p. 404 (abstract), 2014.

BATARD, T. et al. Patterns of IgE sensitization in house dust mite-allergic patients: implications for allergen immunotherapy. **Allergy**, v. 71, n. 2, p. 220-229, feb. 2016.

BENSIGNOR, E. et al. Pruritus in dogs. **Vet. Dermatol.**, v. 24, n. 2, p. 292, apr. 2013.

BENSIGNOR, E.; OLIVRY, T. Treatment of localized lesions of canine atopic dermatitis with tacrolimus ointment: a blinded randomized controlled trial. **Vet. Dermatol.**, v.16, p. 52–60, 2005.

BIN, L.; LEUNG, D.Y. Genetic and epigenetic studies of atopic dermatitis. **Allergy Asthma Clin. Immunol.**, v. 12, p.52, oct. 2016.

BINOTTI, R.S. et al. House dust mites in Brazil – an annotated bibliography. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 96, n. 8, p. 1177-1184, nov. 2001.

BOUSQUET, T.J.; LOCKEY, R.; MALLING, H.J. The WHO panel members. Allergen Immunotherapy: Therapeutic vaccines for allergic diseases. A WHO position paper. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 102, n. 4, p. 558-562, 1998.

BRAVO, C.M. et al. Allergy to storage mites. **Allergy**, v. 54, n. 7, p. 769-770, jul. 1999.

BRUET, V. et al. Characterization of pruritus in canine atopic dermatitis, flea bite hypersensitivity and flea infestation and its role in diagnosis. **Vet. Dermatol.**, v. 23, n. 6, p. 487-e493, 2012.

BRYDEN, S. L. et al. Efficacy of a 0.0584% hydrocortisone aceponate spray (cortavance) for the management of pedal pruritus in atopic dogs: a pilot study (abstract). **Vet. Dermatol.**, v. 19, n. 40, 2008.

CALDERON, M. A. et al. Multiple-allergen and single allergen immunotherapy strategies in polysensitized patients looking at the published evidence. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 129, p. 929-934. 2012.

CANONICA, G.W. et al. A WAO –ARIA – GA(2)LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. **World Allergy Organ J.** E6, 17. 2013.

CANONICA, G. W. et al. Sublingual immunotherapy: World Allergy Organization position paper 2013 update. **World Allergy Organ. J.**, v. 7, n. 6, p. 1-52, 2014.

CARLOTTI, D. N. Allergen Specific Hyposensitization and other means of treating canine atopic dermatitis. In: **CONGRESS OF VETERINARY DERMATOLOGY**, 5. 2004, p.132-141

CARLOTTI, D.N. Clinical signs of canine atopic dermatitis and concurrent diseases. **Proceedings of the 7th World Congress of Veterinary Dermatology and the World Association for Veterinary Dermatology**. v. 1, p. 58-66, jul. 2012.

CASTRO, A.P.M. et al. Guia Prático para o Manejo da Dermatite Atópica - opinião conjunta de especialistas em alergologia da Associação Brasileira de Alergia e Imunopatologia e da Sociedade Brasileira de Pediatria. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, v. 29, n. 6, p.268-82, 2006.

CHARACH, M. Specific Immunotherapy in dogs with house dust mite allergy: a Double-blind placebo study. In: **Proceedings of the Annual Meeting of the American Academy of Veterinary Dermatology and American College of Veterinary Dermatology**, San Diego, p. 50. 1993.

CHERVET, L. et al. Missing C-terminal filaggrin expression, NF-kappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. **Exp. Dermatol.**, v. 19, n. 8, p. e343–346, aug. 2010.

COLLOFF, M. J. Age structure and dynamics of house dust mite populations. **Exp. Appl. Acarol.**, v.16, n.1-2, p.49-74, nov. 1992.

CORK, M. J. et al. New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v.118, n. 1, p.3-21, jul. 2006.

CORK, M. J. et al. Epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis. **J. Invest. Dermatol.**, v. 129, n. 8, p. 1892-1908, aug. 2009.

COSGROVE, S. B. et al. Long-Term compassionate use of oclacitinib in dogs with atopic and allergic skin disease: safety, efficacy and quality of life. **Vet. Dermatol.**, v. 26, n. 3, p. 171-179 e 35, jun. 2015.

COX, L. et al. Allergen immunotherapy: A practice parameter third update. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 127, n. 1, p. S1-S55. 2011.

CUNHA, V.E.S.; SILVA, M.H.; FACCINI, J.L.H. Serological identification of house dust mite allergens in dogs with atopic dermatitis. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 32, n. 9, p. 917-921, sep. 2012.

DAY, M.J. Introduction: the immunological basis of allergic diseases. In: NOLI, C.; FOSTER, A.; ROSENKRANTS W. **Vet. Allergy**. Weinheim [Alemanha]: Wiley, 2014.

DEBOER D.J.D. The future of immunotherapy for canine atopic dermatites: a review. **Vet. Dermatol.**, v. 28, n. 1, p. 25-e6. 2017.

DEBOER, D. J. Atopic Dermatitis-Pathogenesis, clinical signs and Diagnosis of the Proceedings of the North American Veterinary Conference. 2008. p.370-371.

DEBOER, D. J. Canine atopic dermatitis: new targets, new therapies. **J. Nutr.**, v. 134, n. 8, 20565-20615, aug. 2004.

DEBOER, D. J.; HILLIER, A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 81, n. 3-4, p. 271-276, 2001.

DECKERS, I.A. et al. Investigating international time trends in the incidence and prevalence of atopic eczema 1990-2010: a systematic review of epidemiological studies. **PLoS One**, v. 7, n. 7, p. e39803, 2012.

DÉVAKI, L. A.; MARCONI R.F.; MICHELLE C.R.B.; MACHADO, L.H.A. Evaluation of the concentration of allergens from mites in fur and households dust of dogs with atopic dermatitis. **Pesquisa Vet. Bras.** v. 37, n. 1, p. 41-46, janeiro 2017.

DRAAISMA, E. et al. A multinational study to compare prevalence of atopic dermatitis in the first year of life. **Pediatr. Allergy Immunol.**, v. 26, n. 4, p.359-366, jun 2015.

DRYDEN, M.W. et al. Efficacy of selamectin, spinosad and spinosad/milbemycin oxime against the KS1 Ctenocephalides felis flea strain infesting dogs. **Parasit. Vectors**, v. 25, p. 6-80, 2013.

EBNER, C. et al., Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T cells clones specific for Phl p 1 , a major grass pollen allergen. **Clin. Exp. Allergy**, v. 27, p. 1007-1015, 1997.

ESCH, R.E. Role of proteases on the stability of allergenic extracts. **Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M**, v. 85, p. 171-177. 1992.

EZEQUIEL, O.S. et al. Evaluation of the acarofauna of the domiciliar ecosystem in Juiz de Fora, state of Minas Gerais, Brazil. **Mem. Instit. Oswaldo Cruz**, v.96, n.7, p. 911-916, oct. 2001.

FARMAKI, R.; SARIDOMECHELAKIS, M.N.; LEONTIDES, L.; PAPAZHARIADOU, M.G.; GIOULEKAS, D.; KOUTINAS, A.F. Dust mite species in the households of mite-sensitive dogs with atopic dermatitis. **Vet. Dermatology**, v. 23, n. 3, p. e45, jun 2012.

FAVROT, C. et al. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. **Vet. Dermatol.**, v. 21, n. 1, p. 23-31, feb. 2010.

FCA – Unesp, 2018 - Estação Meteorológica do Depto. de Solos e Recursos Ambientais. Faculdade de Ciências Agronômicas. Lageado – UNESP – Botucatu. Resenha Climatológica (1971 a 2006) < <http://www.fca.unesp.br/#!/instituicao/departamentos/solos-recursos-ambientais/sra/estacao-meteorologica/resenha-climatologica/> > Acesso em 1/7/2018.

FEAGRI - Unicamp, 2018) Dados Médios da FEAGRI / UNICAMP. <<https://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-de-campinas.html>. > Acesso em 1/7/2018.

FERNANDEZ-CALDAS, E. Towards a more complete standardization of mite allergen extracts. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 160, n. 1, p. 1-3, aug. 2013.

FRICK, O.L.; BROOKS, D.L. Immunoglobulin E antibodies to pollens augmented in dogs by virus vaccines. **Am. J. Vet. Res.**, v. 44, n. 3, p. 440-445, mar. 1983.

FTI – Unicamp, 2017 Faculdade de tecnologia de limeira – Unicamp Annual climatological summary< <https://www.ft.unicamp.br/~meteorologia/NOAAPRYR.TXT>. > Acesso em 1/7/2018.

FURIANI, N.; SCARAMPELLA, F.; MARTINO, P.A.; PANZINI, I.; FABBRI, E.; ORDEIX, L. Evaluation of the bacterial microflora of the conjunctival sac of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. **Vet Dermatol.** 2011 Dec;22(6):490-6

GALÁN, I. et al. Association between airborne pollen and epidemic asthma in Madrid, Spain: a case-control study. **Thorax**, v. 65, n. 5, p. 398-402, may 2010.

GARRET, M.H.; HOOPER, B.M.; HOOPER, M.A. Indoorenvironmental factors associated with housedust- mite allergens (Der p 1) levels in southeastern Australian houses. **Allergy**, v.53, p. 1060–1065, 1998.

GELBER, L.E.; SELTZER, L.H.; BOUZOUKIS, J.K.; POLLART, S.M.; CHAPMAN, M.D.; PLATTS-MILLS, T.A.E. Sensitization and exposure to indoor allergens as risk factors for asthma among patients presenting to hospital. **Am Rev Respir Dis**, v. 147, p. 573– 578, 1993.

GONZALEZ, M.E. et al. Cutaneous microbiome effects of fluticasone propionate cream and adjunctive bleach baths in childhood atopic dermatitis. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v. 75, n.3, p. 481-93, sep. 2016.

GORMAN, N.T. Imunologia. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4.ed. São Paulo: Manole, v. 2, p. 2735-2765, 1997.

GRIFFIN C.E. & HILLIER A. Veterinary Immunology and Immunopathology, n.81, p.363-383, 2001.

GRIFFIN, C.E. & DEBOER, D.J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 81, n. 3-4, p. 255-269, 2001.

GRIFFIN C.E. & HILLIER A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. **Vet Immunol Immunopathol.** v.81, n.3-4, p.363-83, 2001

GROSS, T. L. et al. Doenças de pele do cão e do gato: Diagnóstico Clínico e Histopatológico. 2a ed. Rio de Janeiro: **Roca**; 2005. p.200-206.

GUTOWSKA-OWSIK, D. et al. IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. **Exp. Dermatol.**, v.21, n. 2, p.104-110, feb. 2012. .

HAGEL, I. et al. Modulation of the allergic reactivity of slum children by helminthic infection. **Parasite Immunol.**, v. 15, n. 6, p.311-315, jun. 1993.

HALLIWELL, R.E.W. Atopic Dermatitis: Clinical Signs and Diagnosis. **Proceedings of the 4 th World Congress of Veterinary Dermatology**, p.7-12, 2000.

HEO, W.I. et al. The role of interleukin-17 in mouse models of atopic dermatitis and contact dermatitis. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 40, n.6, p. 665-671, aug. 2015.

HILLIER, A.; LLOYD, D.H.; WEESE, J.S.; BLONDEAU, J.M.; BOOTHE, D.; BREITSCHWERDT, D.; GUARDABASSI, L.; PAPICH, M.G.; RANKIN, S.; TURNIDGE, J.D.; SYKES, J.E. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for companion animal infectious diseases). **Vet. Dermatol.**, v. 25, p.163-e43, 2014.

HILLIER, A. Definitively diagnosing atopic dermatitis in dogs. **Vet. Med.**, v. 97, p. 198-208, 2002.

HILLIER, A. Dermatite atopica. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Livro manual Saunders: clínica de pequenos animais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Roca. Cap. 46. p. 490-496. 2008.

HILLIER, A.; KWOCHKA, K.W.; PINCHBECK, L.R. Reactivity to intradermal injection of extracts of *Dermatophagoides farinae* *Dermatophagoides pteronyssinus*, house dust mite mix, and house dust in dogs suspected to have atopic dermatitis: 115 cases (1996–1998). **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v. 217, p. 536–540, 2000.

HILLIER, P.B.; DEBOER, D.J. The ACVD Task Force on Canine Atopic Dermatitis (IV); environmental allergens. **Vet. Immunopathology**, v. 1, p. 159-168, 2001.

HILLIER, A.; GRIFFIN, C. E. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 81, n. 3-4, p. 147-151, 2001.

HON, K.L.; LEUNG, A.K.; BARANKIN, B. Barrier repair therapy in atopic dermatitis: an overview. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v.14, n.5, p.389-99, 2013.

HOWELL, M.D. et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 124, n. 3, p. R7-R12, sep. 2009.

JACKSON P.A.; FOSTER P.A.; HART J.B.; HELPS R.C.; SHAW E.S. Prevalence of house dust mites and *dermatophagoides* group 1 antigens collected from bedding, skin and hair coat of dogs in south-west England. **Vet. Dermatol.** v. 16, p. 32-38, 2005.

JENSEN-JAROLIM, E. Aluminium in allergies and allergen immunotherapy. **World Allergy Organ. J.**, v. 8, n. 7. 2015.

JUTEL, M. et al. IL10 and TGF β cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. **Eur. J. Immunol.**, v. 33, p. 1205-1214. 2003.

KAKINUMA, T.; NAKAMURA, K.; WAKUGAWA, M.; MITSUI, H.; TADA, Y.; SAEKI, H. et al. Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: serum thymus and activation –regulated chemokine level is closely related with disease activity. **J Allergy Clin Immunol**, v. 107, p.535-41, 2001.

KANTOR, R.; SILVERBERG, J.I. Environmental risk factors and their role in the management of atopic dermatitis. **Exp. Rev. Clin. Immunol.**, v.13, n.1, p.15-20, 2017.

KATAYAMA, I. et al. Japanese Society of Allergology. Japanese guidelines for atopic dermatitis 2017. **Allergol. Int.** v. 66, n. 2, p. 230-47, 2017.

KIM, H.J.; KANG, M.H; PARK, H.M. Common allergens of atopic dermatitis in dogs: comparative findings based on intradermal tests. **J Vet Sci**, v. 12, p. 287-290, 2011.

KRONQVIST, M. et al. Skin Prick test and serological analysis with recombinant group 2 allergens of dust mites *Lepidoglyphus destructor* and *Tyrophagus putrescentiae*. **Clin. Exp. Allergy**, v.30, p. 670-6, 2000.

LARSSON & LUCAS. **Tratado de Medicina Externa: Dermatologia veterinária**. São Caetano: Interbook, 2016.

LEUNG DY, BOGUNIEWICZ M. Advances in allergic skin diseases. **J Allergy Clin Immunol** 2003 March ;111 (3 Suppl):s805-12. Review. 2003.

LEUNG, D.Y. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 105, n.5, p. 860–876, 2000.

LITTLE, P. R.; et al. A blinded, randomized clinical Trial comparing the efficacy and safety of oclacitinib and ciclosporin for the control atopic dermatitis in client-owned dogs. **Vet. Dermatol.**, v. 26, n. 1, p. 23-30, fev. 2015.

LOEFFLER A.; et. al. First report of multiresistant, *mecA*- positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. **Vet. Dermatol.**, v. 18, p. 412-421, 2007.

LOEWENSTEIN, C.; MUELLER, R. S. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. **Vet. Dermatol.**, v. 20, p. 84-98, 2009.

LOFLATH, A.; et al. The efficacy of a commercial shampoo and whirlpooling in the treatment of canine pruritus – a double-blinded, randomized, placebocontrolled study. **Vet. Dermatol.**, v. 18, p. 427–431, 2007.

LYNCH, N.R. et al. Effect of anthelmintic treatment on the allergic reactivity of children in a tropical slum. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 92, n. 3, p. 404-411, sep. 1993.

MAC DONALD, J. M. Rush hyposensitization in the treatment of canine atopy. In: **Proceedings of the Annual Meeting of the American Academy of Veterinary Dermatology and the American College of Veterinary Dermatology**, Maui, p. 95-7, 1999.

MADHURANTAKAM, C. et al. Crystal structure of the dog lipocalin allergen Can f 2: Implications for Cross-reactivity to the Cat Allergen Fel d 4. **J. Mol. Biol.**, v. 401, n.1, p. 68-83, aug. 2010.

MAHMIC, A., TOVEY, E.R.: House-dust-mite allergen (Der p 1) levels in university colleges. **Allergy**, v. 53, p. 976–980, 1998.

MANOLIS, N. et al. Assessment of cross-reactivity among five species of house dust and storage-mites. **Vet. Dermatol.**, v. 19, n. 2, p. 67-76, apr. 2008.

MARSELLA, R.; SOUSA, C. A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIII): threshold phenomenon and summation of effects. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 81, n. 3-4, p. 251-253, 2001.

MARSELLA, R. Atopy: New targets and new therapies. **Vet. Clin. North. Am. Small Anim. Pract.**, v. 36, n. 1, p. 161-174, jan. 2006.

MARSELLA, R.; et al. Investigation on the clinical efficacy and safety of 0.1% tacrolimus ointment (protopic) in canine atopic dermatitis: a randomized, double-blinded, placebo-controlled, cross-over study. **Vet. Dermatol.**, v. 15, p. 294–303. 2004.

MARSELLA, R.; SAMUELSON, D. Unravelling the skin barrier: a new paradigm for atopic dermatitis and house dust mites. **Vet. Dermatol.**, v. 20, p. 533- 538, 2009.

MARSELLA, R.; SARIDOMICHELAKIS, M.N. Environmental and oral challenge with storage mites in beagles experimentally sensitized to *Dermatophagoides farina*. **Vet. Dermatol.**, v.21, p.105–111, 2010.

MASUDA, K. et al. In vivo and in vitro tests showing sensitization to Japanese cedar (*cryptomeria japonica*) pollen allergen in atopic dogs. **J. Vet. Med. Sci.**, v. 62, p. 995-1000, 2000.

MASUDA,K.T.; FUJIWARA, S.K.K.; HASEGAWA, A.Y.; YASUEA, H.; YAMASHITA, K.; DEBOER, D.J; DE WECKA, L.S.M. IgE sensitivity and cross-reactivity to crude and purified mite allergens (Der f 1 , Der f 2, Der p 1, Der p 2) in atopic dogs sensitive to *Dermatophagoides* mite allergens . **Vet Immunolol. Immunopathol** v. 72, p. 303-313, 1999.

MAYNARD, L.; REME, C. A.; VIAUD, S. J. Comparision of two shampoos for the treatment of canine *Malassezia* dermatitis: a randomised controlled triual. **J. Small Anim. Pract.** v. 52, n. 11, p. 566-572, 2011.

McCALL, C. et al. Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.78, p. 231-247, 2001.

MENDELSON, C.; ROSENKRANTZ, W.; GRIFFIN, C.E. Practical cytology for inflammatory skin diseases. **Clin. Tech. Small. Anim. Pract.**, v. 21, n. 3, p.117–27, 2006.

MICHEL, G. M.; et al. A blinded randomized placebo-controlled trial of the safety of LOKIVETMAB (ZTS-00103289), a caninized anti canine IL31, monoclonal antibody in client owned dogs with atopic dermatitis. **Vet. Dermatol.**, v. 27, n. 6, p. 505-e136, dec. 2016.

MILLER, W. H.; et al. **Small Animal Dermatology**. 7^o. ed. St Loui: Elsevier, 2013.

MILLER, W.H.; GRIFFIN, C.E.; CAMPBELL, K.L. **Small Animal Dermatology**. 7. ed. St. Louis: W.B. Elsevier; 2013. p. 57–107.

MOINGEON, P. Update on immune mechanisms associated with sublingual immunotherapy: practical implications for the clinician. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 1, p. 228-241, 2013.

MOINGEON, P.; et al. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. **Allergy**, v. 61, p. 151-165. 2006.

MORRIS, D. O.; et al. Recommendations for approaches to meticilin-resistant staphylococcal infections of small animals: diagnosis, therapeutic considerations and preventative measures. Clinical consensus Guidelines of Association for Vetreinary Dermatology. **Vet Dermatol**, v. 28, p. 304-e69. 2017.

MOYA, R., CARNÉS, J., SINOVAS, N., RAMIÓ, L., BRAZIS, P., PUIGDEMONT, A. 2016. Immunoproteomic characterization of a Dermatophagoides farinae extract used in the treatment of canine atopic dermatitis. **Vet Immunol Immunopathol**. v. 1, n. 180, p. 1-8, nov 2016.

MOYER, D.B., NELSON, H.S., ARLIAN, L.G. House dust mites in Colorado. **Ann Allergy**, v. 55, p. 680–682, 1985.

MRABET-DAHBI, S.; MAURER, M. Does allergy impair innate immunity? Leads and lessons from atopic dermatites. **Allergy**, v. 65, n. 11, p.1351-1356, nov. 2010.

MUELLER, R. S.; BETTENAY, S. Long –term immunotherapy of 146 dogs with atopic dermatites- a retrosocative study. **Australian Veterinary Practioner**, v. 26, p. 126-132. 1996.

MUELLER, R. S.; et al. A review of topical therapy for skin infections with bactéria and yeast. **Vet. Dermatol.**, v. 23, p. 330-341. 2012.

MUELLER, R. S.; et al. Conventional and rush immunotherapy in canine atopic dermatitis. In: HILLIER, A.; FOSTER, A. P.; KWOCHKA, K. W. **Advances in Veterinary Dermatology**, v. 5, p. 60–69, 2005.

MUELLER, R.S.; BETTENAY, S.; TAN, W. Evaluation of the safety of na abbreviated course of injections of allergen extracts (rush immunotherapy) for the treatment of dogs with atopic dermatites. **Am J Vet Res**, v. 62, p. 307-310. 2001.

MULLER, G.; KIRK, R. **Small Animal Dermatology**. 7. ed. St. Louis: Mosby; 2013.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.

NELSON, H.S., FERNANDEZ-CALDAS, E.: Prevalence of house dust mites in the Rocky Mountain states. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 75, p.337–339, 1995.

NESBITT, G. H.: Canine allergic inhalant dermatitis: a review of 230 cases. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 172, p. 55-60, 1978.

NOLI, C.; BERNADINA, W.E.; WILLEMSE, T. The significance of reactions to purified fractions of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* in canine atopic dermatites. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 52, n. 3, p. 147-157, jul. 1996.

NUTTALL, T., URI, M., HALLIWELL, R. Canine atopic dermatitis -what have we learned? **Vet Rec**, v. 172, p. 201-207, 2013.

NUTTALL, T. J. A retrospective survey hyposensitization therapy In: KWOCKHA, K.W.; WILLEMSE, A. VON TSCHARNER, C. **Adv. Vet. Dermatol.**, vol. 3. Boston: Butterworth Heinemann, 1998, p. 507-8.

NUTTALL, T. J. et al. Peripheral blood mononuclear cell responses to major and minor *Dermatophagoides* allergens in canine atopic dermatites. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v.84, p. 143-150, 2002.

NUTTALL, T.J. et al. Efficacy of a 0.0584% hydrocortisone aceponate spray in the management of canine atopic dermatitis: a randomised, double blind, placebo-controlled trial. **Vet Dermatol**, v. 20, p. 191–198. 2009.

NUTTALL, T.J. et al. House dust and forage mites allergens and their role in human and canine atopic dermatites. **Vet. Dermatol.**, v.17, n. 4, p. 223-235, aug. 2006.

NUTTALL, T.J.; REECE, D.; ROBERTS, E. Life long diseases need life long treatment: long term safety of ciclosporin in canine atopic dermatitis. **Vet Rec.**, v. 174, p.3-12, 2014.

NUTTALL, T.J.; LAMB, J.R.; HILL, P.B. Characterization of major and minor *Dermatophagoides* allergens in canine atopic dermatites. **Res. Vet. Sci.**, v. 71, p. 51-57, 2001.

ODHIAMBO, J.A. et al. Global variations in prevalence of eczema symptoms in children from isaac phase three. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 124, p. 1251–1258, 2009.

OKAMURA, N.; KIUCHI, S.; TAMBA, M.; KASHIMA, T.; HIRAMOTO, S.; BABA, T.; DACHEUX, F.; DACHEUX, J.L.; SUGITA, Y.; JIN, Y.Z. A porcine homolog of the major secretory protein of human epididymis, HE1, specifically binds cholesterol. **Biochim. Biophys. Acta** v. 1438, p. 377–387, 1999.

OLIVRY T.; DUNSTON, M. STANLEY; FAVROT C.; PRELAUD P.; TSUKUI T. The novel high molecular weight Dermatophagoides farinae protein Zen 1 is a major allergen in North American and European mite allergic dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 28, p. 177-e38, 2017.

OLIVRY T.; SARIDOMICHELAKIS, M.; NUTTAL, T.; BESINGNOR, E.; GRIFFIN C; HILL PB and International Committee on Allergic Diseases of Animals (ICADA). Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. **Vet Dermatol.** v. 25, n. 2, p. 77-85, e25. 2014.

OLIVRY, T. et al. Characterization of the inflammatory infiltrate during IgE-mediated late phase reactions in the skin of normal and atopic dogs. **Vet. Dermatol.**, v.12, n. 1, p. 49–58, feb. 2001a.

OLIVRY, T.; HILL, P.B. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VIII): is the epidermal lipid barrier defective? **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 81, n. 3-4, p. 215-218, sep. 2001b.

OLIVRY T., DEBOER D.J., PRELAUD P., BENSIGNOR E. International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. Food for thought: pondering the relationship between

canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. **Vet Dermatol.**, v.18, n.6, p.390–1, 2007.

OLIVRY, T. et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. **Vet. Dermatol.**, v. 21, n. 3, p. 233–248, jun. 2010a.

OLIVRY, T. et al. Interventions for atopic dermatitis in dogs: a systematic review of randomized controlled trials. **Vet. Dermatol.**, v. 21, p 4–22. 2010b.

OLIVRY, T.; DUNSTON, S.M.; FAVROT, C.; et al. The novel high molecular weight *Dermatophagoides farinae* protein Zen 1 is a major allergen in North American and European mite allergic dogs with atopic dermatitis. **Vet Dermatol.**; v. 28, n. 177, p. e38, 2016.

O'ROURK, M.K.; MOORE, C.L.; ARLIAN, L.G. Prevalence of house dust mites from homes in the Sonoran Desert, Arizona. In **Aerobiology**. Edited by Muilenberg M, Burge H. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, CRC Press; 1996:67–80.

OSAWA, R.; AKIYAMA, M.; SHIMIZU, H. Filaggrin gene defects and the risk of developing allergic disorders. **Allergol. Int.**, v. 60, n.1, p.1-9, 2011.

PARK, S.H.; LIM, D.H.; SON, B.K. et al. Sensitization rates of airborne pollen and mold in children. **Korean J Pediatr**, v. 55, p. 322-329, 2012.

PICCO, F. et al. A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. **Vet. Dermatol.**, v.19, n.3, p.150–155, 2008.

PLATTS-MILLS, T.A.E.; VERVLOET, D.; THOMAS, W.R.; AALBERSE, R.C.; CHAPMAN, M.D. Indoor allergens and asthma: Report of the Third International Workshop. *J Allergy Clin Immunol*, v. 100, p. S1–S24, 1997.

RAAP, U. et al. IL-31 significantly correlates with disease activity and Th2 cytokine levels in children with atopic dermatitis. *Pediatr. Allergy Immunol.*, v. 23, p. 285-8, 2012.

REEDY, L.M., MILLER, W.H., WILLEMSE, T. (Eds.). Allergic Skin Diseases of the Dog and Cat. 2. ed. London: W.B. **Saunders**, 1997. p. 33–44.

ROSENBAUM, M. R; ESCH, R. E; SCHWARTZMAN, R. M. Effects of mold proteases on the biological activity of allergenic pollen extracts. *Am J Vet Res*, v. 57, p. 1447-1452. 1996.

ROSSER, JR. E. J. Aqueus hyposensitization in the treatment of canine atopic dermatitis: a retrospective study of 100 cases. In: KWOCHKA, K. W.; WILLEMSE, A.; VON TSCHARNER, C. **Advances in Veterinary Dermatology**, vol.3. Oxford: Butterworth Heinemann, 1998, p. 169-176.

ROSYCHUK, R. A. W. Update on the management of canine atopy. In: **Proceedings of the North American Veterinary Conference.**, p.309-311, 2004.

ROUDEBUSH, P. Consumption of essential fatty acids in selected. **Veterinary Dermatology & American College of Veterinary Dermatology**. Norfolk, VA, 2001.

SAEVIK, B. K.; ULSTEIN, T. L; LARSEN, H. J. Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of allergen-specific IgE antibodies in dogs. *Res Vet Sci*, v. 74, n. 1, p. 37-45. 2003.

SALVADOR, M. C. **Padronização de técnica histoquímica de mensuração de lipídios da epiderme de cães e mensuração de lipídios da epiderme de cães atópicos antes e após reposição tópica de lipídios e ceramidas.** 2014. 100 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2014.

SCHNABL, B. et al. Results of allergen-specific immunotherapy in 117 dogs with atopic dermatitis. **Vet. Rec.**, v. 158, p. 81-85. 2006.

SCHUMANN, R.J.; MORGAN, M.S.; GLASS, R. et al. Characterization of house dust mite and scabies mite allergens by use of canine sérum antibodies. **Am J Vet Res**; v. 62, p. 1344-1348, 2001.

SCOTT, D.W.; MILLER JR, W. H.; GRIFFIN, C. E. Doenças Imunológicas da Pele. In: **Dermatologia de Pequenos Animais**, 5. ed. Rio de Janeiro: Interlivros. 1996. p. 449-580.

SCOTT, D.W.; MILLER JR, W. H.; GRIFFIN, C. E. Skin immune system and allergic skin diseases. In: **Small animal dermatology**. 6. ed. Philadelphia: Elsevier, 2001. c. 8, p. 543-666.

SEHRA, S. et al. Scratching the surface: towards understanding the pathogenesis of atopic dermatitis. **Crit. Rev. Immunol.**, v. 28, n. 1, p. 15–43, 2008.

SHIDA, M.; et al. Allergen- specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. **Vet. Immunol. Immunopathol**, v. 102, p. 19-31. 2004.

SIDENIUS, K.E. et al. Allergen cross-reactivity between house dust mites and other invertebrates. **Allergy**, v. 56, p. 723-33, 2001.

SOPELETE, M., SILVA, D. A. O., ARRUDA, L. K., CHAPMAN, M. D. & TAKETOMI, E. A. Dermatophagoides farinae (Der f1) and Dermatophagoides pteronyssinus (Der p1) allergen exposure among subjects living in Uberlandia, Brazil.

International Archives of Allergy and Immunology., v. 122, p. 257-263, 2001.

SOUWER, Y. et al. IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. **Curr. Opin. Immunol.**; v.22, n.6, p.821-826, 2010.

SOUZA, C.A.; MARSELLA, R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIII): Threshold phenomenon and summation of effects. *Vet Immunolol Immunopathology* 2001. Sep 20;81 (3-4):251-4.

SOUZA, C.P.; ROSYCHUK, R.A.W.; CONTRERAS, E.T.; et al. A retrospective analysis of the use of lokivetmab in the management of allergic pruritus in a referral population of 135 dogs in the western USA. **Vet Dermatol**; v. 29, n. 6, p. 489-e164, 2018.

STURE, G.H., HALLIWELL, R.E., THODAY, K.L., VAN DEN BROEK, A.H., HENFREY, J.I., LLOYD,D.H., MASON, I.S., FERGUSON, E. Canine atopic disease: the prevalence of positive intradermal skin tests at two sites in the north and south of Great Britain. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 44, p. 293–308, 1995.

TAY, Y.K. et al. The prevalence and descriptive epidemiology of atopic dermatitis in singapore school children. **Br. J. Dermatol.**, v. 146, p.101–106, 2002.

TEE, R.D. Allergy to storage mites. **Clin. Exp. Allergy**, v. 24, p. 636-640, 1994. SAI

THOMAS, W.R.; SMITH, W.; HALES, B.J. House dust mite allergen characterization: Implication for T-cells responses and immunotherapy. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v.115, n.1, p.9-14, jan. 1998.

THOMAS, W.R. Hierarchy and molecular properties of house dust mite allergens. **Allergol. Int.**, v. 64, p. 304-311, 2015.

THOMPSON, J. P. Moléstias imunológicas. In: ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1997. v. 2, p. 2766-2802.

TOMAS. et al. Efficacy and tolerability of once- daily cephalexin in canine superficial pyoderma: na open controlled study. **J. Small Anim. Pract.**, v. 49, n. 8, p. 384-391, ago. 2008.

TSUKUI, T.; SAKAGUCHI, M.; KURATA, K. et al. Analysis of house dust mite (*D. farinae*) allergens in canine atopic dermatitis . **Vet. Dermatology** 2007; 18:194-195.

VAN DAMME, C. M. et al. Altered cutaneous expression of β -defensins in dogs with atopic dermatitis. **Mol. Immunol**, v. 46, n. 13, p. 2449-2455, ago. 2009.

VAN SMEDEN, J.; BOUWSTRA, J.A. Stratum corneum lipids: their role for the skin barrier function in healthy subjects and atopic dermatitis patients. **Curr. Probl. Dermatol.** v. 49, p. 8-26, 2016.

VANDRESEN, G.; FARIAS, M. R. Efficacy of a hydrolised soya protein dry food in the controlo f chronic pruritus in dogs with atopic dermatites. Abstracts of the 27 th Annual Congresso f the ECVD-ESVD, 11-13 September, 2014, Salzburg, Austria. **Vet. Dermatol.**, v. 25, p. 383-405, 2014.

VARNEY, V. A; et al. Influence of grass pollen immunotherapy on celular infiltration and cytokine mRNA expression. During allergen- induced late –phase cutaneous responses. **J. Clin. Invest.**, v. 92, p. 644-651, 1993.

VERHOEF, A.; et al. Cell epitope immunotherapy induces a CD4 T cell population with regulatory activity. **PLoS Med.**, mar. 2005.

WANG, A. X.; LANDÉN, N. X. New insights into T cells and their signature cytokines in atopic dermatitis. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v. 67, p. 601-610, 2015.

WASSOM, D.L.; GRIEVE, R.B. In vitro measurement of canine and feline IgE: a review of FcεR1-α based assays for detection of allergen –reactive IgE. **Veterinary Dermatology**, v.9, p.173-178, 1998.

WEBER, E.; HUNTER, S.; STEDMAN, K. et al. Identification, characterization, and cloning of a complementary DNA encoding a 60-kd house dust mite allergen (Der f 18) for human beings and dogs. **J Allergy Clin Immunol**, v. 112, p. 79–86, 2003.

WEDI, B.; RAAP, U.; LEWRICK, H.; KAPP, A. Delayed eosinophil programmed cell death in vitro: a common feature of inhalant allergy and extrinsic and intrinsic atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol**, v. 100, p. 536-43, 1997.

WEIDINGER, S. et al. Loss-of-function variations within the filaggrin gene predispose for atopic dermatitis with allergic sensitizations. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 118, p. 214–219, 2006.

WHITE, P.D. Atopia. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual saunders: clínica de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 1998. p. 343-351.

WHO/IUIS - World Health Organization and International Union of Immunological Societies Allergen Nomenclature Sub-committee. < <http://www.allergen.org> > Acesso em 10/10/2017.

WOOD, S.H. et al. Despite identifying some shared gene associations with human atopic dermatitis the use of multiple dog breeds from various locations limits detection of gene associations in canine atopic dermatitis. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 138, n. 3, p. 193-197, dec. 2010.

WREN, J. A. et al. A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the Janus Kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel) in client-owned dogs with atopic dermatitis, **Vet. Dermatol.**, v.24, n. 6, p.587-597 e 142-142, dec. 2013.

YAMASHITA, K.; FUJIWARA, C.; AZUMA, R. et al. Determination of antigenic proteins of house dust mites in 90 dogs suffering from atopic dermatitis. **J Vet Med Sci**; v. 64, p. 673-676, 2002.

YASUEDA, H.; MITA, H.; YUI, Y.; SHIDA, T. Comparative analysis of physicochemical and immunochemical properties of the two major allergens from *Dermatophagoides pteronyssimus* and the corresponding allergens from *Dermatophagoides farinae*. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 88, p. 401-407, 1989.

YAZBEK A.V. B. & LARISSON C. E. Avaliação da eficácia da ciclosporina no tratamento de cães atópicos. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.49, n.5, p.360-366, 2012.

YOUNG, R. et al. Comparative in vitro efficacy of antimicrobial shampoos: a pilot study. **Vet. Dermatol.**, v. 23, p. 36-38, 2011.

ZACHARY J. F.; MCGAVIN, M. D. **Bases da patologia em veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Mosby, 2013.

ZUR, G.; IHRKE, P. J.; WHITE, S. D. Canine Atopic Dermatitis: a Retrospective Study of 266 Cases Examined at the University of California, Davis (1992-1998) Part I. Clinical Features and Allergy Testing Results. **Vet Dermatol**, v.13, n. 2, p. 89-102, 2002.

TRABALHO CIENTÍFICO

9) TRABALHO CIENTÍFICO

Artigo enviado para “Veterinary Dermatology” em 08/10/2018

<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/13653164>

Title Page

Evaluation of Seroprevalence to Der f 2 and Zen 1 Allergens of the House Mite (*Dermatophagoides farinae*) to the Serological Test in Atopic Animals

Atopic dogs: Der f 2 and Zen 1 seroprevalence

Luiz Henrique de Araújo Machado*, Ana Paula Di Martino Frezza*.

* Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho” – Rua Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n, Rubião Júnior, Botucatu – SP, BR. 18618-681.

Correspondence: LHAM, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Universidade Estadual Paulista “Júlio De Mesquita Filho”. Rua

Prof. Doutor Walter Mauricio Correa, s/n, Rubião Júnior, Botucatu – SP, BR. 18618-681.
Phone: (+55) 14 3880-2043. E-mail: henrique.machado@unesp.br.

Manuscript

ABSTRACT

Background: Canine atopic dermatitis (CAD) is a chronic, inflammatory and pruritic disease of the skin resulting from the sensitization of the host genetically predisposed to an exacerbated production of IgE antibodies, which are mainly directed against environmental allergens, such as the house dust mite species *Dermatophagoides farinae*. The standardization of allergenic extracts or immunotherapy protocols are not yet well described in the literature.

Objective: We aimed to evaluate the seroprevalence of Der f 2, Zen 1 and crude *Dermatophagoides farinae* extract allergens in atopic dogs.

Methods: The serum of 85 animals clinically confirmed atopic dermatitis animals from the state of São Paulo (Brazil) was collected, and indirect ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) was conducted for the detection of allergen-specific IgE.

Results: The minimum age of onset of the disease varied from 2 to 134 months; 61.2% were females and 67% were purebred, mainly Shih Tzu, Lhasa Apso and Poodle. Seropositivity, according to ELISA, 81 sera samples were tested, and occurred in 96% of the animals for Der f 2, 91% for Zen 1 and 96% for *Dermatophagoides farinae* crude proteins.

Conclusion: Due to this high prevalence, we suggest that Der f 2 and Zen 1 can be considered as major allergens for these dogs, and we observed the importance of the *D. farinae* species for AD in the state of São Paulo. However, the actual rate of exposure and sensitization to its numerous allergens in atopic dogs in Brazil remains unknown. Thus, further studies on house dust mite allergens are required, aiming at the improvement of both serological and intradermal tests in order to perform highly effective allergen-specific immunotherapy (ASIT).

Key words: Canine atopic dermatitis, *D. farinae*, Der f 2, Zen 1, seroprevalence.

Introduction

Canine atopic dermatitis (CAD) is a chronic inflammatory and pruritic disease¹⁻³ that represents approximately 20% of the dermatological cases assisted.⁴ It ranks second among all causes of pruritus in dogs, whilst the first is allergy to fleabites.^{5,6}

The disease manifests itself in several ways according to whether it is the acute or chronic stage of disease, presence of secondary infections and extent of lesions (localized versus generalized), and pruritus, a cardinal sign of CAD, and may be perennial or seasonal, depending on the allergens involved⁷. Its diagnosis is obtained from anamnesis data, physical examination and clinical evaluation based on the criteria established by Favrot et al.⁸, after discarding other pruritic dermatoses.⁶ It should not be diagnosed by in-vitro (serological) or in-vivo (intradermal testing, IDT) allergy tests alone, as such tests are useful only after completion of the CAD diagnosis, in order to select allergens for ASIT.^{9,10}

CAD treatment is multimodal and should be individualized for each patient.¹¹ However, the only therapeutic modality capable of altering the course of the disease in the long term is ASIT¹², in which the allergens to be used in the preparation of vaccines are selected through tests in the atopic animal, such as serological or IDT.^{13,14}

CAD development is characterized by a dysfunction of the epidermal barrier,¹⁵ associated with a dysregulated response of the immune system, in which there is predominance of a Th2-response pattern during exposure to allergens, resulting in the

intense production of various interleukins, such as IL-4¹⁶, as well as abruptly increased IL-31, which induces severe pruritus and further worsens the barrier deficiency.¹⁷

In addition to the Th2 response, a Th1 response also occurs in the chronic phase of the disease. The main reactions involved in this immunological imbalance are type-I (immediate) and possibly type-IV (late) hypersensitivity,¹⁸⁻²¹ mainly involving elevated serum levels of immunoglobulin E (IgE), stimulated by IL-4 and the activation of inflammatory mediators.²² There is also an atopy subtype that is referred to as “intrinsic” or “nonallergic”, in which there is no detection of the response to IgE despite the presence of clinical signs typical of CAD.²³

Upon the onset of CAD, in addition to immunopathogenic factors, there is also a combination of environmental and genetic factors, mainly affecting the following breeds: West Highland White Terrier, Shih Tzu, Lhasa Apso, Pug, Labrador, Scotch Terrier, Dalmatian, Irish Setter, Golden Retriever, Miniature Schnauzer and mixed-breed dogs.²⁴ Furthermore, approximately 70% of dogs develop the disease between one and three years of age.²⁴⁻²⁶

As regards the environmental factors involved, the high exposure of dogs to house dust mites (HDM) is noteworthy, mainly due to the longer indoor stay of these animals²⁷, and CAD development is affected by climatic conditions, such as temperature and air humidity.²⁸

In western countries, *Dermatophagoides farinae* (Der f) is related to more than 70% of the CAD cases identified.²⁹ To this date, as regards the sensitization pattern of atopic dogs in Brazil, the major *D. farinae* allergens for dogs are considered to be Der f 15 (98-109 kDa) and Der f 18 (60 kDa)²⁹⁻³¹ and the minor ones are Der f 2 (14 kDa) and Der f 1 (25 kDa).³² Another Der f allergen with high molecular weight (188 kDa) has also been identified as Zen 1, which may present cross-reactivity with Der f 15.^{26,30,33}

Hence, this study aimed at evaluating the seroprevalence for Der f 2, Zen 1 and crude proteins of *Dermatophagoides farinae* in the serum of atopic dogs in regions of the state of São Paulo using a serological test for detection of allergen-specific IgE.

Materials and Methods

Subjects, Study Site and Environmental Characteristics

This study was conducted on 85 dogs of which 61 were from the Veterinary Dermatology Service of FMVZ-UNESP in Botucatu, and the remaining 24 were from private clinics located in the cities of Campinas and Limeira.

In the city of Botucatu, with a humid subtropical climate, the average annual temperature, as recorded by the Meteorological Station of the Department of Soils and Environmental Resources - Faculty of Agricultural Sciences, UNESP (Lageado), is 20.3 °C, with a maximum of 35.1 °C and a minimum of 6.6 °C, while the average annual air relative humidity is 74%.³⁴ In Limeira, whose climate is high-altitude tropical with dry winters, the description made by the Faculty of Technology of Unicamp for the year 2017 was of an average annual temperature of 21.5 °C, with a maximum of 27.3 °C and a minimum of 16 °C.³⁵ No relative air humidity values were available. In the city of Campinas, which has a high-altitude tropical climate, the average annual temperature for the period from 1988 to 2008, as reported by the Faculty of Agricultural Engineering of Unicamp, was 22.4 °C, with a maximum of 28 °C and a minimum of 16.8 °C, and the relative annual air humidity reached, on average, 47%.³⁶

Inclusion Criteria

All the dogs included in this study were diagnosed with CAD, according to the criteria by Favrot, et al.⁸ They met at least five of the eight criteria, and the diagnosis was

compatible with their history and clinical signs, and exclusion of other pruritic dermatoses.³⁷ The dogs were given a restriction diet with unprecedented protein for eight weeks in order to rule out food hypersensitivity, and rigorous control of fleas and ticks was instituted so as to rule out allergy to ectoparasite bites. The animals that participated in the study showed a variable age range and consisted of males and females of different races. Except for presenting CAD, the animals in this study were healthy in relation to other organic systems.

At the time of blood collection by jugular venipuncture and its subsequent serum collection, the animals could be submitted to CAD therapy with the use of antihistamines, omega 3, systemic or topical glucocorticoids and oclacitinib, excluding only those that, at the moment, were receiving ASIT.

Biological Material Collection

In order to obtain samples, 10 mL of blood was collected into a dry tube from the dogs' jugular vein by venipuncture. To separate the serum, the samples were centrifuged at 2,530 rpm for four minutes, serum was collected and aliquoted, and properly stored in liquid nitrogen (-196 °C) until they were sent for measurements to the company *Zenobio*, Fukushima, Japan. Serological tests were conducted for the detection of allergen-specific IgE for Der f 2, Zen 1 and DF. The samples were collected in different climatic seasons (spring, summer, autumn and winter) in 2017.

Laboratory Procedure

The serological test used for all canine samples was the indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Briefly, after the process of coating wells of 96 well plates with 100 µL of antigen (recombinant Der f 2, at the final concentration of 50

µg/mL; natural Zen 1 purified from *D. farinae* was added at a concentration of 1 µg/mL; DF at a concentration of 0.1 µg/mL), 100 µL of the diluted samples (1:10) were added to the wells in duplicate and used for the test, in addition to positive and negative controls (serum from dogs sensitized with the tested antigen and serum from healthy laboratory dogs). After successive incubations and washes, 100 µL of canine anti-IgE antibody (A40-125P, Bethyl Laboratories, Inc. Montgomery) at a concentration of 1:10,000, conjugated to the horseradish peroxidase (HRP) enzyme was applied. Substrate tetramethylbenzidine (TMB) was added, and the reaction was blocked by the addition of sulfuric acid. The optical density (OD) was read at a wavelength of 450 nm and a reference wavelength of 630 nm using a multiwell plate reader. The results were considered positive when the OD exceeded 0.2.

This study was approved by the Botucatu Ethics Committee for Animal Use (*Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA*), under registration number 198/2016.

Results

Characteristics of Animals

Among the 85 dogs included in this study, the majority were females (n=52, 61.2%) (Figure 1). These dogs had no prior information concerning sterilization.

The highest prevalence of atopic animals was for purebred dogs (PB; n=57; 67%), affecting mainly Shih Tzus, Lhasa Apsos and Poodles, as shown in Figure 2.

The mean age of these animals at the time of consultation and inclusion in the study was 81 (±40) months. As regards the onset of atopic dermatitis, the symptoms appeared at approximately 40 (±29) months, ranging from two to 134 months of age, with the highest prevalence observed in the first 48 months (Figure 3).

IgE Levels from Serum Samples

Of the 85 serum samples from atopic dogs, four were disregarded at the time of the ELISA test because they showed viscosity changes. Thus, 81 sera were analyzed, of which 78 (96%) showed positive results in the serological test for detecting IgE against allergen Der f 2, while 74 (91%) were positive for allergen Zen 1 and 78 (96%) were positive for the whole mite (DF: *D. farinae*). These results are presented in Figure 4.

The positive values for the OD levels ranged from 0.235 to 3.316 for Der f 2; 0.205 to 1.969 for Zen 1 and 0.232 to 1.798 for DF.

Discussion

CAD is a genetically predisposed disease; therefore, it mainly affects purebred dogs. However, most of the studies conducted have not associated the actual prevalence of the disease with the frequency in which these breeds are found in the general population of dogs.³⁸ In the group of 85 dogs selected with CAD in this study, 57 animals were purebred (PB), and 28 dogs were mixed-breed (MB), thus corroborating the data in the literature cited.

CAD is a disease that does not show sexual predilection, affecting both males and females³⁹, although, in the studied group, 52 animals were females and 33 were males.

Our study showed that 38% of the animals had the onset of symptoms in the first 24 months of life (2 years). These are similar results to those found by Hillier et al⁴⁰ in 2001, in which the majority of dogs affected by CAD presented the first symptoms between one (12 months) and three years of age (36 months).

Rates of hypersensitivity to *Dermatophagoides farinae* range from 20 to 100% in atopic dogs,^{40,41} and that mite is more allergenic to atopic dogs in the western regions, according to Weber et al (2003).²⁹ However, there are few studies available on the actual

profile of sensitization of dogs with CAD to house dust mite allergens in Brazil. In reality, it is important to quantify the allergens in house dust mite in order to determine the allergenic exposure rate and its subsequent sensitization.⁴²

In 2012, Cunha, Silva and Faccini showed the importance of *D. farinae* and *Blomia tropicalis* in the pathogenesis of CAD in Brazil and, by using immunoblotting. They found that IgE specific to high molecular weight allergens in *D. farinae* is present in the sera of dogs with CAD. In this study, a high prevalence of seropositivity for *D. farinae* crude proteins, Der f 2 and Zen 1 was observed in atopic dogs, which is contrary to the data published by Cunha et al.⁴³ and corroborates those from a study conducted in Japan which showed high IgE seropositivity to allergens from Der f 1 and Der f 2 in atopic dogs. Hence, these authors suggested that Der f 2 is a major allergen for dogs with CAD in Japan.^{44,45} In contrast, studies conducted in Europe and the USA reported low prevalence of allergen-specific IgE against Der f 1 and Der f 2 allergens, thus showing that atopic dogs react to high molecular weight allergens belonging to groups 15 (98-109 kDa) and 18 (60 kDa).^{30,29,46,47} In addition, this information was also supported by a study conducted in Rio de Janeiro - RJ (Brazil) by Cunha et al.⁴³ Therefore, it remains controversial whether dogs with CAD develop a specific IgE production response against groups 1 and 2 allergens.

In 2007, four proteins were reported as major allergens in dogs with hypersensitivity to *D. farinae* Der f in Japan, one of which was identified as having a high molecular weight (188 kDa, mean 150-250 kDa) and was provisionally referred to as Zen 1.³³ In the present study, high seropositivity was detected for this new allergen, which is consistent with the data found in Europe and the USA, in a study that used serological and intradermal tests in atopic dogs.⁴⁸ This leads to the suspicion that high rates of IgE positivity against crude *D. farinae* proteins in these animals could be related to the

presence of allergen Zen 1. Furthermore, it is suspected that antibodies to Zen 1 can cross-react with Der f 15, as these allergens share replications of amino acids proline and threonine in their structures, causing them to also share surface epitopes.⁴⁸

The divergence of results between the studies presented above can be due to several aspects, among which are the different experimental methods used. In this regard, the number of samples, the characteristics of the studied population, the different geographic and climatic conditions and the methodology for detection of IgE allergen-specific antibodies may be responsible for such diversity in the data. As regards the method used, many reports have shown that serological tests have a high sensitivity and relatively low specificity, which can lead to false positive results.^{26,49} Such a fact, however, is not of great importance, since it is not considered a diagnostic test for CAD, but rather a test used for the selection of candidate allergens for ASIT in dogs strongly suspected of having the disease.

According to some studies^{50,51}, the mite species to which in dogs with AD is sensitive can vary widely depending on climatic and geographic conditions, environmental pollution and household environment. For house dust mite survival, a high air relative humidity (ARH) is required because a dry or very cold climate is unfavorable to their growth, whereas areas with high humidity and moderate winters favor their proliferation.⁵²

The ideal temperature for *D. farinae* proliferation is from 25 to 30 °C and an ARH of 50 to 60% is preferred.⁵³ There was a small variation in the climatic conditions found in the present study. A high seroprevalence to the allergens studied was observed in regions with an average temperature of 21.6 °C and an ARH ranging from 47 to 74% during 2017. Although these data are similar to those found in the literature, another study conducted in Uberlândia - MG (Brazil) also showed a high prevalence of Der p 1 IgE in

a tropical climate, characterized by a dry and mild winter with an ARH ranging between 31% and 95%, and an average temperature of 18 to 30 °C.⁵⁴ These data reveal the variability of temperature and ARH under which *Dermatophagoides farinae* mites can proliferate.

Although influences from the seasons of the year have not been evaluated in this study, seasonal fluctuations are known to be related to fluctuations in the levels of House dust mite allergens to which the animal is exposed.⁵⁵ Moreover, it was observed that a variation occurs in the levels of these allergens among the houses within the same climatic region, which is probably due to the internal characteristics of the dwellings, which affect ARH and, consequently, the growth of mites.⁵²

Mite species that are most involved in allergic processes are located within households, rather than at transportation sites, schools, workplaces and other public places.⁵⁶ Moreover, their density varies widely, both between different geographic regions, as well as between households in the same region and different places within the same household⁵⁷⁻⁵⁹, which makes the data in the literature on the prevalence of mite allergens and actual exposure, and sensitization in predisposed individuals so variable.

Although all intrinsic and extrinsic factors that cause proteins to become an allergen remain unknown, it is noteworthy that the immune systems of dogs and humans process proteins in different ways, hence the interaction with the innate immune system may be different among individuals⁶⁰, and this fact can also lead to different patterns of response to allergen exposure.

Finally, this study presented with some limitations, such as the absence of a healthy control group to confirm the accuracy of the serological test. The simultaneous development of another test to detect allergen-specific IgE in the population studied, such as the intradermal test that is commonly used in clinical routines, could perhaps minimize

this bias. In addition, the choice of the polyclonal secondary antibody can decrease the specificity of the test and increase its sensitivity. Another limitation was the lack of a sample estimation in the initial design so as to enable us to affirm the real significance of the data found, taking into account the general population of atopic dogs in the state of São Paulo.

In conclusion, contrarily to results found in the literature, our study revealed high levels of allergen-specific IgE against Der f 2 and Zen 1 in the sera of atopic dogs from regions in São Paulo state (Botucatu, Limeira and Campinas). For this reason, further studies are required to assess exposure and sensitization to different mite allergens in different cities and seasons, since mite fauna is subject to climatic, geographic and even socioeconomic variations.

Such knowledge will certainly lead to a better understanding of the association between exposure and sensitization, allowing for establishing an adequate quality standard of the allergenic extracts for diagnostic tests and enabling a better selection of more specific allergens for ASIT protocols, thus making such therapeutic modality more effective and promising.

Acknowledgment

The authors thank the company ZENOAQ (Fukushima, Japan) for the development of the serological test.

References

1. Olivry T, Hill PB. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VIII): is the epidermal lipid barrier defective? *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81(3-4): 215-18.
2. Gonzalez ME, Schaffer JV, Orlow SJ et al. Cutaneous microbiome effects of fluticasone propionate cream and adjunctive bleach baths in childhood atopic dermatitis. *J Am Acad Dermatol* 2016; 75(3): 481-93.
3. Tay YK, Kong KH, Khoo L et al. The prevalence and descriptive epidemiology of atopic dermatitis in Singapore school children. *Br J Dermatol* 2002; 146: 101–6.
4. Carlotti DN. Clinical signs of canine atopic dermatitis and concurrent diseases. Proceedings of the 7th World Congress of Veterinary Dermatology and the World Association for Veterinary Dermatology. v. 1, p. 58-66, jul. 2012.
5. Reedy L, Miller WH, Willemse A. Immunotherapy. In: Allergic Skin Diseases of Dogs and cats. Philadelphia: *WB Saunders*, 1997, p. 116-44.
6. Scott DW, Miller Jr WH, Griffin CE. Small animal dermatology. 6. ed. Philadelphia: *W. B. Saunders Company*, 2001. p. 667-779.
7. Zur G, Ihrke PJ, White SD. Canine Atopic Dermatitis: a Retrospective Study of 266 Cases Examined at the University of California, Davis (1992-1998) Part I. Clinical Features and Allergy Testing Results. *Vet Dermatol* 2002; 13(2): 89-102.
8. Favrot C, Steffan J, Seewald W et al. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol* 2010; 21(1): 23-31.
9. Marsella R, Olivry T, Nicklin C et al. Pilot investigation of a model for canine atopic dermatitis: environmental house dust mite challenge of high-IgE-producing beagles, mite

hypersensitive dogs with atopic dermatitis and normal dogs. *Vet Dermatol* 2006; 17(1): 24–35.

10. Olivry, Foster AP, Mueller RS et al. Interventions for atopic dermatitis in dogs: a systematic review of randomized controlled trials. *Vet Dermatol* 2010; 21: 4–22.

11. Olivry T, DeBoer DJ, Favrot C et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Vet Dermatol* 2010; 21(3): 233–48.

12. Griffin CE, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; v.81, p.363-83

13. Carlotti DN. Allergen Specific Hyposensitization and other means of treating canine atopic dermatitis. In: CONGRESS OF VETERINARY DERMATOLOGY, 5. 2004, p.132-41.

14. Deboer DJ. Atopic Dermatitis-Pathogenesis, Clinical Signs and Diagnosis of the Proceedings of the North American Veterinary Conference. 2008. p.370-1.

15. Chervet L, Galichet A, McLean WH et al. Missing C-terminal filaggrin expression, NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Exp Dermatol* 2010; 19(8): e343-9.

16. Kakinuma T, Nakamura K, Wakugawa M et al. Thymus and activation-regulated chemokine in atopic dermatitis: serum thymus and activation-regulated chemokine level is closely related with disease activity. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107: 535-41.

17. Raap U, Weißmantel S, Gehring M et al. IL-31 significantly correlates with disease activity and Th2 cytokine levels in children with atopic dermatitis. *Pediatr Allergy Immunol* 2012; 23: 285-8.

18. Mrabet-Dahbi S, Maurer M. Does allergy impair innate immunity? Leads and lessons from atopic dermatites. *Allergy* 2010; 65(11): 1351-6.

19. Gutowska-Owsiak D, Schaupp AL, Salimi M et al. IL-17 downregulates filaggrin and affects keratinocyte expression of genes associated with cellular adhesion. *Exp Dermatol* 2012; 21(2): 104-10.
20. Wang AX, Landén NX. New insights into T cells and their signature cytokines in atopic dermatitis. *Biochem Mol Biol Int* 2015; 67: 601-10.
21. Howell MD, Kim BE, Gao P et al. Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 120(1): 150-5.
22. Leung DY. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J Allergy Clin Immunol* 2000; 105(5): 860–6.
23. Marsella R. Atopy: New targets and new therapies. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2006; 36(1): 161-74.
24. Scott DW, Miller JR, Griffin CE. Doenças Imunológicas da Pele. In: *Dermatologia de Pequenos Animais*, 5ª ed. Rio de Janeiro: Interlivros. 1996. p. 449-580.
25. White PD. Atopia. In: BICHARD, S. J.; SHERDING, R. G. *Manual saunders: clínica de pequenos animais*. São Paulo: Roca, 1998. p. 343-351.
26. Deboer DJ, Hillier A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Vet. Immunol. Immunopathol* 2001; 81(3-4): 271–276.
27. Frick OL, Brooks DL. Immunoglobulin E antibodies to pollens augmented in dogs by virus vaccines. *Am J Vet Res* 1983; 44(3): 440-5.
28. Ezequiel OS, Gazêta GS, Amorim M et al. Evaluation of the acarofauna of the domiciliar ecosystem in Juiz de Fora, state of Minas Gerais, Brazil. *Mem Instit Oswaldo Cruz* 2001; 96(7): 911-6.

29. Weber E, Hunter S, Stedman K et al. Identification, characterization, and cloning of a complementary DNA encoding a 60-kd house dust mite allergen (Der f 18) for human beings and dogs. *J Allergy Clin Immunol* 2003; 112:79–86.
30. McCall C, Hunter S, Stedman K et al. Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 78: 231-247.
31. Nuttall TJ, Lamb JR, Hill PB. Characterization of major and minor Dermatophagoides allergens in canine atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 2001; 71: 51-7.
32. Madhurantakam C, Nilsson OB, Uchtenhagen H et al. Crystal structure of the dog lipocalin allergen Can f 2: Implications for Cross-reactivity to the Cat Allergen Fel d 4. *J Mol Biol* 2010; 401(1): 68-83.
33. Tsukui T, Sakaguchi M, Kurata K et al. Analysis of house dust mite (*D. farinae*) allergens in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatology* 2007; 18:194-5 (abstract).
34. FCA – Unesp, 2018 - Estação Meteorológica do Departamento de Solos e Recursos Ambientais. Faculdade de Ciências Agronômicas. Lageado – UNESP – Botucatu. Resenha Climatológica (1971 a 2006)
<http://www.fca.unesp.br/#!/instituicao/departamentos/solos-recursos-ambientais/sra/estacao-meteorologica/resenha-climatologica/> > Accessed on 7/1/2018.
35. FTI – Unicamp, 2017 Faculdade de tecnologia de limeira – Unicamp Annual climatological summary< <https://www.ft.unicamp.br/~meteorologia/NOAAPRYR.TXT>. > Accessed on 7/1/2018.
36. FEAGRI - Unicamp, 2018) Dados Médios da FEAGRI / UNICAMP. <<https://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-de-campinas.html>. > Accessed on 7/1/2018.

37. Willemse T. Atopic skin disease: a review and a reconsideration of diagnostic criteria. *J Small Anim Pract* 1986; 27: 771-8.
38. Souza CA, Marsella R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIII): Threshold phenomenon and summation of effects. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 81(3-4): 251-4.
39. Gross TL. Doenças de pele do cão e do gato: Diagnóstico Clínico e Histopatológico. 2a ed. Rio de Janeiro: Roca; 2005. p.200-206.
40. Hillier PB, Deboer DJ. The ACVD Task Force on Canine Atopic Dermatitis (IV); environmental allergens. *Vet Immunopathol* 2001; 1: 159-68.
41. Nuttall TJ, Hill PB, Bensignor E et al. House dust and forage mites allergens and their role in human and canine atopic dermatites. *Vet Dermatol* 2006; 17(4): 223-35.
42. Sporik R, Holgate ST, Platts-Mills TA et al. Exposure to house-dust mite allergen (Der p I) and the development of asthma in childhood. A prospective study. *N Engl J Med* 1990; 323(8): 502-7.
43. Cunha VES, Silva MH. Faccini, J.L.H. Serological identification of house dust mite allergens in dogs with atopic dermatitis. *Pesq Vet Bras* 2012; 32(9): 917-21.
44. Masuda KT, Fujiwara SKK, Hasegawa AY et al. IgE sensitivity and cross-reactivity to crude and purified mite allergens (Der f 1 , Der f 2, Der p 1, Der p 2) in atopic dogs sensitive to *Dermatophagoides* mite allergens . *Vet Immunolol Immunopathol* 1999; 72: 303-13.
45. Yamashita K, Fujiwara C, Azuma R et al. Determination of antigenic proteins of house dust mites in 90 dogs suffering from atopic dermatitis. *J Vet Med Sci* 2002; 64 673-76.
46. Thomas WR. Hierarchy and molecular properties of house dust mite allergens. *Allergol Int* 2015; 64:304-311.

47. Batard T, Baron-Bodo V, Martelet A et al. Patterns of IgE sensitization in house dust mite-allergic patients: implications for allergen immunotherapy. *Allergy* 2016; 71 (2): 220-9.
48. Olivry T, Dunston SM, Favrot C et al. The novel high molecular weight *Dermatophagoides farinae* protein Zen-1 is a major allergen in North American and European mite allergic dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2016; 28(177): e38.
49. Nuttall T, Uri M, Halliwell R. Canine atopic dermatitis -what have we learned? *Vet Rec* 2013; 172: 201-7.
50. Park SH, Lim DH, Son BK et al. Sensitization rates of airborne pollen and mold in children. *Korean J Pediatr* 2012; 55: 322-9.
51. Canonica GW, Ansotegui IJ, Pawankar R et al. A WAO – ARIA – GA(2)LEN consensus document on molecular-based allergy diagnostics. *World Allergy Organ J.* E6, 17. 2013.
52. Garret MH, Hooper BM, Hooper MA. Indoor environmental factors associated with house dust-mite allergens (Der p 1) levels in southeastern Australian houses. *Allergy* 1998; 53: 1060–5.
53. Jackson AP, Foster AP, Hart BJ et al. Prevalence of house dust mites and dermatophagoides group 1 antigens collected from bedding, skin and hair coat of dogs in south-west England. *Vet Dermatol* 2005; 16: 32-8.
54. Sopelete M, Silva DAO, Arruda LK et al. *Dermatophagoides farinae* (Der f1) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p1) allergen exposure among subjects living in Uberlandia, Brazil. *Int Arch Allergy Immunol* 2001; 122: 257-63.
55. Mahmic A, Tovey ER. House-dust-mite allergen (Der p 1) levels in university colleges. *Allergy* 1998; 53: 976–80.

56. Arlian LG, Marjorie SM, Neal JS. Dust Mite Allergens: Ecology and Distribution. *Curr Allergy Asthma R* 2002; 2: 401–411.
57. Nelson HS, Fernandez-Caldas E. Prevalence of house dust mites in the Rocky Mountain states. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1995; 75: 337–339.
58. O'rourke MK, Moore CL, Arlian LG. Prevalence of house dust mites from homes in the Sonoran Desert, Arizona. In *Aerobiology*. Edited by Muilenberg M, Burge H. Boca Raton, FL: Lewis Publishers, CRC Press 1996: 67–80.
59. Moyer DB, Nelson HS, Arlian LG. House dust mites in Colorado. *Ann Allergy* 1985; 55: 680–2.
60. Moya R, Carnés J, Sinovas N et al. Immunoproteomic characterization of a *Dermatophagoides farinae* extract used in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2016; 1(180): 1-8.

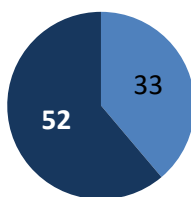


FIGURE 1. Sex distribution of the 85 animals included in the study

Legend - Dark blue: females (61,2%); Light blue: males (38,8%).

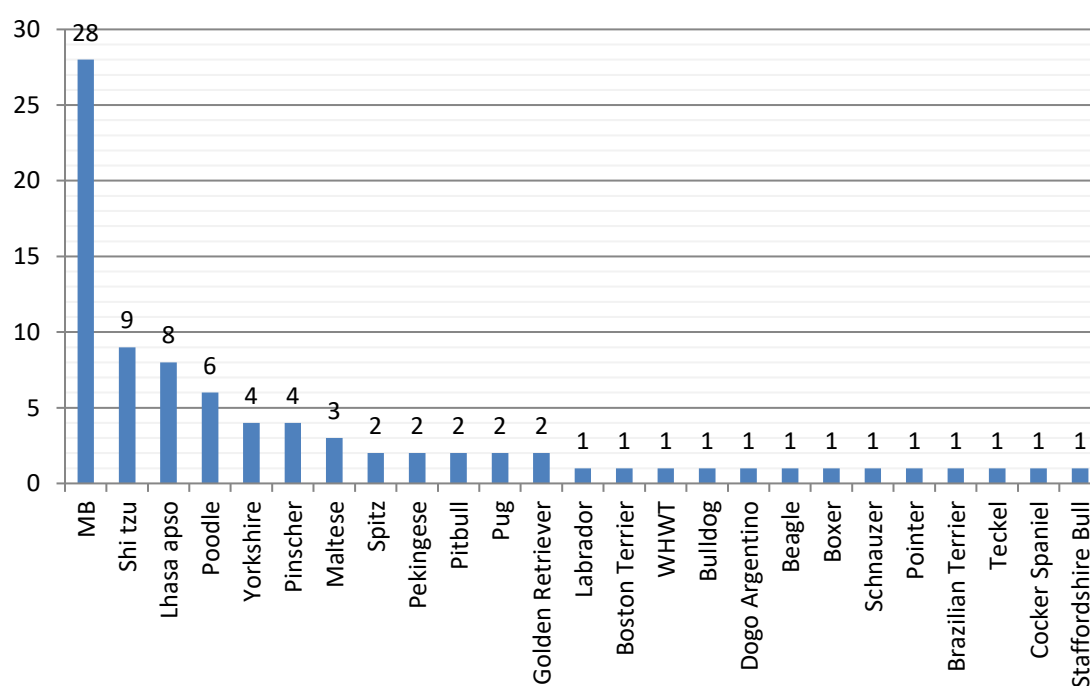


FIGURE 2. Race distribution of the 85 animals included in the study

Legend - MB: mixed-breed; WHWT: West Highland White Terrier.

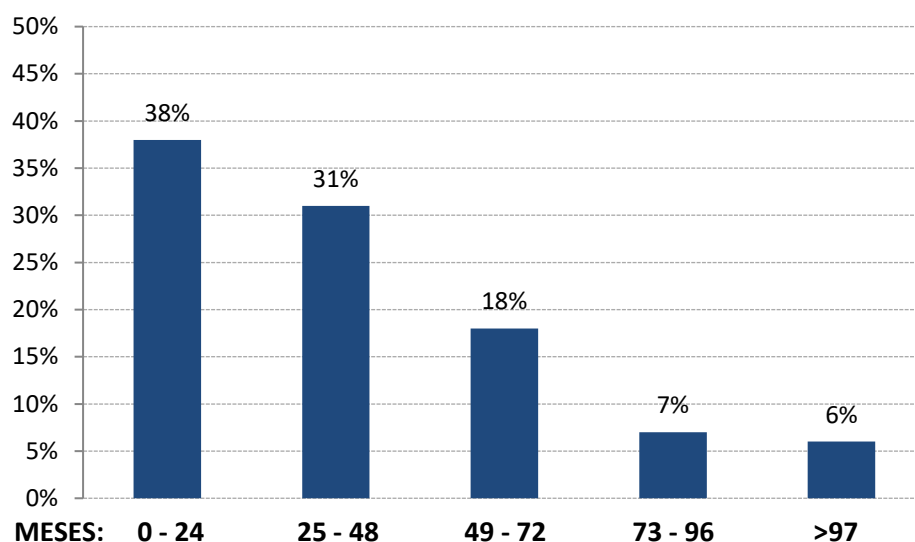


FIGURE 3. Age distribution percentage at the onset of atopic dermatitis symptoms in the 85 animals included in the study

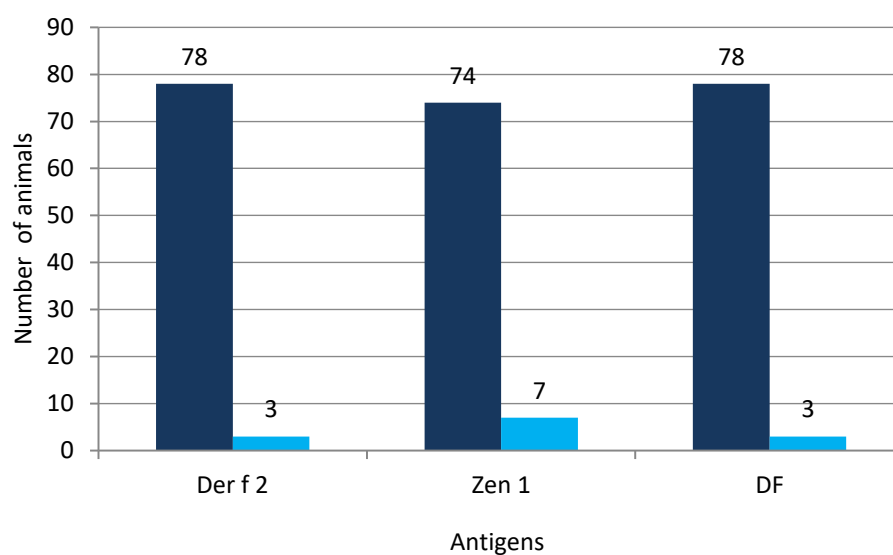


FIGURE 4. Seropositivity percentage to Der f 2, Zen 1 and DF in the 85 animals included in the study

Legend - Der f 2: *D. farinae* allergen of group 2; Zen 1: Zen 1 allergen; DF: *D. farinae*.

Dark Blue: Positive animals; Light Blue: Negative animals

ANEXOS

10) ANEXOS

ANEXO I

Metodologia ELISA:

O processamento das amostras de soro canino, de pacientes portadores de dermatite atópica, seguiu os seguintes passos:

1. As placas microtituladas foram revestidas com solução carbonada (pH 9,6) contendo 50 µg/mL do alérgeno rDer f 2, 1 µg/mL do Zen 1 e 0,1µg/mL do DF, pipetando 100 µL em cada poço;
2. Para sensibilização, as placas foram mantidas a 37° C por uma hora;
3. Em seguida, as placas foram lavadas com 300 µL de solução PBST (PBS contendo 0,1% Tween 20);
4. Foram adicionados 100 µL de solução de bloqueio (solução Tris) em cada poço da placa, que foi mantida a 37° C por uma hora;
5. As placas foram lavadas novamente utilizando 300 µL de solução contendo PBST;
6. Paralelamente, as amostras e os controles positivos e negativos foram diluídos em solução de bloqueio (1:10);
7. Posteriormente, 100 µL das amostras e controles foram adicionados em cada poço das placas, que foram incubadas durante uma hora na temperatura de 37 °C;
8. As placas foram lavadas por três vezes em solução PBST;
9. Foi adicionado, então, 100 µL de anticorpo policlonal anti-IgE canino conjugado com a enzima *horseradish* peroxidase (HRP) (BETHYL; A40-125P), diluído em solução de bloqueio (1:10.000);
10. As placas foram novamente incubadas por uma hora em 37°C;
11. Foram realizadas mais três lavagens usando PBST;
12. Após o preparo do substrato, misturando as soluções *tetramethylbenzidine* (TMB) 'A' e 'B' (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.), foram adicionados 100 µL desta solução em cada poço;

13. As placas foram incubadas em 37°C por 30 minutos antes da realização da última etapa;
14. A parada da reação foi realizada com a adição de 50 µL de ácido sulfúrico 1N (1 N H₂SO₄);
15. A reação colorida foi lida em duplicata, utilizando um leitor de microplacas (BIO-RAD: modelo 680, Cat. nº 168-1000) e comprimento de onda de 450 nm e 630 nm.
16. Os resultados foram considerados positivos quando a densidade ótica ultrapassou 0,2.

Obs: para controle positivo, foi utilizado soro de cão sensibilizado com os antígenos específicos em cada ELISA e, para o controle negativo. Utilizou-se soro obtido de cães saudáveis provenientes do laboratório.

ANEXO II



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"



DECLARAÇÃO

Declaro que estou ciente da necessidade da assinatura do "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido" pelo proprietário, antes do início da realização de qualquer procedimento experimental.

O mesmo permanecerá em meu poder e ficará à disposição da Comissão de Ética no Uso de Animais, a qualquer momento.

NOME E ASSINATURA DO DOCENTE RESPONSÁVEL:

Luiz Henrique de Araújo Machado _____

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Declaro para os devidos fins que estou ciente e autorizo a realização do Projeto de Pesquisa intitulado **Avaliação da soroprevalência ao alérgenos de ácaros domiciliares Derf 2 ao teste sorológico em animais atópicos no Estado de São Paulo**

_____, de responsabilidade de Ana Paula Di Martino Frezza _____.

Descrição detalhada dos procedimentos, em linguagem não científica: _Será colhida amostra de sangue, uma única vez, para determinar se há resposta alérgica a um ácaro doméstico.

Nome do animal ou Número de animais de produção: _____

NOME DO RESPONSÁVEL: _____

RG: _____ Data: ____/____/____

Assinatura: _____

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Seção Técnica Acadêmica
Rua Prof.Dr. Walter Mauricio Corrêa, s/n
UNESP - Câmpus de Botucatu/SP - Cep 18618-681
☐(14) 3880-2176 – www.fmvz.unesp.br