

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

ANA PAULA DOS SANTOS CERDEIRO

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIZAÇÃO A PÓLENS DE GRAMÍNEAS POR
TESTES CUTÂNEOS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA EM CURITIBA
(PR), BRASIL**

CURITIBA

2017

ANA PAULA DOS SANTOS CERDEIRO

**AVALIAÇÃO DA SENSIBILIZAÇÃO A PÓLENS DE GRAMÍNEAS POR
TESTES CUTÂNEOS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA EM CURITIBA,
BRASIL**

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

Orientador: Prof. Adj. III Dr. Marconi
Rodrigues de Farias

Co-orientador: Dr. Victor do Espírito
Santo Cunha

CURITIBA

2017

TERMO DE APROVAÇÃO

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	v
AGRADECIMENTOS.....	vi
FORMATO DA DISSERTAÇÃO/ TESE.....	viii
RESUMO GERAL.....	ix
ABSTRACT	x
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO.....	1
DERMATITE ATÓPICA EM CÃES	1
2.1 Definição e patogênese.....	1
2.2 Sinais Clínicos	4
2.3 Diagnóstico da DAC	6
3. PÓLENS E ALÉRGENOS	9
4. POLINOSE	13
4.1 Polinose no cão	15
4.2 Pólenes de gramíneas	17
4.3 <i>Lolium multiflorum</i>	17
4.4 <i>Cynodon dactylon</i>	19
4.2 <i>Paspalum notatum</i>	17
CAPÍTULO 2.....	23
AVALIAÇÃO DA SENSIBILIZAÇÃO A PÓLENS DE GRAMÍNEAS POR TESTES CUTÂNEOS CÃES COM DERMATITE ATÓPICA EM CURITIBA (PR), BRASIL	24
CAPÍTULO 3.....	36
CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
ANEXOS.....	53

Dedico este trabalho àqueles que me encantam cada dia mais e me fazem acreditar estar seguindo o caminho certo, os animais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu o dom da vida e que sempre respondeu minhas preces. Em segundo lugar, minha família, que sempre esteve ao meu lado me apoiando desde muito pequena e que vibraram e disseram se orgulhar desde o ensino básico, médio, faculdade, especialização. Espero deixá-los orgulhosos mais uma vez ao concluir este mestrado. Em especial à minha mãe, Alzira dos Santos Cerdeiro, meu pai Aguinaldo Cerdeiro, meu irmão Aguinaldo Junior, meus avós, Rutemar e Adair e meus tios, Rogério Dolenga, Andreia Sinestri e Amauri Santos.

Ao meu amor, Rafael Ganho, por sempre acreditar em mim e me impulsionar à frente. Por estar ao meu lado nos períodos em que eu havia perdido esperanças. Espero te deixar sempre orgulhoso e te fazer feliz. Juntamente, agradeço ao apoio da família que conquistei, os sogros Sônia e Josemar, a cunhada Gabriela e a Maria de Lurdes.

Ao meu orientador Marconi Rodrigues de Farias, por toda a ajuda e sabedoria transmitida. Fico agradecida com ter criado este laço com esse grande mestre que apesar de todo o conhecimento, é a pessoa mais humilde que conheço. Espero um dia ser uma professora, dermatologista e alergologista tão boa quanto ele. Ao co-orientador Victor Espírito Santo Cunha, que partilhou todo seu conhecimento e nos ajudou a modelar este projeto, sempre disposto a tirar nossas dúvidas e orientar a qualquer momento. Ao professor Ronaldo Lucas, pelos ensinamentos e carta de recomendação. Também à Dra. Juliana Werner, grande amiga e mentora, sempre disposta a sanar dúvidas e agregar conhecimento. Agradeço imensamente também pela carta de recomendação. Às colegas de mestrado, Gisele Sechi e Bruna Pacheco, que me ajudaram ao longo do projeto, bem como todos os estagiários e funcionários que participaram da construção desse estudo. À Caroline Nocera, pela grande paciência. Aos professores Saulo Weber e Claudia Pimpão que forneceram total ajuda com a estatística do trabalho. Muito obrigada.

A todos os professores que passaram pela minha vida até este momento. Todos, sem exceções, foram importantes na minha construção como

profissional e pessoa. Em especial à Professora Ineis Marcello, que foi a primeira professora que me motivou e não me deixou desistir, quando na 6ª série sentou ao meu lado e me disse para não me importar com a maldade dos colegas e acreditar no meu potencial. Lembro da cena até hoje e sou extremamente agradecida. O mundo precisa de mais professoras como a senhora. Igualmente, à professora Ana Luisa Palhano, por quem cultivo grande amizade e admiração e sempre esteve disposta a ajudar de qualquer maneira. Obrigada por todo o carinho, paciência e por me introduzir ao mundo acadêmico e da pesquisa.

A todos os amigos que entenderam minha ausência neste período, mas que sempre estiveram ao meu lado sempre que precisei. Podem ter certeza que estarei ao lado de vocês sempre, igualmente.

Aos animais que por minha vida passaram e me deixaram marcas de amor e carinho incondicional. Tudo isso é por vocês.

Gratidão.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por capítulos e a metodologia aplicada no Capítulo 1 segue as normas de Vancouver Modificada e no Capítulo 2 as normas da ABNT adaptadas pela ABMVZ.

O capítulo 1 é composto pela revisão de literatura sobre dermatite atópica em cães e seu diagnóstico baseado em teste intradérmico e *Prick test* e pólenes de gramíneas.

O capítulo 2 descreve a pesquisa intitulada “Avaliação da sensibilização a pólenes de gramíneas por testes cutâneos em cães com dermatite atópica em Curitiba, Brasil”, a qual foi escrita no formato da revista *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences)* - UFMG

O capítulo 3 será referente às considerações finais.

As referências dos dois capítulos encontram-se em lista única ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

A dermatite atópica canina é uma morbidade alérgica inflamatória, pruriginosa, genética e crônica ligada à produção de anticorpos da classe Imunoglobulina E e que pode acometer em torno de 20% da população canina. Entre os alérgenos de importância clínica na doença, estão os pólenes de gramíneas, considerados extremamente importantes no desencadeamento de crises alérgicas na medicina. O objetivo deste trabalho foi identificar a incidência de sensibilização à pólenes de gramíneas através da comparação entre o Teste Intradérmico e o *Prick test* em cães com dermatite atópica na cidade de Curitiba (PR), além de levantar entre os positivos quais são intradomiciliados ou extradomiciliados. Para o estudo, foram utilizados 10 cães hígidos para o grupo controle e 39 cães apresentando dermatite atópica *stricto sensu*. Estes cães foram submetidos a Teste Intradérmico e *Prick test* para as três gramíneas de maior importância alergológica em humanos no Brasil, *Lolium multiflorum*, *Cynodon dactylon* e *Paspalum notatum*. Os cães do grupo controle foram todos negativos em ambos os testes. Foi observada positividade no grupo experimental em 10 animais (25,6%) no *Prick test* e nenhum positivo no teste intradérmico. Comparou-se os dois testes através de Teste de Proporção, obtendo $p < 0,05$, indicando que a proporção de casos positivos no *Prick test* é estatisticamente maior que no Teste Intradérmico. Entre os animais reativos, 80% possuíam exposição ambiental contínua ou esporádica. A gramínea com maior incidência entre os cães positivos foi *Cynodon dactylon* (70%) e *Lolium multiflorum* (70%), seguidos do *Paspalum notatum* (30%). Foi possível concluir que cães com dermatite atópica canina em Curitiba estão sensibilizados a pólenes de gramíneas presentes no país e que o *Prick test* foi capaz de detectar maior sensibilização polínica. Cães com exposição ambiental contínua ou esporádica em Curitiba apresentaram maior sensibilização à alérgenos de pólenes de gramíneas quando comparados a cães intradomiciliados.

Palavras-chave: *Prick test*; *Cynodon dactylon*; *Paspalum notatum*; *Lolium multiflorum*; Dermatite atópica canina

ABSTRACT

Canine atopic dermatitis is an inflammatory, pruritic, genetic and chronic allergic disease linked to IgE antibodies production and it's believed to affect around 20% of canine population. Among clinic important allergens are grass pollens, considered extremely important in triggering allergic crises in human medicine. The aim of this study was to identify grass pollen sensitization incidence by intradermal test and prick test comparison in dogs with atopic dermatitis in Curitiba (PR) and identify between positive dogs environmental exposure. For the study, 10 healthy dogs were used for control group and 39 dogs presenting *stricto sensu* atopic dermatitis. These dogs were submitted to intradermal and *prick test* for the three most important allergenic grasses in people in Brazil, *Lolium multiflorum*, *Cynodon dactylon* and *Paspalum notatum*. The dogs in the control group were all negative to both tests. Positivity were observed in the experimental group in 25,6% (10) of the animals in the prick test and no positivity in the intradermal test. The two tests were compared with Proportion test, obtaining $p < 0,05$, indicating that the proportion of positive cases in the prick test is statistically higher than in the intradermal test. Among reactive animals, 80% had continuous or sporadic environmental exposure. The grass with the highest incidence among positive dogs was *Cynodon dactylon* (70%), followed by *Lolium multiflorum* (70%) and *Paspalum notatum* (30%). It was concluded that dogs with canine atopic dermatitis in Brazil are sensitized to grass pollen present in the country and that skin prick test was able to detect greater pollen sensitization when compared to intradermal test. Dogs with continuous or sporadic environmental exposure in Curitiba presented greater sensitization to grass pollen allergens when compared to intradomiciliated dogs without any type of environmental exposure.

Keywords: Prick test; *Cynodon dactylon*; *Paspalum notatum*; *Lolium multiflorum*; Canine atopic dermatitis.

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
CV	Coeficiente de variação
cm	Centímetro
<i>cut off</i>	Ponto de corte
Cyn d	Alérgeno de <i>Cynodon dactylon</i>
DAC	Dermatite atópica canina
°C	Graus Célsius
HEP	<i>Histamine equivalent prick</i>
IgE	Imunoglobulina-E
IL	Interleucina
KDa	quilodaltons
Lol m	alérgeno de <i>Lolium multiflorum</i>
mg	Miligrama
mL	Mililitro S
mm	Milímetro
Pas n	Alérgeno de <i>Paspalum notatum</i>
TID	Teste intradérmico
Th0	Linfócito T <i>helper 0</i>
Th1	Linfócito T <i>helper 1</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UBE	Unidade biológica equivalente

LISTA DE TABELAS E QUADROS DA REVISÃO DA LITERATURA

	Página
Tabela 1 Critérios de Favrot	6
Tabela 2 Grupos de alérgenos de pólenes de gramíneas e seus respectivos pesos moleculares	12

LISTA DE TABELAS E QUADROS DO ARTIGO CIENTÍFICO

	Página
Quadro 1 Relação de raças entre os 39 cães com dermatite atópica <i>stricto sensu</i> testados para pólenes no <i>Prick test</i> e intradérmico	29

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA

	Página
Figura 1 Topografia lesional da dermatite atópica em cães	4
Figura 2 Otite externa no cão	14
Figura 3 A e B. Reações papulares após 15 minutos da aplicação de alérgenos suspeitos no teste intradérmico e <i>Prick test</i>	7
Figura 4 Hierarquia filogenética das três gramíneas mais comuns no Brasil	17
Figura 5 <i>Lolium multiflorum</i> (Azevém Italiano)	19
Figura 6 <i>Cynodon dactylon</i> (Grama bermuda)	20
Figura 7 <i>Paspalum notatum</i> (Grama Bahia)	21

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO CIENTÍFICO

	Página
Figura 1 Comparação da reação papula de histamina e pápula positiva para pólen de gramínea em centímetros no o teste intradérmico e <i>prick test</i>	31

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Alergia é caracterizada como um distúrbio de hipersensibilidade que envolve a sensibilização de indivíduos a um antígeno (alérgeno), oriunda da conjunção de fatores genéticos, desregulação imunológica e influência ambiental (Day, 2014).

Os principais alérgenos responsáveis por doenças alérgicas provém de ácaros da poeira domiciliar, pólenes, fungos, baratas e epitélios de animais (Ring et al., 2001), os quais estão relacionados com a precipitação ou exacerbação dos sintomas relacionados à asma alérgica, rinoconjuntivite alérgica e dermatite atópica (Jensen-Jarolim et al., 2015).

Entre os alérgenos de importância clínica, os pólenes, sobretudo de gramíneas, constituem uma causa comum de sensibilização e precipitação de doenças alérgicas em indivíduos predispostos (Bernardes et al., 2010). A polinose é a doença alérgica desenvolvida frente a exposição e absorção a alérgenos de pólen via percutânea, respiratória ou conjuntival de indivíduos previamente sensibilizados (Taketomi et al., 2006). Estima-se que a prevalência de polinose seja de 1,8% em crianças e 10,4% em adultos na cidade de Curitiba (Esteves et al., 2000).

Apesar de os alérgenos ambientais serem importantes fatores extrínsecos na dermatite atópica em cães, a sensibilização a alérgenos de pólenes no Brasil não foi criticamente avaliada nesta espécie.

2. DERMATITE ATÓPICA EM CÃES

2.1 Definição e patogênese

A dermatite atópica em cães (DAC) é uma morbidade inflamatória,

genética e crônica, cujo prurido é seu principal sinal clínico. A predisposição hereditária pode ser comprovada pelo maior grau de acometimento de determinadas raças ou grupos de raças de cães (Salzo, 2015). A prevalência desta doença é crescente e estima-se que acometa cerca de 20% da população canina (Carlotti, 2012).

A DAC é classificada como uma doença multifatorial que envolve fatores genéticos, defeitos na barreira cutânea, resposta imune específica exacerbada e influência ambiental (Nuttall, 2008; Day, 2013). Em cães, suas manifestações clínicas podem ser agravadas devido a reação adversa a alimentos, exposição tegumentar a toxinas microbianas, irritantes primários ou por alérgenos ambientais (dermatite atópica *stricto sensu*) (Pucheu-Haston et al., 2015).

A diminuição de formação e a dificuldade de extrusão de ceramidas e lipídios intercelulares no extrato córneo têm sido documentados em cães com dermatite atópica espontânea, o que leva a perda de função de barreira física tegumentar (Yoon et al., 2011; Popa, et al., 2011). A perda de água transepidermica também é um achado comum em cães com a barreira epidérmica defeituosa, o que aumenta os espaços intercelulares e torna a pele xerótica e mais predisposta a infecções oportunistas (Hightower et al., 2008).

Em humanos, um dos fatores que contribui para a disfunção de barreira cutânea na dermatite atópica é a mutação do gene *filaggrin*. A filagrina é uma proteína de grande importância na formação final da camada córnea, contribuindo para a agregação do citoesqueleto de queratina, e seus fragmentos polímeros promovem a hidratação natural da camada córnea da epiderme, favorecem a diminuição do pH da pele e ao processo de descamação natural (Santoro et al., 2013). Com a mutação do gen *filaggrin*, há diminuição desta proteína, uma produção defeituosa da camada córnea, alcalinização da pele e aumento da perda hídrica transepidermica (Lai-Cheong et al., 2006).

Em cães, alguns estudos foram conduzidos para identificar uma possível mutação deste gene. Em 2010, estimou-se que cerca de 20% dos cães com dermatite atópica possuíam mutações semelhantes às apresentadas em humanos do gen *filaggrin* (Chervet et al., 2010). Estudo conduzido em 2011 mostrou alteração na expressão do gen *filaggrin* em cães da raça West

Highland White Terrier com ocorrência natural da dermatite atópica (Roque et al., 2011). Em 2013, Santoro e colaboradores detectaram alterações na expressão do mRNA da filagrina epidermal em beagles experimentalmente criados com dermatite atópica (Santoro et al., 2013).

Devido a diminuição da barreira física epidérmica, há maior exposição do organismo ao ambiente, o que favorece a penetração percutânea de alérgenos e precipita uma resposta inflamatória tegumentar.

Após a penetração percutânea, alérgenos ambientais são fagocitados pelas células de Langerhans que os identificam, processam e os apresentam aos linfócitos Th0 nos linfonodos regionais ou na epiderme. Estes por sua vez são convertidos em Th2, pela ação da IL1, e produzem citocinas pró inflamatórias como a IL-4, IL5, IL-13 e IL31.

As citocinas IL-4 e IL-13 podem se ligar a receptores das células B, estimulando-as a se diferenciar em plasmócitos e produzir imunoglobulinas da classe IgE específicas para o alérgeno desencadeador de resposta. Em cães com dermatite atópica, aproximadamente 80% dos animais apresentam IgE específicos para reconhecimento de alérgenos ambientais (Miller, Griffin e Campbell, 2013).

A IgE é uma imunoglobulina citotrópica, a qual se adere à membrana dos mastócitos e das células de Langerhans, o que favorece a apresentação antigênica, a ativação de linfócitos Th2 e a desgranulação de mastócitos quando ocorrer nova exposição ao alérgeno. Mediadores inflamatórios liberados pelos mastócitos como a histamina, serotonina, heparina ativam a via do ácido araquidônico o qual promove ativação da ciclo-oxigenase e lipoxigenase, à produção de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos e à indução de uma potente resposta inflamatória (Tizard, 2014).

Com a cronicidade do processo inflamatório e o desafio tegumentar com moléculas inorgânicas, alérgenos microbianos e endotoxinas, uma indução de resposta Th1 é observada em cães com dermatite atópica, o que leva a formação a produção de Interferon gama e TNF alfa (Day, 2015). Assim, infiltração de macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos T citotóxicos são comuns na fase crônica de doença, e geralmente a resposta Th1 exacerbada é relacionada com disqueratose tegumentar (Miller, Griffin e Campbell, 2013;

Tizard, 2014).

2.2 Sinais Clínicos

Os sinais clínicos da dermatite atópica estão principalmente relacionados ao prurido de caráter primário, que pode ser manifestado pelos atos de lambar, mordiscar, coçar ou roçar as áreas afetadas (Farias, 2007; Lucas, Cantagallo e Beviani, 2007). Este geralmente inicia moderadamente mas tende a intensificar com a cronicidade da doença (Miller, Griffin e Campbel, 2013). A intensificação também tende a ocorrer de acordo com condições climáticas e exposição à determinados alérgenos (Olivry et al., 2010).

As áreas comumente envolvidas são pavilhões auriculares e condutos auditivos, região periocular, perilabial, mentoniana, abdômen, regiões axilar e inguinal, porção distal dos membros, áreas flexurais e região de períneo (Hiller, 2002; Favrot et al., 2010) (Figura 1).

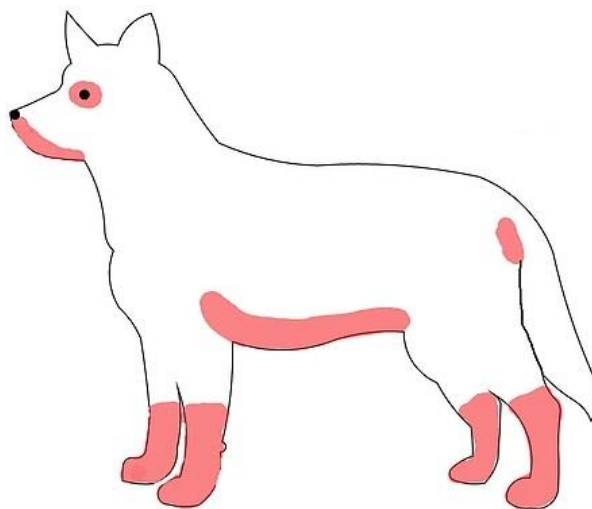


Figura 1. Topografia lesional da dermatite atópica em cães. Adaptado de <https://www.taylorvets.co.uk/skin-allergies>

Inicialmente, o cão pode apresentar um prurido primário (alesional) ou associado a lesões eritematosas e erupções papulares. Secundárias ao prurido, inicia-se hipotricose e alopecia autoinduzidas, tonsura pilosa, escoriações e lesões pápulo-crostosas. Conforme a cronicidade da doença, comumente há desenvolvimento de infecções secundárias bacterianas ou fúngicas, a pele pode se tornar xerótica, com hiperqueratose,

hiperpigmentação, liquenificação e descamação (Marsella e Girolomoni, 2009).

Infecções secundárias por *Staphylococcus sp* acometem em torno de 68% de cães com dermatite atópica. Os sinais clínicos comuns incluem pápulas, pústulas, colarinhos epidérmicos circundados por eritema e encimados por crostas melicéricas. As infecções geralmente tornam-se crônicas e recorrentes, o que acaba por agravar o quadro clínico e o processo alérgico (Farias, 2007).

Leveduras lipofílicas e queratolíticas do gênero *Malassezia* são também comumente envolvidas no agravamento dos sinais clínicos em cães com dermatite atópica. Já é bem estabelecido que a *Malassezia pachydermatis* é parte da microbiota cutânea natural em cães, porém, em cães com dermatite atópica, estas podem ser encontradas em maior quantidade nas orelhas, região interdigital, perioral, perianal e axilas (Nardoni et al., 2007). Além disso, esta levedura parece incitar resposta de hipersensibilidade em cães com dermatite atópica (Bond et al., 2002), podendo ocorrer sensibilização em cerca de 50% dos pacientes (Chen et al., 2002).

Outro sinal clínico bastante comum em cães com DAC é a otite externa, e esta ocorre em torno de 86% dos cães com esta morbidade (Miler, Griffin e Campbel, 2013). Na fase aguda, a otite externa é caracterizada por eritema e exsudação ceruminosa e, com a cronicidade, ocorre hiperplasia epitelial, excesso de dobras cutâneas, estenose de condutos, hiperqueratose, liquenificação (Figura 2A e 2B) e supercrescimento bacteriano e ou fúngico (Hillier, 2002).



Figura 2. Otite externa no cão. A. Pavilhão auricular apresentando eritema intenso, leve

hiperqueratose e exsudação ceruminosa. B. Pavilhão auricular apresentando eritema intenso, hiperplasia, hiperqueratose e estenose de conduto. Fonte: a autora.

Outros sinais de dermatite atópica em cães incluem hiperidrose, dermatite piotraumática e granuloma acral por lambedura. Alguns cães também podem apresentar síndromes seborreicas primárias, distúrbios gastrointestinais, conjuntivite e rinite como comorbidades alérgicas. Bronquite não é comumente associada à esta morbidade em cães (Miller, Griffin e Campbel, 2013).

2.3 Diagnóstico da DAC

O diagnóstico da DAC é presumido clinicamente, através da junção da anamnese e sinais clínicos (Salzo, 2015). Após exclusão de outras dermatopatias pruriginosas de origem infectoparasitária e alérgicas, os critérios de Favrot (TABELA 1) também ajudam a fundamentar o diagnóstico presuntivo desta morbidade, conferindo 85% de sensibilidade e 79% de especificidade para cães que cumprirem ao menos cinco dos oito critérios. Ao cumprir seis critérios, a especificidade sobe para 89% (Favrot et al., 2010).

Tabela 1. Critérios de Favrot. Adaptado: Favrot et al., 2010.

Critérios de Favrot	
1	Idade de início < 3 anos
2	Intradomiciliado
3	Prurido responsivo a corticosteroides
4	Prurido primário
5	Porção distal dos membros torácicos afetados
6	Pavilhão auricular e condutos afetados
7	Borda de pavilhões auriculares não afetadas
8	Área dorso-lombar não afetada

O tratamento e controle de doenças alérgicas envolve a minimização à exposição aos fatores extrínsecos, o controle da inflamação e prurido, e dessensibilização nos cães com forte componente de IgE associado a

morbidade. Assim, a identificação dos alérgenos envolvidos no processo de precipitação e exacerbação do eczema associado a dermatite atópica é fundamental, e pode ser conduzida através de teste intradérmico (TID), tido como teste padrão na medicina veterinária (Griffin, 2014; Salzo, 2015).

O teste intradérmico (TID) é o método *in vivo* mais utilizado em cães na prática clínica, estudos da dermatite atópica canina e para investigação farmacológica ou drogas anti-alérgicas (Hillier e DeBoer, 2001).

Para realização do TID, realiza-se tricotomia geralmente na lateral do tórax e posterior marcação com caneta dermatográfica com intervalos de três centímetros entre os pontos. Aplica-se então 0,05 ml por via intradérmica de extratos produzidos a partir de alérgenos suspeitos e observa-se após 15 minutos a reação papular local (Hillier e Deboer., 2001; Miller, Griffin e Campbel, 2015) (Figura 3A e 3B).

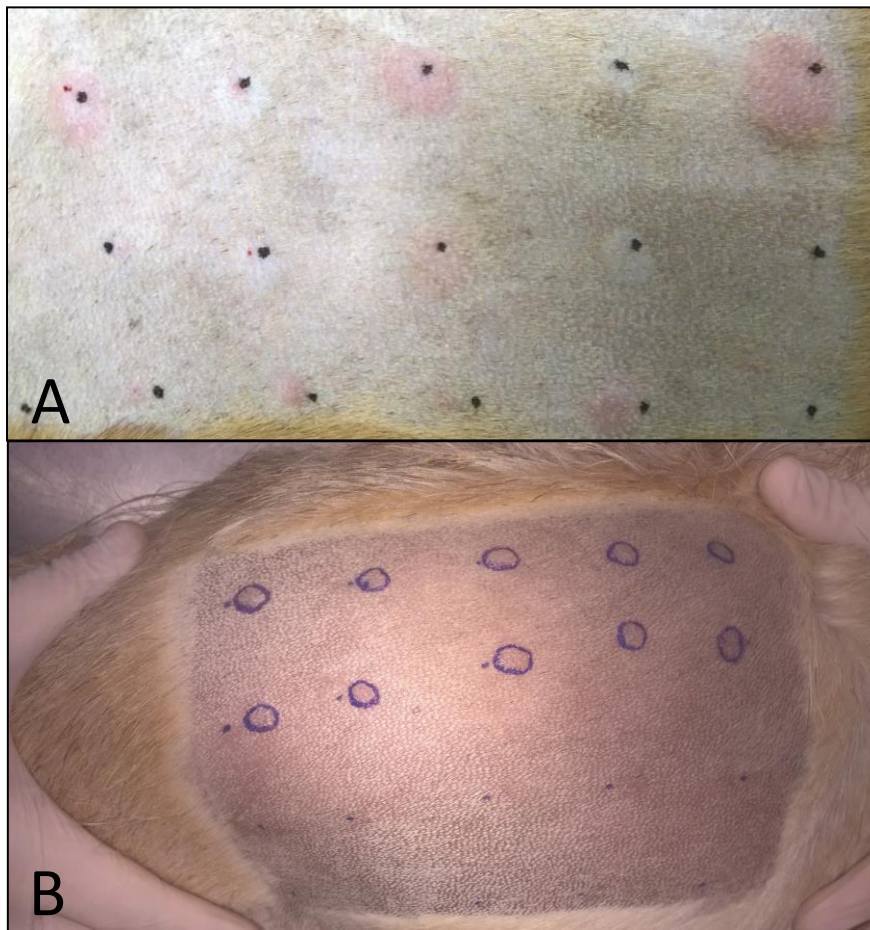


Figura 3A e 3B. Reações papulares após 15 minutos de inoculação de alérgenos suspeitos no teste intradérmico. Fonte: a autora.

O diâmetro das reações aos alérgenos é calculado a partir da média aritmética do diâmetro maior com sua perpendicular produzidos após sua aplicação intradérmica. Reações maiores ou iguais ao ponto de corte calculado são consideradas positivas (Hillier e Deboe., 2001).

O *Prick test* tem sido estudado em cães como uma alternativa mais tolerada, de mais fácil interpretação e com menor risco de reações sistêmicas quando comparado ao TID (Hillier e Deboer, 2001). Este é o teste padrão usado na Medicina desde sua descrição por Jack Pepys, em 1975.

Em gatos um estudo com o *Prick test* demonstrou reações de mais fácil análise quando comparadas com o teste intradérmico (Rossi et al., 2013). Em outro estudo mais recente, extratos glicerinados de salina e histamina foram utilizados como controle negativo e positivo no *Prick test* em gatos saudáveis, não causando nenhuma reação irritante (Gentry e Messinger, 2016). Em trabalho recente, Cunha e Souza (2015) compararam dois dispositivos para aplicação do *Prick test* em gatos, o Lancet® e Duotip II®, obtendo como resultado que ambos produzem reações papulares de fácil interpretação e aplicação.

Já foram realizados estudos em cães saudáveis que também evidenciaram ausência de reações positivas no *Prick test* (Rocha, 2012; Matias, 2013). E comparando-se o resultado do *Prick test* com o teste sorológico, houve boa correlação entre os mesmos em estudo realizado em 2015 (Lorente e Ruiz, 2015).

Um estudo comparando-se o TID com o *Prick test* foi realizado em 2015 por Carmona e colaboradores, evidenciando boa relação entre os dois testes na maioria dos alérgenos testados (Carmona et al., 2015).

Para realização do *Prick test*, é necessário a aplicação cutânea de uma gota de cada extrato com subsequente escarificação superficial da pele com o puntor em um ângulo de 45°. Após 15 minutos, é realizada a leitura do teste, avaliando-se formação de pápulas, que são consideradas positivas se apresentarem valor igual ou maior que 3mm (Heinzerling et al., 2013; Cunha e Souza, 2015; Van Der Valk et al., 2016).

A seleção de extratos deve ser feita de acordo com a incidência geográfica de determinados alérgenos e o grau de exposição do paciente. Os

alérgenos ambientais mais comumente associados ao eczema atópico em cães são os de ácaros da poeira doméstica, fungos anemófilos, ervas-daninhas, árvores e gramíneas, sendo a polisensibilização muito comum, mormente em cães com dermatite atópica crônica (Schick e Fadok, 1986).

Entre os pólenes, os de gramíneas são reportados como sendo os de maior importância no desenvolvimento de polinose no Brasil (Vieira, 2012; Baldaçara et al., 2013) porém a importância dos mesmos na Medicina Veterinária ainda não é bem estabelecida.

3. PÓLENS E ALÉRGENOS

Os pólenes anemófilos são aqueles cuja dispersão e transporte ocorre pelo ar, conferindo maior importância alergológica nas doenças respiratórias. Grãos de pólen secos ou desidratados podem se manter estáveis por séculos, possuem pouca atividade na matriz citoplasmática, forte atividade mitocondrial, partículas de polissacarídeos e grãos de amido (Stanley e Linskens, 1974).

Em decorrência do seu diâmetro, que varia de 20 a 55 µm, grãos de pólen de gramíneas intactos não apresentam probabilidade de alcançar vias aéreas inferiores e gerar sintomas alérgicos. Alérgenos de gramíneas possuem partículas microscópicas que são pequenas o suficiente para entrar nas vias aéreas e causar reações alérgicas (Taketomi et al., 2006).

Alérgenos de grãos de pólen são proteínas ou glicoproteínas, geralmente hidrossolúveis, biologicamente ativos, capazes de gerar uma resposta mediada por IgE extremamente rápida (Behrendt e Becker, 2001). Grânulos de amido já foram identificados como carreadores de alérgenos os quais eram liberados após o contato do pólen com a água. Estes grânulos foram associados à sintomas alérgicos em camundongos previamente sensibilizados ao pólen estudado, e associado a proliferação de linfócitos (Motta et al., 2004).

Os grãos de pólen também são capazes de liberar substâncias semelhantes a eicosanóides sob condições de umidade, o que favorece seu caráter inflamatório e alérgico (Behrendt et al., 2001), além de liberar grande

quantidade de proteases quando hidratados. Estas proteases podem ser capazes de induzir dano epitelial e não serem inibidas por antiproteases endógenas (Hassim, Maronese e Kumar, 1998). O rompimento das junções epiteliais facilita seu transporte transepidérmico, o acesso dos alérgenos às células dendríticas subepiteliais e a sensibilização (Robinson et al, 1997).

Características ambientais como alta umidade, tempestades, chuvas pesadas e poluentes também podem induzir processos de liberação de alérgenos por pólen. Em algumas situações como tempestades, por exemplo, os pólenes podem romper através de choque osmótico, liberando alérgenos (Taketomi et al., 2006). Partículas poluentes ambientais, como as provenientes da exaustão de motores a diesel, têm sido consideradas importantes indutoras da liberação de alérgenos de pólen no ar. Estes poluentes apresentam na sua constituição minerais como ferro, sílica, alumínio, magnésio, enxofre, manganês, entre outros, que teriam o efeito de concentrar muitas moléculas alergênicas em uma única partícula (Knox et al., 1997).

Dois mecanismos são sabidos como responsáveis pela liberação das partículas alergênicas pelo citoplasma do pólen em pessoas. No primeiro, o grão de pólen entra em contato direto com a mucosa em meio isotônico, quando a parede celular não oferece resistência à entrada de água, levando à rápida difusão dos alérgenos e induzindo sintomas alérgicos imediatos. (Vrtala et al., 1993; Taketomi et al., 2006). No segundo mecanismo, meios hipotônicos como a água da chuva permitiriam a rápida hidratação dos grãos de pólen e subsequente expulsão de materiais inaláveis contendo alérgenos que, devido ao seu tamanho reduzido, alcançariam vias aéreas, induzindo sintomas de asma (Suphioglu, 1998). Desta maneira, a liberação dos alérgenos do interior do grão de pólen é um determinante para sua atuação em indivíduos sensibilizados (Taketomi et al., 2006).

A liberação dos alérgenos de grãos de pólen pode ocorrer na superfície da mucosa do trato respiratório superior após exposição ao pólen e no ar ambiente. Assim, diferentemente do que ocorre com alérgenos provenientes de ácaros da poeira domiciliar, o risco de sensibilização a alérgenos de pólen não pode ser adequadamente estimado pela sua contagem ambiental (Taketomi et al., 2006).

Os pólenes de gramíneas são comumente associados à polinose em regiões de clima tropical e subtropical. Dentre estes, já foram descritos 11 grupos de alérgenos contidos em uma ou mais espécies (Suphioglu, 2000). Estes alérgenos são proteínas glicosadas e não glicosadas, que possuem estrutura, tamanho e propriedades físico-químicas variadas (Andersson e Lidholm, 2003) (QUADRO 1).

Os alérgenos do Grupo 1, que possuem peso molecular de 31-35 kDa, são os mais importantes, identificados em cerca de 95% dos pacientes humanos sensíveis a pólenes de gramíneas. O Grupo 5 (27-38 kDa) é o segundo mais importante, responsável por 85% da sensibilização dos pacientes humanos com polinose (Weber, 2003). Apesar de alérgenos do grupo 1 serem os mais prevalentes, os alérgenos do grupo 5 são capazes de induzir maiores níveis de anticorpos IgE (Duffort et al., 2008). Outros alérgenos de importância são pertencentes aos grupos 2, 3, 4 e 13, reconhecidos como causa de sensibilização em cerca de 50% dos pacientes alérgicos na medicina (Fahlbusch et al., 1998; Suck et al., 2000).

Pólenes de gramíneas são as principais origens de alérgenos ambientais em relatados em climas frios e temperados, havendo grande quantidade de relatos. No sul da Austrália e outras regiões de clima temperado, o pólen de gramínea clinicamente mais importante é o *Lolium perenne*, conhecido como *ryegrass* (Knox e Suphioglu, 1996). Outras espécies como *Poa pratensis* e *Phleum pratense*, entre outras, também podem ser consideradas clinicamente importantes dependendo da localização geográfica (Davies, 2005).

Gramíneas de diferentes espécies podem conter epítomos de pólen compartilhados, o que faz com que seus alérgenos apresentem similaridades imunoquímicas e reatividade cruzada (Bernardes et al., 2010). A reatividade cruzada entre pólenes de gramíneas se prolonga além do nível protéico. Porções de carboidratos (referidos como determinantes de reações cruzadas) também foram identificadas como estruturas capazes de se ligarem a IgE e causarem reações. Sendo assim, ocorrem limitações no diagnóstico sorológico na sensibilização a alérgenos de pólenes (Ebo et al., 2004).

Tabela 2. Grupos de alérgenos de pólenes de gramíneas e seus respectivos pesos moleculares. Adaptado: União Internacional das Sociedades de Imunologia I.U.I.S. (www.allergen.org); Mohapatra, Lockey e Shirley, 2005.

Alérgeno	Gramínea	Peso molecular (kDa)
Grupo 1	<i>Cynodon dactylon</i> , <i>Paspalum notatum</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Phalaris aquática</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	31-35
Grupo 2	<i>Cynodon dactylon</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	10-12
Grupo 3	<i>Lolium perenne</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Dactylis glomerata</i> ,	10-12
Grupo 4	<i>Cynodon dactylon</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	50-67
Grupo 5	<i>Cynodon dactylon</i> , <i>Lolium multiflorum</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Phalaris aquática</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	27-38
Grupo 6	<i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	12-13
Grupo 7	<i>Cynodon dactylon</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Phleum pratense</i> <i>Lolium perenne</i> , <i>Poa pratensis</i>	8,7-8,8
Grupo 10	<i>Lolium perenne</i> , <i>Cynodon dactylon</i> , <i>Poa pratensis</i>	12
Grupo 11	<i>Cynodon dactylon</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Phleum pratense</i>	16-18
Grupo 12	<i>Cynodon dactylon</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	14
Grupo 13	<i>Cynodon dactylon</i> , <i>Lolium perenne</i> , <i>Dactylis glomerata</i> , <i>Phleum pratense</i> , <i>Poa pratensis</i>	50-60

4. POLINOSE

No mundo inteiro estima-se que ao menos 40% dos pacientes alérgicos são sensibilizados a alérgenos de pólen de gramíneas (Anderson e Lidholm, 2003). Na Europa estima-se que esta sensibilização chegue a 70% (Bousquet et al., 2009). No Brasil, a maior prevalência de sensibilização polínica em indivíduos alérgicos ocorre no Sul e Centro-Oeste do País, variando entre 16% a 34% (Esteves et al., 1999; Rosário Filho, 2002; Vieira, Ferreira e Matter, 2005; Vieira, 2014; Sopelete, Vaz e Taketomi, 2014.).

A primeira publicação a respeito de polinose no Brasil foi em 1908, feita pelo Dr. A. Carini, que indagava e questionava a existência da febre do feno no país (Carini, 1908 apud Vieira, 1995). Entre os fatores que podem ter contribuído para o aparecimento da polinose no Brasil estão a introdução de gramíneas com pólen de elevado potencial alergênico, desmatamento, exploração agropecuária e aumento da população em áreas com estações climáticas bem definidas (Vieira, 2003).

As alergias a pólen, juntamente com ácaros de poeira doméstica, epitélio animal e mofo são as de maior importância em humanos, porém, alergias a pólen tem efeito significativo na qualidade de vida de pacientes comparado a sensibilização a ácaros da poeira doméstica, mesmo após muitos anos de exposição, se tornando pior quando a rinite é combinada com a asma (Klotseridis et al., 2013; Delgado et al., 2013).

Em humanos, a polinose é manifestada principalmente através de rinoconjuntivite alérgica ou asma brônquica. Os pacientes manifestam hiperemia conjuntival, epífora com prurido ocular, nasal e faringo-palatal, coriza e espirros comumente perenes, durante época de polinização, e hiperreatividade brônquica com asma associada pode ocorrer em 15 a 20% dos indivíduos (Solomon, 1984; Vieira, 1995)

A repetição de sinais clínicos clássicos de rinoconjuntivite associados ou não à asma brônquica por mais de uma estação polínica pressupõe o diagnóstico clínico de polinose. Testes de provocação nasal ou brônquica com antígenos polínicos e dosagem de IgE específica também são métodos auxiliares de diagnóstico (Vieira, 1995).

Alguns pacientes relatam sintomas que se manifestam antes de setembro e que persistam ou apresentem exacerbação até março e abril (Rosário Filho, 2012). Sinais de rinoconjuntivite alérgica fora da polinização podem ocorrer possivelmente pela presença de alérgenos no interior das residências. A teoria é de que animais domésticos, roupas e outros objetos podem albergar tais alérgenos, contribuindo para a manutenção dos mesmos no ambiente domiciliar (Reinberg et al., 1988).

Um estudo Alemão demonstrou a presença de altas concentrações de pólenes de determinadas gramíneas locais na poeira doméstica em épocas fora de polinização (Fahlbusch et al., 2000). Estudo posterior na Escócia detectou a presença de grãos de pólenes em análises individuais fecais de cães intradomiciliados, também fora da estação polínica (Fraser, Caulton e McNeil, 2001). Ambos os estudos evidenciam a presença de pólenes de gramíneas em ambiente doméstico mesmo fora de época de polinização, o que pode contribuir para sinais clínicos não sazonais

Além de sintomas respiratórios e oftálmicos, um estudo conduzido em 2016 identificou que pacientes humanos com dermatite atópica expostos a pólenes de gramíneas através do ar ambiente possuíam lesões eczematizantes mais graves, principalmente em locais do corpo expostos ao ar. Acredita-se que em decorrência da disfunção da barreira cutânea, a exposição alergênica é seguida de penetração direta do alérgeno na pele e contato direto do mesmo à células pré-ativadas da resposta imune inata e adaptativa (Werfel et al., 2016).

Alimentos como desencadeadores de reações alérgicas estão ganhando maior importância. Em torno de 60% das alergias alimentares em crianças, adolescentes e adultos estão relacionadas com alergias a inalantes. Em contraste com a alergia alimentar clássica, em que a sensibilização primária ocorre por via gastrointestinal, a sensibilização primária em alergias relacionadas a pólenes e outras reações cruzadas a alimentos são consideradas sendo contra aeroalérgenos. (Werfel et al., 2015). Em torno de 3% dos pacientes com diagnóstico de polinose e alergia alimentar também reportam histórico de dermatite atópica (Dondi et al., 2013). A reação cruzada é baseada na ligação de um anticorpo IgE a estruturas alergênicas homólogas, mostrando similaridade nos epítomos (lineares ou conformacionais). Essas estruturas

podem ser provenientes de proteínas ou carboidratos, apesar esta última não estar relacionada à sintomatologia clínica (Altmann, 2007; Werfel et al., 2015).

Anticorpos IgE reativos à carboidratos têm sido atribuídos à sensibilização a pólenes de gramíneas e encontrados realizando reação cruzada com estruturas glicanas de outras fontes alérgicas, particularmente alimentos vegetais (Mari et al., 2008). Outra causa de reação cruzada à pólenes de gramíneas está no grupo das profilinas que pertencem a família de proteínas altamente conservadas entre as plantas (Anderson e Lidholm, 2003). Estudos recentes confirmaram que IgE reagente a profilina de pólenes de gramíneas foi detectada em pacientes com asma, alergia alimentar e a pólen (Constantin et al., 2009). Pacientes com alergia ao trigo mostram extensa reação cruzada a outros grãos, mas pouco à pólenes de gramíneas taxonomicamente relacionados. Em contraste, pacientes unicamente com alergia a pólenes de gramíneas mostram reação cruzada extensa a grãos de cereais e gramíneas nos testes *in vitro*. Tomados em conjunto, o papel da alergia alimentar associado a pólen de gramíneas ainda necessita de mais estudos para ser inteiramente comprovado (Werfel et al., 2016).

4.1 Polinose no cão

Em cães, a alergia espontânea a pólen foi primeiramente descrita em 1941 por um médico alergista em uma fêmea, da raça Fox Terrier, de 4 anos e que apresentava espirros, secreção nasal, epífora e lesões cutâneas circunscritas pruriginosas em face e corpo. O mesmo conduziu com sucesso o tratamento do cão através de dessensibilização com injeções de extratos de pólenes (Wittich, 1941).

Nos anos 60, outro médico alergista desenvolveu uma colônia de cães sensíveis a pólenes, que demonstravam rinite e dermatites alérgicas. Quando expostos a altas concentrações de alérgenos, os cães eram induzidos à bronquite. A ênfase nos sinais respiratórios levou os pesquisadores a sugerir que a dermatite era secundária à entrada do alérgeno por via respiratória (Patterson, Chang e Pruzansky, 1963).

Na atualidade, está elucidado que todas as rotas de exposição alérgica, incluindo via oral, respiratória e epicutânea parecem promover papel importante no desencadeamento de crises alérgicas em cães. Porém, a via epicutânea parece ser a de maior importância na perpetuação de sinais clínicos da dermatite atópica (Olivry e Hill, 2001; Marsella, Nicklin e Lopez, 2006; Olivry et al., 2010). Esta teoria é suportada através de estudos que demonstraram que repetidas exposições por via percutânea a alérgenos, quando há comprometimento da barreira epidérmica, geram resposta Th2 e subsequente desenvolvimento de inflamação tegumentar e hiperplasia da população de células de Langerhans na epiderme (Marsella et al., 2006; Pucheu-Haston, et al., 2008).

Estudos conduzidos no Japão verificaram positividade a alérgenos de pólen de Cedro Japonês através de teste intradérmico em cães com dermatite atópica. (Sasaki et al., 1995). Masuda et al. (2000) verificaram positividade a este pólen em 10% dos cães com dermatite atópica, entretanto, a sensibilização a alérgenos de ácaros de poeira doméstica ainda foi prevalente. Em outro estudo em cães com conjuntivite e rinite, 21% possuíam sensibilização polínica (Favrot et al., 2010; Furiani et al., 2011).

Um estudo Australiano com teste intradérmico em 1000 cães com dermatite atópica demonstrou que 10 a 25% destes foram sensíveis a pólenes de qualquer tipo (gramíneas, árvores e ervas-daninhas) (Muller, Bettenay e Tideman, 2000). No Oeste francês, um estudo retrospectivo entre 1999-2010 identificou um aumento da incidência de sensibilização a alérgenos de pólenes de gramíneas de 14,4 para 27,7%. As reações positivas não foram influenciadas pelo período do ano em que o TID foi realizado, idade dos animais, gênero ou sazonalidade dos sinais clínicos. Acredita-se que o acúmulo dos alérgenos ambientais nas residências confirmam características não sazonais à doença (Roussel, Bruet e Bourdeau, 2013).

No Brasil, há poucos estudos que avaliaram de forma crítica à sensibilização a pólenes de gramíneas em cães com rinite ou bronquite crônica, rinoconjuntivite alérgica e dermatite atópica.

4.2 Pólens de gramíneas

Os pólenes de gramíneas são a principal causa de polinose no mundo, inclusive no Brasil. As de maior importância no Brasil, sobretudo na região sul, são pertencentes à família *Poaceae*, que se divide nas subfamílias *Pooideae*, *Chloridoideae* e *Panicoideae*, aos quais pertencem o *Lolium multiflorum*, *Cynodon dactylon* e *Paspalum notatum*, respectivamente (Figura 4). A subfamília *Pooideae*, na qual se encontra o *Lolium multiflorum*, possui os maiores alérgenos nos grupos 1 e 5, conferindo reatividade cruzada entre si (Vieira, 2012).

FAMÍLIA	SUBFAMÍLIA	TRIBO	ESPÉCIE	NOME COMUM
Poaceae	Panicoideae	Paniceae	<i>Paspalum notatum</i>	Gramma batatais
	Chloridoideae	Cynodonteae	<i>Cynodon dactylon</i>	Gramma seda
	Pooideae	Poeae	<i>Lolium multiflorum</i>	Azevém anual

Figura 4. Hierarquia filogenética das três gramíneas mais comuns no Brasil. O gênero foi omitido para simplificação. Adaptado de Lovborg et al., 1999.

4.2.1 *Lolium multiflorum*

O *Lolium multiflorum* (Lol m), popularmente conhecido como Azevém italiano (Figura 5), é uma gramínea da subfamília *Pooideae* com elevado potencial alergênico, sendo a principal causadora de polinose em humanos no Brasil. É uma forrageira de inverno não nativa, trazida ao Brasil por imigrantes Europeus com o objetivo de ser utilizada como alimentação animal. Esta gramínea propaga-se rápida e desordenadamente, incluindo áreas não agrícolas e grandes cidades (Dutra, Rosário Filho e Zavadniak, 2001; Vieira, 2002).

Na região sul do Brasil, o cultivo desta gramínea pode ser observado com

maior intensidade. Estima-se que uma área de 100m² de cultivo do *L. multiflorum* possa produzir cerca de 100kg de pólen e que um grama deste pólen contenha 100 milhões de grãos. Pacientes alérgicos sensibilizados à esta gramínea podem apresentar sintomas com apenas 5-10 grãos/m³ de ar (Vieira, 2003). Os alérgenos identificados até o momento de *L. multiflorum* são o Lol m 2 e Lol m 5 (Alergome.org).

Sintomas clínicos decorrentes de alergia a pólen de *L. multiflorum* iniciam-se geralmente em setembro, início da estação polínica, com exacerbação de sintomas em outubro e novembro, e prolongam-se até dezembro e janeiro (Rosário Filho, 1983).

Em um inquérito epidemiológico em Curitiba, Paraná, foi observado positividade a alérgenos de pólen de *L. multiflorum* em 4,7% de crianças e adolescentes e 15,4% em adultos com rinite e asma alérgicas através do *Prick test* (Esteves et al., 1999).

Em 2002, Rosário Filho detectou 16,5% de reatividade cutânea ao extrato de pólen *Lolium perenne* em Curitiba. Em estudo mexicano com 173 pessoas alérgicas, foi encontrada positividade de 5,2% para *Lolium perenne* (Rojas-Méndez et al., 2017). Acredita-se que *L. multiflorum* seja capaz de produzir alta reatividade cruzada com *Lolium perenne* (Bernardes et al., 2010).

Em Uberlândia, uma pesquisa envolvendo 50 indivíduos com rinite alérgica detectou positividade de 34% para *L. multiflorum* através do *Prick test* (Sopelete, José Vaz e Taketomi, 2014). Estudo mais recente conduzido em Curitiba detectou 14,9% de positividade para *L. multiflorum* através do *Prick test* (Araújo, Rosário e Mari, 2016).

Em cães com dermatite atópica, a sensibilização a *L. multiflorum* e *perenne* ainda não foi investigada.



Figura 5. *Lolium multiflorum* (Azevém italiano). Fonte: Naturespot.

4.2.2 *Cynodon dactylon*

O *Cynodon dactylon* (Cyn d), comumente chamado de grama bermuda (Figura 6), é uma gramínea da subfamília *Chloridoideae* considerada ruderal, fixada e adaptada a áreas próximas de estradas e ferrovias, parques públicos, terrenos baldios, entre outros. Pode ser considerada uma gramínea invasora de difícil controle, capaz de infiltrar em áreas de lavouras (Vieira, 2014).

Diferente do *L. multiflorum*, o *C. dactylon* não possui alérgenos do grupo 5, sendo principais neste grupo de gramíneas alérgenos do tipo 1. Esta subfamília possui elevado potencial alergênico (Vieira, 2012) e parece não ter sensibilização cruzada com a subfamília *Pooideae*. Até o momento foram identificados 15 alérgenos e seus isoalérgenos e variantes para *C. dactylon* (Cyn d 1, Cyn d 2, Cyn d 4, Cyn d 5, Cyn d 6, Cyn d 7, Cyn d 11, Cyn d 12, Cyn d 13, Cyn d 15, Cyn d 22w, Cyn d 23, Cyn d 24, Cyn d CP e Cyn d EXY) (Allergome.org). Foi sugerido que Cyn d 1 e Cyn d 7 exibiam reatividade cruzada com outras gramíneas, mas os resultados não foram consistentes (Lorenz et al., 2009).

Estudos conduzidos em Cuba, onde esta gramínea possui ampla distribuição, revelaram que mais de 50% dos pacientes com asma ou rinite alérgicas eram sensibilizados (Rodriguez-Pérez et al., 2009). Estudo no México obteve 9,25% de positividade para *C. dactylon* em pacientes alérgicos (Rojas-

Méndez et al., 2017). Em São Paulo, 9,4% das crianças na faixa etária de nove a 15 anos que apresentavam sinais alérgicos respiratórios reagiram a *C. dactylon* (Neves Forte, 2001).

Um estudo realizado em Goiânia com 211 pacientes que apresentavam rinite alérgica revelou 19% de monossensibilização a *C. dactylon* e 50% de cossensibilização de *C. dactylon* e *Paspalum notatum* através do *Prick test* (Vieira, 2014). Em Uberlândia, outro estudo similar com 50 indivíduos alérgicos resultou em 16% de positividade para o *C. dactylon* através do *Prick test* (Sopelete, José Vaz e Taketomi, 2014). Estudo mais recente apresentou 16,8% de positividade em análise molecular para Cyn d 1 em crianças alérgicas no município de Curitiba (Araújo, Rosário e Mari, 2016).

Na Medicina Veterinária, um estudo atual em Santa Maria, Rio Grande do Sul, com 58 cães diagnosticados com dermatite atópica revelou através de teste intradérmico positividade para *C. dactylon* em 14 animais (24,13%) (Pereira et al., 2015).



Figura 6. *Cynodon dactylon* (Grama bermuda). Fonte: Max Licher.

4.2.3 *Paspalum notatum*

O *Paspalum notatum* (Pas n), pertencente à subfamília *Panicoideae*, é também conhecido como Grama Bahia (Figura 7), Capim-de-pasto ou Grama Batatais e é tido como uma gramínea de elevado potencial alergênico no Brasil, já que é bastante adaptada ao clima tropical. Esta é amplamente utilizada

como pastagem por pecuaristas e é um importante recurso forrageiro (Vieira, 2012).

Assim como o *C. dactylon*, o *P. notatum* apresenta ausência ou baixa sensibilização cruzada com a subfamília *Pooideae*, na qual faz parte o *L. multiflorum*. Igualmente, o alérgeno tipo 1 é o de maior importância alergênica, sendo o tipo 5 inexistente (Vieira, 2011). Os alérgenos identificados até o momento são o Pas n 1 e o Pas n 13 (Allergome.org).

Em 2001, uma pesquisa em São Paulo com 287 crianças com asma ou rinite alérgicas verificou através do *Prick test* positividade de 9,9% ao *P. notatum* (Neves Forte, 2001). Outro estudo multicêntrico foi realizado em indivíduos com polinose nas cidades de Caxias do Sul e Santo Ângelo, no Rio Grande do Sul, em 2009 e 2010. A partir de resultados com *Prick test* foi constatada sensibilização ao *P. notatum* de 87,3% em Caxias e 51,3% em Santo Amaro em pacientes com polinose (Vieira, 2011). Em Uberlândia, estudo semelhante encontrou 14% de sensibilização alérgica ao *P. notatum* (Sopelete, José Vaz e Taketomi, 2014).

Em Santa Maria, um estudo a fim de verificar sensibilização alérgica a alérgenos ambientais através do teste intradérmico foi conduzido em 58 cães com dermatite atópica *stricto sensu* e 12% se mostraram sensíveis a *P. notatum* (Pereira, 2015).



Figura 7. *Paspalum notatum* (Gramma bahia). Fonte: Justin du Toit.

No Brasil há escassos estudos críticos que avaliem a sensibilização de cães com dermatite atópica *stricto sensu* a alérgenos de pólenes de gramíneas em seus múltiplos ecossistemas.

O reconhecimento do papel da sensibilização a pólenes de gramíneas em cães com dermatite atópica pode colaborar para seu controle, tratamento e manejo ambiental. Além disso, é necessário identificar o melhor teste alérgico para identificar estas sensibilizações, o qual possua boa sensibilidade e especificidade.

O objetivo deste trabalho é verificar a sensibilização à pólenes de gramíneas em cães com dermatite atópica *stricto sensu* em Curitiba através do *Prick test*, comparando-o com o teste intradérmico. Além disto, comparar entre os animais positivos quais são intra ou extradomiciliados. Estes resultados nos permitirão levantar a hipótese de polinose em cães, além de aprimorar os testes diagnósticos da dermatite atópica canina.

CAPÍTULO 2

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIZAÇÃO A PÓLENS DE GRAMÍNEAS POR TESTES CUTÂNEOS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA EM CURITIBA, BRASIL

Evaluation of grass pollen sensitization with cutaneous tests in dogs with atopic
dermatitis in Curitiba, Brazil

Ana Paula S. Cerdeiro^I, Marconi Rodrigues de Farias^I, Victor do Espírito Santo
Cunha^{II}, Gisele Vieira Secchi^I, Bruna Duarte Pacheco^I

Avaliação da sensibilização a pólenes de gramíneas por testes cutâneos em cães com dermatite atópica em Curitiba, Brasil.

Evaluation of grass pollen sensitization with cutaneous tests in dogs with atopic dermatitis in Curitiba, Brazil

Ana Paula S. Cerdeiro^I, Marconi Rodrigues de Farias^{*I}, Victor do Espírito Santo Cunha^{II}, Gisele Vieira Secchi^I, Bruna Duarte Pacheco^I

Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR, Brasil.

^{II}FDA Alergenic, Rio de Janeiro, Brasil.

marconi.puc@terra.com.br

A dermatite atópica canina é uma morbidade alérgica inflamatória, pruriginosa, genética e crônica ligada à produção de anticorpos da classe Imunoglobulina E e que pode acometer em torno de 20% da população canina. Entre os alérgenos de importância clínica na doença, estão os pólenes de gramíneas, considerados extremamente importantes no desencadeamento de crises alérgicas na medicina. O objetivo deste trabalho foi identificar a incidência de sensibilização à pólenes de gramíneas através da comparação entre o Teste Intradérmico e o *Prick test* em cães com dermatite atópica na cidade de Curitiba (PR), além de levantar entre os positivos quais são intradomiciliados ou extradomiciliados. Para o estudo, foram utilizados 10 cães hígidos para o grupo controle e 39 cães apresentando dermatite atópica *stricto sensu*. Estes cães foram submetidos a Teste Intradérmico e *Prick test* para as três gramíneas de maior importância alergológica em humanos no Brasil, *Lolium multiflorum*, *Cynodon dactylon* e *Paspalum notatum*. Os cães do grupo controle foram todos negativos em ambos os testes. Foi observada positividade no grupo experimental em 10 animais (25,6%) no *Prick test* e nenhum positivo no teste intradérmico. Comparou-se os dois testes através de Teste de Proporção, obtendo $p < 0,05$, indicando que a proporção de casos positivos no *Prick test* é estatisticamente maior que no Teste Intradérmico. Entre os animais reativos, 80% possuíam exposição ambiental contínua ou esporádica. A gramínea com maior incidência entre os cães positivos foi *Cynodon dactylon* (70%) e *Lolium*

multiflorum (70%), seguidos do *Paspalum notatum* (30%). Foi possível concluir que cães com dermatite atópica canina em Curitiba estão sensibilizados a pólenes de gramíneas presentes no país e que o *Prick test* foi capaz de detectar maior sensibilização polínica. Cães com exposição ambiental contínua ou esporádica em Curitiba apresentaram maior sensibilização à alérgenos de pólenes de gramíneas quando comparados a cães intradomiciliados.

Palavras-chave: *Prick test*; *Cynodon dactylon*; *Paspalum notatum*; *Lolium multiflorum*; Dermatite atópica canina

ABSTRACT

Canine atopic dermatitis is an inflammatory, pruritic, genetic and chronic allergic disease linked to IgE antibodies production and it's believed to affect around 20% of canine population. Among clinic important allergens are grass pollens, considered extremely important in triggering allergic crises in human medicine. The aim of this study was to identify grass pollen sensitization incidence by intradermal test and prick test comparison in dogs with atopic dermatitis in Curitiba (PR) and identify between positive dogs environmental exposure. For the study, 10 healthy dogs were used for control group and 39 dogs presenting *stricto sensu* atopic dermatitis. These dogs were submitted to intradermal and *prick test* for the three most important allergenic grasses in people in Brazil, *Lolium multiflorum*, *Cynodon dactylon* and *Paspalum notatum*. The dogs in the control group were all negative to both tests. Positivity were observed in the experimental group in 25,6% (10) of the animals in the prick test and no positivity in the intradermal test. The two tests were compared with Proportion test, obtaining $p < 0,05$, indicating that the proportion of positive cases in the prick test is statistically higher than in the intradermal test. Among reactive animals, 80% had continuous or sporadic environmental exposure. The grass with the highest incidence among positive dogs was *Cynodon dactylon* (70%), followed by *Lolium multiflorum* (70%) and *Paspalum notatum* (30%). It was concluded that dogs with canine atopic dermatitis in Brazil are sensitized to grass pollen present in the country and that skin prick test was able to detect grater pollen sensitization when compared to intraternal test. Dogs with continuous or sporadic environmental exposure in Curitiba presented greater sensitization to grass pollen allergens when compared to intradomiciliated dogs without any type of environmental exposure.

Keywords: Prick test; *Cynodon dactylon*; *Paspalum notatum*; *Lolium multiflorum*; Canine atopic dermatitis.

INTRODUÇÃO

A dermatite atópica em cães (DAC) é uma dermatopatia pruriginosa, inflamatória, crônica e de predisposição genética, que acomete cerca de 20% da população canina (Carlotti, 2012). Esta decorre da perda de função de barreira física tegumentar e hiperreatividade imunológica, e estima-se que aproximadamente 80% dos cães com DAC apresentem níveis aumentados de IgE alérgeno específico, mormente a alérgenos ambientais, microbianos e alimentares (Pucheu-Haston *et al.*, 2015).

Entre os principais alérgenos ambientais relacionados com dermatite atópica em cães estão os alérgenos de ácaros da poeira doméstica, de ervas-daninhas, arbustos e gramíneas (Prélaud, 2014). Em humanos, os pólenes de gramíneas desempenham um papel importante na exacerbação de crises de rinite e asma alérgicas, verificando-se sensibilização em 16 a 34% dos pacientes no Brasil, com variação dependente da região geográfica (Rosário Filho, 2002; Vieira, 2011; Vieira, 2014; Sopelete *et al.*, 2016), com subsequente diminuição na qualidade de vida destes pacientes (Delgado *et al.*, 2013). Em pessoas com dermatite atópica com IgE mediada por fatores extrínsecos, foi verificada que a exposição a pólenes de gramíneas induz piora significativa nos sintomas cutâneos (Werfel *et al.*, 2016).

As gramíneas de maior importância alergênica no Brasil são pertencentes à família *Poaceae*, que se divide nas subfamílias *Pooideae*, *Chloridoideae* e *Panicoideae*, aos quais pertencem o *Lolium multiflorum* (Azevém), *Cynodon dactylon* (grama bermuda) e *Paspalum notatum* (Grama Bahia), respectivamente. A subfamília *Pooideae* possui os alérgenos maiores nos grupos 1 e 5, e pode conferir reatividade cruzada com outras espécies da mesma subfamília e com espécies de outras subfamílias (Vieira, 2012). Entre elas, o *Lolium multiflorum* é tido como a de maior importância alergênica em humanos no Brasil (Rosário Filho, 2012).

Raros estudos têm sido conduzidos na medicina veterinária a fim de verificar a incidência de polinose no Brasil. Estudo recente de teste cutâneo intradérmico (TID) realizado em 58 cães com dermatite atópica *stricto sensu* no Rio Grande do Sul resultou em positividade de 24,13% para *Cynodon dactylon* e 12% para *Paspalum notatum* (Pereira *et al.*, 2015). A sensibilização à *Lolium multiflorum* não foi avaliada.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilização a alérgenos de pólenes das gramíneas *Cynodon dactylon*, *Lolium multiflorum* e *Paspalum notatum* através do *Prick test* em cães com dermatite atópica em Curitiba (PR), e comparar os resultados com o do teste cutâneo intradérmico. Entre os positivos, também foi realizado levantamento entre os animais intradomiciliados e os extradomiciliados.

MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob o registro número 1027/2016, e teve caráter transversal, não randomizado e controlado. Os cães incluídos foram provenientes da Clínica Veterinária Escola da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Conforme descrito por Cunha e colaboradores (2015), foi realizado teste de proficiência para TID previamente à realização dos testes. Foram submetidos ao teste intradérmico com extratos de histamina 10mg/ml e salina 0,9% fenolada 10 cães hígidos de qualquer idade, raça ou gênero. Em cada animal, foram aplicados 10 vezes o extrato de histamina e 10 de salina por via intradérmica e após 15 minutos mensuradas as pápulas. A aptidão para realização do teste foi obtida pela autora após verificação de coeficiente de variação menor que 10% entre os valores populares.

O grupo controle (Grupo 1) foi composto de 10 cães hígidos, sem histórico de doença sistêmica ou cutânea, independente de raça ou gênero. O grupo de cães alérgicos (Grupo 2) foi composto por 39 cães de qualquer idade, gênero ou raça diagnosticados com dermatite atópica que apresentaram no mínimo seis dos oito critérios estabelecidos por Favrot (2010), e persistência de prurido integral ou parcial mesmo após exclusão de outras dermatopatias pruriginosas e serem submetidos a dieta comercial hidrolisada por no mínimo cinco e máximo oito semanas.

Não foram incluídos no projeto cães que haviam sido medicados com anti-histamínicos pelo prazo de duas semanas, glicocorticoides sistêmicos ou tópicos por três semanas e injetáveis de longa duração por quatro semanas; fêmeas em período de estro; gestação ou lactação; cães com doenças sistêmicas crônicas, que fizessem uso de medicação regular ou animais que apresentassem qualquer outra dermatopatia.

Todos os cães do grupo 1 e 2 foram submetidos sequencialmente ao teste intradérmico (TID) e *Prick test*. Foi realizada tricotomia com máquina de tosa e lâmina

40 na região lateral do tórax. Após higienização do local com solução fisiológica, foram feitas marcações dos pontos de aplicação com intervalo de três centímetros de distância entre cada um com caneta dermatográfica.

Para controle positivo no *Prick test*, foi utilizado cloridrato de histamina (10mg/ml de histamina base) e como controle negativo, solução salina contendo 0,45% de fenol. Os extratos alergênicos glicerinados de *Lolium multiflorum*, *Cynodon dactylon* e *Paspalum notatum* foram utilizados na concentração de 10 HEP (10.000 UBE/mL), concentração utilizada na medicina. Todos os extratos foram fornecidos pela FDA Allergenic.

Após aplicação de uma gota de cada extrato nos locais previamente marcados foi utilizada manobra com o puntor Duotip-test II® (Multi-test Brasil) em ângulo de 45° que permitisse uma leve escarificação epidérmica e a penetração do extrato alergênico por via percutânea. Na sequência, toalha absorvente foi utilizada para retirar o excesso de extrato. Após 15 minutos foi realizada a leitura do teste e avaliada a formação de pápulas. Foram considerados positivas pápulas que obtiveram valor igual ou maior que 3mm acima controle negativo, conforme recomendado por Van der Valk e colaboradores (2016).

Para realização do TID nos grupos 1 e 2 foi utilizado como controle negativo solução salina 0,9% fenolada e como controle positivo solução contendo 0,05mg/ml de histamina-base. Sensibilização a poléns foi avaliada com extratos purificados e padronizados de *Lolium multiflorum*, *Cynodon dactylon* e *Paspalum notatum* na concentração de 100 UBE/ml. Todos os extratos foram fornecidos pela FDA Allergenic (Laboratório de antígenos, Rio de Janeiro, Brasil).

As aplicações foram realizadas no espaço intradérmico com seringas de insulina de 0,5 ml e agulhas de 8 mm de comprimento e 0,3 mm de calibre, contendo 0,05 ml de cada extrato purificado de pólen de gramíneas. Após 15 minutos da aplicação, foi realizada leitura do teste. Marcações com caneta dermatográfica foram feitas ao redor das pápulas para facilitar a aferição. O diâmetro médio das pápulas formadas pelo controle positivo e negativo foram avaliadas e registrados. O *Cut off* foi estabelecido com o cálculo da média entre os valores obtidos para o controle negativo (CN) e controle positivo (CP). As respostas aos antígenos testados foram consideradas positivas quando o diâmetro médio das pápulas formadas foi igual ou superior ao valor do ponto de corte calculado.

Os resultados do *Prick test* e intradérmico no diagnóstico da sensibilização alérgica a gramíneas em cães com DA foram comparados de forma descritiva, e em seguida pelo Teste de Proporções, utilizando o software Minitab16® com nível de significância $\alpha = 0,05$ ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS

Entre os 10 cães incluídos no grupo controle, cinco eram fêmeas e cinco eram machos, sete eram cães mestiços e havia um cão das raças Labrador (1/10), Pitbull e Boiadeiro Australiano, sendo a mediana de idade 5 anos.

Todos os cães do Grupo 1 foram negativos no controle negativo com salina fenolada e com os extratos alergênicos, tanto no TID como no *Prick test*. A média papular da histamina no TID foi de 14,5mm e no *Prick test* 7,45mm.

No grupo experimental, dos 39 cães com dermatite atópica testados, 26 (66%) eram fêmeas e 13 (44%) machos. A idade mediana foi de 5 anos, com idades variando de um a 14 anos. Ao todo foram avaliados oito (20,5%) Lhasa Apsos, seis Shih Tzus (6/15,3%) e quatro mestiços (4/10,2%). As demais raças incluídas estão citadas na Tabela 1.

Tabela 1. Relação de raças entre os 39 cães com dermatite atópica *Stricto sensu* testados para pólenes no *Prick test* e intradérmico.

Raça	Quantidade	Raça	Quantidade
Lhasa Apso	8	Jack Russel	1
Shih Tzu	6	Pug	1
Mestiço	4	Spaniel Tibetano	1
Yorkshire	3	Boxer	1
Poodle	3	Schnauzer	1
Bichon frisé	2	Bulldog francês	1
Golden	2	Welsh Terrier	1
Maltês	1	Cocker	1

No *Prick test*, dos 39 cães avaliados, 10 (25,6%) cães reagiram a pólenes, sendo que sete (17,9%) reagiram ao *Cynodon dactylon* com média papular de 3,64mm, sete (17,9%) reagiram ao *Lolium multiflorum* com média papular 4mm e três (7,69%) reagiram ao *Paspalum notatum* com média papular de 3,5mm. Dois animais reagiram aos três pólenes testados e três reagiram a dois. Monossensibilização polínica ocorreu em cinco cães. A média das pápulas de histamina foi de 9,75 mm.

No TID, dos 39 cães avaliados, nenhum foi positivo para os pólenes testados. A média das pápulas de histamina foi de 15,44 mm. A mediana de idade dos animais

apresentando positividade para um ou mais pólen testados foi de 6. A comparação entre a reação papular da histamina no TID e positivo para pólen de gramínea no *Prick test* é mostrada na Fig.2.

Entre os 10 cães positivos para pólen, três eram predominantemente intradomiciliados (30%), dois exclusivamente de ambiente externo (20%) e cinco intercalavam entre ambiente domiciliar interno e externo (50%). Os cães exclusivamente intradomiciliados eram provenientes de apartamentos, os que intercalavam ambiente interno e externo habitavam casas com livre acesso a quintal com jardim e os animais exclusivamente de ambiente externo obtinham livre acesso somente aos quintais e jardins das casas.

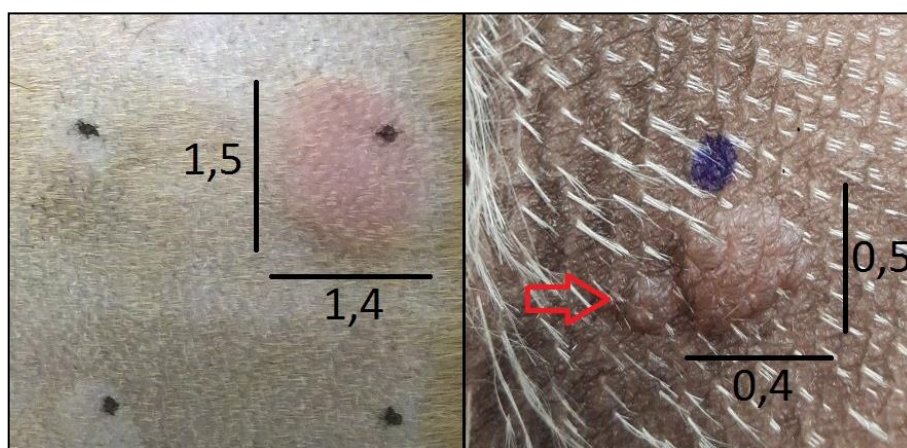


Figura 2. Comparação da reação papular da histamina e positivo para pólen de gramínea em centímetros no teste intradérmico (esquerda) e *prick test* (direita). Observar formação de pseudópodo (seta).

A partir da avaliação pelo teste de proporção, o *Prick test* se mostrou mais eficaz em identificar sensibilização ao *Cynodon dactylon* e *Lolium multiflorum* ($p=0,002$) e ao *Paspalum notatum* ($p=0,036$) em relação ao teste intradérmico nos cães com dermatite atópica.

Em relação à segurança, em ambos os testes nenhum paciente apresentou reações adversas. Porém, houve menor incômodo por parte dos pacientes na aplicação do *Prick test* comparado ao teste intradérmico.

DISCUSSÃO

No presente estudo, o *Prick test* e intradérmico apresentaram alta especificidade, justificada pela falta de animais positivos no grupo controle, porém, o *Prick test*

detectou maior sensibilização a alérgenos de pólenes nos cães com dermatite atópica avaliados.

Para o teste intradérmico, a concentração dos extratos alergênicos deve idealmente ser selecionada a partir de limiar irritativo em cães saudáveis, caso contrário pode gerar resultados falso-positivos quando aplicada em cães com dermatite atópica (Ferreira, 2013). Porém, acredita-se que testes intradérmicos baseados em limiar irritativo apresentam alta especificidade e baixa sensibilidade no diagnóstico da sensibilização alérgica, podendo gerar inversamente grande número de pacientes falso-negativos, fato que parece ter ocorrido no presente trabalho.

Outro fator que diminui a sensibilidade do TID é sua forma de interpretação. Na medicina veterinária, o teste considera os valores dos controles positivos e negativos para se definir o ponto de corte e a partir deste selecionar pacientes positivos e negativos (Hillier e Deboer, 2001). Na medicina, o teste possui sensibilidade maior, pois leva em consideração qualquer reação papular acima do controle negativo, indicando IgE alérgeno-específica (Oppenheimer e Nelson, 2006). Como o resultado no *Prick test* não leva em conta o valor da pápula de histamina, é considerado positivo quando o valor papular do extrato é igual ou superior a 3mm da média do controle negativo (Berstein *et al.*, 2008), sua sensibilidade acaba aumentando quando comparado ao TID baseado em ponto de corte.

Estima-se que a sensibilização polínica em pessoas alérgicas no Brasil varie de 16% a 34%, sendo mais prevalente no Sul e Centro-Oeste do país (Rosário Filho, 2002; Vieira, 2011; Vieira, 2014; Sopelete *et al.*, 2016). Na medicina veterinária, a prevalência de sensibilização a pólenes de gramíneas em cães com dermatite atópica varia entre 10 a 27,7 % (Masuda *et al.*, 2000; Roussel *et al.*, 2013). No Brasil, a sensibilização a pólenes em cães com DAC foi pouco estudada, encontrando-se em torno de 10,3% de prevalência no sul do país através de TID (Pereira *et al.*, 2015). No presente estudo, foi verificada sensibilização de 25,6% para alérgenos de pólenes em cães com dermatite atópica através do *Prick test*, valor muito próximo aos encontrados em estudos conduzidos em pessoas no Brasil e superior ao encontrado nos estudos veterinários brasileiros.

Entre os cães positivos para pólenes do presente estudo, 70% tinham exposição ambiental contínua ou esporádica, habitando casas e possuindo acesso a quintal, áreas de jardim e parques, justificando grande exposição a alérgenos de pólenes e

subsequentemente maior sensibilização. A positividade nos cães intradomiciliados sem contato externo ambiental pode ser justificada pela deposição de alérgenos de pólen no interior das residências, uma vez que os pólenes são muito leves e facilmente carregados pelo vento, podendo acumular-se nos domicílios mesmo em épocas não polínicas (Fahlbusch *et al.*, 2000).

Neste trabalho, *Cynodon dactylon* e *Lolium multiflorum* foram as principais espécies de pólenes responsáveis pela sensibilização em cães com dermatite atópica. Tal fato pode ser explicado pela ampla distribuição destas gramíneas na região Sul (Viera, 2012) e exposição dos cães extradomiciliados aos seus alérgenos. Em Curitiba, estas gramíneas podem ser encontradas ao longo de estradas, quintais e parques.

O *Lolium multiflorum* é considerado a principal gramínea causadora de polinose no Brasil, gerando principalmente rinoconjuntivite e asma alérgicas em pessoas (Rosário Filho, 2012). Isto se deve pela ampla distribuição e aumento do seu cultivo ao longo dos anos, além do seu pólen de elevado potencial alergênico ser produzido em larga escala e em época de floração se espalhar rapidamente com o vento (Bonissoni e Neto, 2014). Em Curitiba, um trabalho realizado em 1999 encontrou positividade em teste cutâneo alérgico para *Lolium multiflorum* em 4,7% de crianças de 13 a 14 anos e 15,4% de adultos com mais de 20 anos de idade (Esteves *et al.*, 1999). Estudo conduzido em 2002 verificou positividade para *Lolium perene* de 16,5% em testes alérgicos cutâneos (Rosário Filho, 2002). Na medicina veterinária a incidência de sensibilização ao *Lolium multiflorum* ainda não havia sido levantada e, no presente estudo, foi encontrado positividade de 12,8% para esta gramínea entre os cães apresentando dermatite atópica, similar aos valores da medicina.

Apesar do *Lolium multiflorum* ser a principal gramínea causadora de polinose em pessoas no Brasil, outras espécies como *Cynodon dactylon* foram destacadas como de importância alergênica, justificando a manutenção de sintomas além dos meses de setembro e dezembro (Rosário Filho, 2012). Em Curitiba-PR, foi identificada sensibilização de 16,8% ao *Cynodon dactylon* em pacientes com rinite (Araújo *et al.*, 2015) e no Rio Grande do Sul, a sensibilização a esta gramínea em indivíduos alérgicos chega a 80% (Vieira *et al.*, 2011). Um estudo conduzido em cães em 2015 encontrou 24,13% de sensibilização ao *Cynodon dactylon* em cães com dermatite atópica através do teste intradérmico (Pereira *et al.*, 2015). No presente estudo, a positividade a esta gramínea foi próxima aos demais trabalhos citados.

A menor incidência de positividade entre os cães apresentando dermatite atópica neste trabalho foi ao *Paspalum notatum*. Esta gramínea parece ter grande importância alergênica, porém menor quando comparados ao *Lolium multiflorum* e *Cynodon dactylon* na medicina e na medicina veterinária (Vieira, 2011; Pereira *et al.*, 2015). Reações positivas ao *Paspalum notatum* foram acompanhadas de reações positivas ao *Cynodon Dactylon* nos cães testados, o que poderia sugerir reação cruzada entre seus alérgenos. Porém, dados de literatura demonstram limitada a baixa reatividade cruzada entre *Paspalum notatum* e alérgenos de azevém e outras gramíneas clinicamente relevantes (Davies *et al.*, 2005). Em cães, ainda não foram descobertos os alérgenos principais nestas espécies de gramíneas, portanto não podemos descartar ou comprovar a hipótese de reação cruzada entre *Cynodon dactylon* e *Paspalum notatum* neste trabalho.

A reatividade cruzada entre pólenes de gramíneas e alimentos já foi anteriormente relatada. Estudo conduzido estrangeiro conduzido em 1988 sugeriu reação cruzada entre pólenes de gramíneas locais com alguns vegetais, como amendoim e tomate (Martino *et al.*, 1988). Outros estudos identificaram que reações cruzadas podem ocorrer entre pólenes de gramíneas e alimentos em decorrência da porfirina, encontrada nas gramíneas *Cynodon dactylon* e *Lolium multiflorum*. Valores suficientes de porfirina capazes de se ligarem a anticorpos IgE foram encontradas em cebolas, abacate, cenoura, tomate, entre outros alimentos (Vieth *et al.*, 2002; Constantin *et al.*, 2009; Alvarado *et al.*, 2014). No presente estudo, esta correlação não foi avaliada.

A ampla quantidade de resultados negativos pode ser explicada pela sensibilização a outros alérgenos ambientais, principalmente provenientes de ácaros da poeira doméstica que são importante causa de precipitação de dermatite atópica em cães, sobretudo os intradomiciliados (Randall *et al.*, 2003; Fernández-Caldas, 2013; Bizikova *et al.*, 2015), maioria dos cães do presente estudo. Entretanto, estima-se que cerca de 30% dos pacientes com diagnóstico clínico de dermatite atópica possuam exames cutâneos negativos (Bauer *et al.*, 2010). Tal fato sugere componente inflamatório inato e celular mediado para o desenvolvimento do prurido e sintomas relacionados a dermatite atópica em alguns pacientes, sem relação evidente com sensibilização e formação de IgE (Halliwell, 2006). Estes fatos podem explicar alguns resultados negativos observados.

Nenhum efeito adverso sistêmico ou local foi observado no *Prick test* e no TID, mostrando a segurança dos testes em cães. Alguns pacientes apresentaram somente

efeitos locais caracterizados por prurido e eritema, sinais que desapareceram em curto período de tempo. Em pessoas, o *Prick test* gera menor quantidade de reações adversas quando comparado ao TID, ocorrendo em alguns casos reações fatais neste último (Berstein *et al.*, 2004).

CONCLUSÃO

O *Prick test* foi mais eficaz em identificar sensibilização a pólenes de gramíneas em cães com dermatite atópica do que o teste cutâneo intradérmico. A sensibilização a pólenes de gramíneas ocorreu em um quarto dos cães estudados, sendo mais comum ao *Cynodon dactylon* e ao *Lolium multiflorum* no *Prick test*. Cães com exposição ambiental contínua ou esporádica em Curitiba apresentaram maior sensibilização à alérgenos de pólenes de gramíneas quando comparados a cães intradomiciliados sem qualquer tipo de exposição ambiental.

AGRADECIMENTOS

À CAPES/CNPQ pelo fornecimento de bolsa e à FDA Allergenic por disponibilizar os extratos de pólenes sem custo.

ANEXO ARTIGO

Tabela 2. Resultado de reatividade no *Prick test* e no TID nos 39 cães do grupo experimental. Resultado negativo é representado por **0**, e a reação positiva por **1**; Cyn: *Cynodon dactylon*; Lol: *Lolium multiflorum*; Pas: *Paspalum notatum*.

Cães	<i>Prick test</i>			Teste intradérmico		
	Cyn	Lol	Pas	Cyn	Lol	Pas
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	1	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	1	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
13	1	1	0	0	0	0
14	1	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	0	0	0	0
17	0	0	0	0	0	0
18	0	1	0	0	0	0
19	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0
21	0	0	0	0	0	0
22	1	1	1	0	0	0
23	1	1	1	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0
33	1	1	0	0	0	0
34	0	0	0	0	0	0
35	0	1	0	0	0	0
36	1	0	1	0	0	0
37	0	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0

CAPÍTULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo permitiu concluir que o *Prick test* é uma ferramenta promissora para identificação de sensibilização alérgica em cães com dermatite atópica, apresentando segurança em sua aplicação e boa tolerância pelos animais. O *Prick test* permitiu identificar a sensibilização à pólenes de maneira mais frequente quando comparado ao teste intradérmico, o qual parece apresentar resultados por vezes errôneos, entre outras desvantagens em termos de aplicação.

Os alérgenos de pólenes de gramíneas parecem desencadear papel importante na precipitação alérgica de cães com dermatite atópica em Curitiba, sobretudo animais extradomiciliados ou que possuem acesso ao meio externo. Tal correlação permite contribuir para um melhor diagnóstico e prognóstico desta enfermidade em cães.

Para estudos futuros, sugere-se a aplicação de terapia alérgeno-específica através de diagnóstico com o *Prick test*. Estudos que correlacionem sensibilização polínica à sintomatologia clínica sazonal também devem ser realizados para permitir identificação de polinose em cães, visando maior acurácia no diagnóstico desta enfermidade e consequentemente melhor tratamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allergome: The platform for Allergen Knowledge. Available from: <http://www.allergome.org/>. Acesso em março de 2017.

ALTMAN, F. The role protein glycosylation in allergy. **International Archives of Allergy and Immunology**, 8, 142: 99-115, 2007.

ALVARADO, M.I. et al. Profilin as a severe food allergen in allergic patients overexposed to grass pollen. **Allergy**, 69 (12): 1610-1616, 2014.

ANDERSSON, K.; LIDHOLM, J. Characteristics and immunology of grass pollen allergens. **International archives of allergy and immunology**, Basel, v. 130 (2): 87-107, 2003.

ARAÚJO, L.M.L.; ROSARIO, N.A.; MARI, A. Molecular-based diagnosis of respiratory allergic diseases in children from Curitiba, a city in Southern Brazil. **Allergologia et Immunopathologia (Madr)**, 44(1):18-22, 2016.

BALDAÇARA, R. P. C. et al. Prevalence of allergen sensitization, most importante allergens and factors associated with atopy in children. **São Paulo Medical Journal**, 131(5): 301-8, 2013.

BEHRENDT, H.; BECKER, W. M. Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors. **Current opinion in Immunology**, Philadelphia,13: 709-715, 2001.

BEHRENDT, H. et al. Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substance precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization. **Internacional archives of allergy and immunology**, Basel, 124 (1-3): 121-125, 2001.

BEHRENDT, H. et al. Air pollution and allergy: experimental studies on

modulation of allergen release from pollen by air pollutants. **Internacional archives of allergy and immunology**, Basel, 113 (1-33): 69-74, 1997.

BERNARDES, et al. IgE cross-reactivity between *Lolium multiflorum* and commercial grass pollen allergen extracts in Brazilian patients with pollinosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 43 (2): 166–175, 2010.

BERNSTEIN, I.L. et al. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, 100: S1-S148, 2008.

BERNSTEIN, D.I. et al. Twelve-year survey of fatal reactions to allergen injections and skin testing: 1990-2001. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 113:1129–1136, 2004.

BIZIKOVA, P. et al. Review: Role of genetics and the environment in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. **Veterinary dermatology**, 23:96-e26, 2015.

BOND, R. et al. Intradermal test reactivity to *Malassezia pachydermatis* in atopic dogs. **Veterinary Record**, 150(14): 448-449, 2002.

BONISSONI, E.; NETO, J. P. O *Lolium multiflorum* associado ao aumento do consumo de anti-histamínicos. **Visão acadêmica**, 15(3): 81-99, 2014.

BOUSQUET, P.J. et al. GA2LEN skin test study III: minimum battery of test inhalent allergens needed in epidemiological studies in patients. **Allergy**. 64: 1656-1652, 2009.

CARLOTTI, D.N. Clinical signs of canine atopic dermatitis and concurrent Diseases. In: 7th World Congress of Veterinary Dermatology and the World Association for Veterinary Dermatology, 2012, Bordeaux. **Proceedings of 7th**

World Congress of Veterinary Dermatology and the World Association for Veterinary Dermatology, Bordeaux, 1, p. 58-66, 2012.

CARMONA, S. et al. Comparación del uso del Test Intradérmico Vs Prick Test en pacientes con dermatitis atópica canina. In: 3º Congreso Latinoamericano de Dermatología Veterinaria. Buenos Aires, **Anales del III Congreso Latinoamericano de Dermatología Veterinaria**, 2015.

CHEN, T. et al. Identification of major allergens of *Malassezia pachydermatis* in dogs with atopic dermatitis and *Malassezia* overgrowth. **Veterinary Dermatology**, 13, 141-150, 2002.

CHERVET, L. 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. **Experimental Dermatology**, 19: e343–e346, 2010.

CONSTANTIN, C. et al. Micro-arrayed wheat seed and grass pollen allergens for componente-resolved diagnosis. **Allergy**, 64: 1030-1037, 2009.

CUNHA, V.E.S. et al. Intradermal Test - Proficiency testing in dogs. In: III Congreso Latinoamericano de Dermatología Veterinaria, 2015, Buenos Aires. **Anales del III Congreso Latinoamericano de Dermatología Veterinaria**, 2015.

DAVIES, J.M. et al. Bahia grass pollen specific IgE is common in seasonal rhinitis patients but has limited cross-reactivity with Ryegrass. **Allergy**, Copenhagen, 60 (2): 251-255, 2005.

DAY, M.J. Introduction: the immunological basis of allergic diseases. In: NOLI, C. FOSTER, A. ROSENKRANTZ, W. **Veterinary allergy**. Willey Blackwell, 2014, 5-7.

DELGADO, J. et al. Quality of life in patients with respiratory allergy is influenced by the causative allergen. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, 233, 09–14, 2013.

DONDI, A. et al. Pollen-induced allergic rhinitis in 1360 Italian children: comorbidities and derterminantes of severity. **Pediatric Allergy and Immunology**, 24:742-751, 2013.

DUFFORT, O. et al. Antigenic similarity among group 1 allergens from grasses and quantitation ELISA using monoclonal antibodies to Phl p 1. **International Achives of Allergy and Immunology**, Basel, 145 (4): 283-290, 2008.

DUTRA, B.M.R.S.; ROSÁRIO FILHO, N.A.; ZAVADNIAK, A.F. Alérgenos inaláveis em Curitiba: uma revisão de sua relevância clínica. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, 24 (5): 189-195, 2001.

EBO, D.G. et al. Sensitization to cross-reactive carbohydrate determinants and the ubiquitous protein profiling: mimickers off allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, 34 (1): 137-144, 2004.

ESTEVES, P.C. et al. Prevalência de rinite alérgica e sazonal, sensibilização atópica ao *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e ao *Lolium multiflorum* (Lolium) em escolares de 13 e 14 anos e adultos em Curitiba. **Revista brasileira de alergia e imunopatologia**. 23: 249-59, 2000.

ESTEVES, P.C. et al. Sensibilização atópica em escolares e adultos de Curitiba, Paraná. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, 22 (5): 156-160, 1999.

FAHLBUSCH, B. et al. Detection and quantification of group 4 allergens in grass pollen extracts using monoclonal antibodies. **Clinical and Experimental Allergy**, Osford, 28 (7): 799-807, 1998.

FARIAS, M.R. Dermatite atópica canina: da fisiopatologia ao tratamento. **Clínica Veterinária**, 69: 48-62, 2007.

FAVROT, C. et al. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. **Veterinary Dermatology**, 21:23-31, 2010.

FERNÁNDEZ-CALDAS, E. On mite allergy in dogs and humans. **International Archives of Allergy and Immunology**. 160: 329-330, 2013.

FERREIRA, F. et al. Allergic cross-reactivity: from gene to the clinic. **Allergy**, 59(3): 243-267, 2004.

FERREIRA, R.R. **Avaliação de diferentes concentrações de histamina e extratos alergênicos em cães sadios submetidos a teste intradérmico**. Tese. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 2013.

FRASER, M.A.; CAULTON, E.; MCNEIL, P.E. Examination of faecal samples as a method of identifying pollen exposure in dogs. **Veterinary Record**, 149, 424-426, 2001.

FURIANI, N. et al. Evaluation of the bacterial microflora of the conjunctival sac of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis. **Veterinary dermatology**, 22:490-496, 2011.

GENTRY, C.M.; MESSINGER, L. Comparison of intradermal and percutaneous testing to histamine, saline and nine allergens in healthy adult cats. **Veterinary Dermatology**, 27:370- e92, 2016.

GRIFFIN, C. E. Diagnosis of canine atopic dermatitis. In: NOLI, C.; FOSTER, A.; ROSENKRANTZ, W. **Veterinary Allergy**. Willey Blackwell, 2014, 70-77.

HALLIWELL, R. Revised nomenclature for veterinary allergy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 114, 207–208, 2006.

HASSIM, Z.; MARONESE, S. E.; KUMAR, R. K. Injury to murine airway epithelial cells by pollen enzymes. **Thorax**, London, 53,(5): 368-371, 1998.

HEINZERLING, L. et al. The Skin prick test - European standards. **Clinical and translational Allergy**. 3:3, 2013.

HIGHTOWER, K. et al. Evaluation of transepidermal water loss in canine atopic dermatitis. A pilot study in Beagle dogs sensitized to house dust mites. **The 23rd proceedings of the North American Veterinary Dermatology Forum**, Palm springs, California, abril 2008.

HILLIER, A. Definitively diagnosing atopic dermatitis in dogs. **Veterinary Medicine**, 97: 198-208, 2002.

I.U.I.S. União Internacional das Sociedades de Imunologia. Disponível em: < <http://www.allergen.org/> >. Acesso em 05 jan. 2017.

JENSEN-JAROLIM, E. et al. Pollen Allergies in Humans and their Dogs, Cats and Horses: Differences and Similarities. **Clinical and translational allergy**, 5: 15, 2015.

JOHANSSON, S.G.O. et al. A revised nomenclature for allergy. Na EAACI position statement from the EAACI nomenclature task force. **Allergy**, Copenhagen, 56 (9): 813-824, 2001.

JOHANSSON, S.G. et al. Revised nomenclature for allergy for global use: Report of the Nomenclature Review Committee of the World Allergy Organization, October 2003. **The journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, 113 (5): 832-836, 2004.

KIOTSERIDIS, H. et al. Grass pollen allergy in children and adolescents-symptoms, health related quality of life and the value of pollen prognosis. **Clinical and Translational Allergy**, 3:19, 2013.

KNOX, R.B.; SUPHIOGLU, C. Environmental and molecular biology of pollen allergens. **Trends in Plant Science**, London,1 (5): 156-164, 1996.

KNOX, R.B. et al. Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution. **Clinical and Experimental Allergy**, 27(3): 246-51, 1997.

LAI-CHEONG, J.E.; MCGRATH, J.A. Avanços no entendimento da base genética de doenças hereditárias monogênicas da barreira epidérmica: novas pistas para os principais genes que podem estar envolvidos na patogênese da dermatite atópica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, 81 (6), 2006.

LORENTE, C.; RUIZ, P. Preliminary assessment of percutaneous (prick) test in dogs. **Veterinary Dermatology**.26: 298, 2015.

LORENZ, A.R. et al. The principle of homologous groups in regulatory affairs of allergen products—a proposal. **International Archives of Allergy and Immunology**. 148(1):1-17, 2009.

LOVBORG, U. et al. Subtribe-specific monoclonal antibodies to *Lolium perenne*. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, 29 (7): 973-981, 1999.

MARI, A. et al. Evaluation by double-blind placebo-controlled oral challenge of the clinical relevance of IgE antibodies against plant glycans. **Allergy**, 63:891–896, 2008.

MARSELLA, R.; GIROLOMONI, G. Canine Models of Atopic Dermatitis: A useful tool with untapped potential. **Journal of investigative dermatology**. 20: 533-539, 2009.

MARSELLA, R.; NICKLIN, C.; LOPEZ, J. Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. **Veterinary Dermatology**, 17 (5): 306-312, 2006.

MARSELLA, R. 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. **Veterinary dermatology**, 17:24–35, 2006.

MARSELLA, R.; SAMUELSON, D.; HARRINGTON, L. Evaluation of filagrin expression. In sensitized atopic Beagles and in normal controls before and after allergen exposure. **Advances in Veterinary Dermatology**, 6th World Congress, Hong Kong, 2008.

MARTINO, M. et al. Sensitivity to tomato and peanut allergens in children monosensitized to grass pollen. **Allergy**, 43: 206-213, 1988.

MASUDA, K. et al. Positive reactions to common allergens in 42 atopic dogs in Japan. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, 73: 193-204, 2000.

MATIAS, D.F. **Avaliação de uma nova técnica em alergologia veterinária: testes cutâneos por picada em cães**. Tese. Universidade Técnica de Lisboa, 2013.

MILLER, W.H.JR., GRIFFIN, C.E.; CAMPBELL, K.L. Hipersensitivity disorders. In: **Muller&Kirk's Small Animal Dermatology**. 7ª ed. Missouri: Elsevier; 363-431, 2013.

MUELLER, R.S.; BETTENAY, S.V.; TIDEMAN, L. Aero-allergens in canine atopic dermatitis in southeastern Australia based on 1000 intradermal skin tests. **Australian Veterinary Journal**, 78:392-399, 2000.

MOHAPATRA, S.S.; LOCKEY, R.F.; SHIRLEY, S. Immunobiology of grass pollen allergens. **Current Allergy and Ashtma Reports**, Philadelphia, 5 (5): 381-387, 2005.

MOTTA, A. et al. *Phleum pratenses* pollen starch granules induce humoral and cell-mediated imune responses in a rat model of allergy. **Clinical and Experimental Allergy**, Osford, 34 (2): 310-3014, 2004.

NARDONI, S. et al. Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. **Veterinary microbiology**, 122 (1-2): 172-177, 2007.

NEVES FORTE, W.C. Testes cutâneos de hipersensibilidade imediata com o evoluir da idade. **Jornal de Pediatria**. 77 (2): 112-118, 2001.

NUTTALL, T. Management of atopic dermatitis. **Veterinary Focus**, 18 (1): 32-39, 2008.

OLIVRY, T.; HILL, P. B. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IX): the controversy surrounding the route of allergen challenge in canine atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. 81, 219-225, 2001.

OLIVRY, T. et al. Stratum corneum removal facilitates experimental sensitization t omite allergens in atopic dogs. **Veterinary dermatology**, 22 (2): 188-196, 2010.

OLIVRY, T. et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. **Veterinary Dermatology**, 21: 233-248, 2010.

PATTERSON, R.; CHANG, W.W.; PRUZANSKY, J.J. The Northwestern colony of atopic dogs. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. 34: 455-459, 1963.

PEPYS, J. Skin testing. **British Journal of Hospital Medicine**, 14:412-8, 1975.

PEREIRA, D.T. et al. Sensitization study of dogs with atopic dermatitis in the central region of Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 67 (6): 1533-1538, 2015.

PETERSEN, K.D. et al. Patient related outcomes in a real life prospective follow up study: Allergen immunotherapy increase quality of life and reduce sick days. **World Allergy Organ Journal**. , 6: 15, 2013.

PLICJERT, H.D.; TICHY, A.; HIRT, R.A. Characteristics of canine nasal discharge related to intranasal diseases: a retrospective study of 105 cases. **Journal of Small Animal Practice**, 55: 145-152, 2014.

POPA, I. et al. Analysis of epidermal lipids in normal and atopic dogs, before and after administration of an oral ômega-6/ ômega-3 fatty acid supplement. A pilot study. **Veterinary research communications**, 35(8): 501-509, 2011.

PRÉLAUD, P. Allergens and environmental influence. In: NOLI, C.; FOSTER, A.; ROSENKRANTZ, W. *Veterinary Allergy*. Wiley Blackwell, Oxford, 24-31, 2014.

PUCHEU-HASTON, C. M. et al. Review: The role of antibodies, autoantigens and food alleregens in canine atopic dermatitis. *Vet. Dermatol*, 26: 115-e30, 2015.

PUCHEU-HASTON, C.M. et al. Epicutaneous sensitization with *Dermatophagoides farinae* induces generalized allergic dermatitis and elevated mite-specific immunoglobulin E levels in a canine model of atopic dermatitis. **Clinical and Experimental Allergy**, 38: 667–679, 2008.

RANDALL, M. et al. Quantitation of house dust mites and house dust mite allergens in the microenvironment of dogs. **American Journal of Veterinary Research**, 64: 1580-1588, 2003.

RING, J. et al. Why are allergies increasing? **Current Opinion in Immunology**, London, 13 (6): 701-708, 2001.

ROBINSON, C. et al. On the potential significance of the enzymatic activity of mite allergens to immunogenicity. Clues to structure and function revealed by molecular characterization. **Clinical and experimental allergy**, Oxford, 27 (1): 10-21, 1997.

ROCHA, M.I.L. **Skin prick tests** – preliminary evaluation of this technique for the diagnosis of canine atopic dermatitis sensitization. Tese. Lisboa: Universidade Técnica de Lisboa, 2012.

RODRÍGUEZ-PÉREZ, J. et al. Ensayo clínico diagnóstico con extrato alergenico de polen de *Cynodon dactylon* em pacientes con asma y/o rinitis. **Archivo Médico de Camaguey**, 127: 234-244, 2002.

ROJAS-MÉNDEZ, I. C. et al. Frecuencia de reactividad cutánea hacia antígenos inhalables en pacientes con cuadro clínico de enfermedad alérgica. **Revista Alergia Mexico**, 64(1): 7-12, 2017.

ROQUE, J. B. et al. Real-time PCR quantification of the canine filaggrin orthologue in the skin of atopic and non-atopic dogs: a pilot study. **BMC Research notes**, 4(1): 554, 2011 dec 21.

ROSÁRIO FILHO, N.A. Contagem de pólen aéreos na Cidade de Curitiba. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, 6(1-4): 12-15, 1983.

ROSÁRIO FILHO, N.A. Sensibilização atópica a aeroalérgenos em crianças asmáticas em Curitiba. **Jornal Paranaense de Pediatria**, Curitiba, 3(4): 80-82, 2002.

ROSÁRIO FILHO, N.A. Alergia ao pólen de gramíneas: “back to the future”. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, 35: 82-84, 2012.

ROSSI, M.A. et al. A pilot study of the validation of percutaneous testing in cats. **Veterinary Dermatology**, 24: 488-493, 2013.

SALZO, P. S. Dermatite atópica. Larsson, C. E.; Lucas, R. In: LARSSON, C.E.; LUCAS, R. **Tratado de Medicina externa** – dermatologia veterinária. São Caetano do Sul, Interbooks, 513-529, 2015.

SANTORO, D. et al. Altered mRNA and protein expression of filaggrin in the skin of a canine animal model for atopic dermatitis. **Veterinary dermatology**, 24: 329-e73, 2013.

SASAKI, Y. et al. Hipersensitivity to Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) pollen in dogs. **The Journal of Veterinary Medical Science**, 57: 683-685, 1995.

SCHICK, R.O.; FADOK, V.A. Responses of atopic dogs to regional allergens: 268 casos. **Journal of American Veterinary Medical Association**. 189:1493, 1986.

SOLOMON, W. R. Aerobiology of pollinosis. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, 74: 449-461, 1984.

SOPELETE, M.C.; JOSÉ VAZ, L.A.; TAKETOMI, E.A. Sensitization do *Cynodon dactylon* and *Paspalum notatum* grass pollens in pollinosis patients in Uberlândia, Minas Gerais. **Abstracts of WAO International Scientific Conference**, December 6-9, Rio de Janeiro, Brazil, 2014.

STANLEY, R. G.; LINSKENS, H. F. Pollen. Biology – Biochemistry – Management. Berlin: Springer – Verlag, 1974.

SUCH, R. et al. The high molecular mass allergen fraction of Timothy grass pollen (*Phleum pratense*) between 50-60 kDa is comprised of two major allergens: Phl p 4 and Phl p 13. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, 30 (10): 1395-1402, 2000.

SUPHIOGLU, C. Thunderstorm asthma due to grass pollen. **International Archives of allergy and immunology**, Basel, 116(4): 253-260, 1998.

SUPHIOGLU, C. What are the important allergen in grass pollen that are linked to human allergic disease? **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, 30 (10): 1335-1341, 2000.

TAKETOMI, E.A. et al. Doença alérgica polínica: pólenes alergógenos e seus principais alérgenos. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. 72 (4) :562-7, 2006.

TINIAKOV, R.L. et al. Canine modelo f nasal congestion and allergic rhinitis. **Journal of Applied Physiology**. 94: 1821-1828, 2003.

TIZARD, I. R. Sinalização Celular: Citocinas e seus receptores. In: **Imunologia Veterinária**, 9ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2014.

VAN DER VALK, J.P.M. et al. Measurement and interpretation of skin prick test results. **Clinical translational Allergy**. 6:8, 2016.

VIEIRA, F.A.M. Polinose no Brasil. In: Negreiros, E.B.; Ungier, C. **Alergologia Clínica**. São Paulo: Atheneu, Cap. 3,106-111, 1995.

VIEIRA, F. A. M. Gramíneas tropicais alergênicas: *Cynodon dactylon* e *Paspalum notatum* – Uma visão para o trópico brasileiro. **Revista Brasileira de Alergia e Imunologia**, 35(1): 2012.

VIEIRA, F.A.M. Sensibilização polínica associada à polinose no trópico brasileiro: um desafio atual para o diagnóstico clínico. **Brazilian Journal of Allergy and Immunology**, 2(2): 81-82, 2014.

VIEIRA, F.A.M. Novas práticas agropastorais estão influenciando a relação meio ambiente/polinose no sul do Brasil? **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, 26(1): 37-38, 2003.

VIERA, F.A.M; FERREIRA, E.M.; MATTER, L.B. A prevalência de polinose está associada com a cultura do *Lolium multiflorum*. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, São Paulo, 28(1), 47-52, 2005.

VIEIRA, F.M.; BRAGA, G.L.; FERREIRA, E.M. *Cynodon dactylon* e *Paspalum notatum*: revisar conceitos de sensibilização polínica por gramíneas no Sul do Brasil? **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, 34:218-9, 2011.

VIETHS, S.; SCHEURER, S.; BALLMER-WEBER, B. Current understanding of cross-reactivity of food allergens and pollen. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 964:47-68, 2002.

VRTALA, S. et al. Properties of tree and grass pollen allergens: reinvestigation of the linkage between solubility and allergenicity. **Internacional Archives of Allergy and Immunology**, Basel, 102 (2): 160-169, 1993.

WEBER, R.W. Patterns of Pollen cross-allergenicity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**., St. Louis, 112(2): 229-239, 2003.

WERFEL, T. et al. Exacerbation of atopic dermatitis on grass pollen exposure in an environmental challenge chamber. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, 136(1): 96-103, 2016.

WERFEL, T. et al. Position paper of the EAACI: food allergy due to immunological cross-reactions with common inhalant allergens. **Allergy**, 70:1079–1090, 2015.

WITTICH, F.W. Spontaneous allergy (atopy) in the lower animal. **Journal of allergy**, 12: 247-257, 1941.

YOON, J. S. et al. Alteration of stratum corneum ceramide profiles in spontaneous canine model of atopic dermatitis. **Experimental dermatology**, 20(9): 732-736, 2011 sep.

ANEXO 1 – PARECER DO CEUA



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



Curitiba, 14 de Abril de 2016.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: **1027/2016 – 1ª versão**

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação da sensibilização a alérgenos de pólenes em cães com Dermatite atópica

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marconi Rodrigues de Farias

EQUIPE DE PESQUISA: Ana Paula dos Santos Cerdeiro

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola da Vida – Mestrado

VIGÊNCIA DO PROJETO	Abril/2016 a Abril/2017	QUANTIDADE DE ANIMAIS	30
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Canis lupus familiaris</i> (Cães)	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	Variados	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	A partir dos 06 meses / peso variados	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	UHAC - PUCPR	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado do CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelos CONCEA (Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal) e foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da PUCPR em reunião de **14.04.2016**.

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas. Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

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

Atenciosamente,
Prof. Dra. Marta Luciane Fischer
Coordenadora
Comissão de Ética no Uso de Animais



Rua Imaculada Conceição, 1155 Prado Velho CEP 80.215-901 Curitiba Paraná Brasil

ANEXO 2 – INSTRUÇÕES PARA AUTORES – ARQUIVO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – UFMG

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

ISSN 1678-4162 *online version*

Editorial Policy

The **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 1678-4162 (online), is edited by FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, and is destined to the publication of scientific articles on the themes of veterinary medicine, animal husbandry, technology and inspection of products of animal origin, aquaculture and related fields.

The articles sent for publication are submitted to approval by the Editorial Body, with aid from area specialists (rapporteurs). The articles which need reviewing or corrections will be returned to the authors. Those accepted for publication become property of **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)**, cited as *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* The authors are responsible for the concepts and information contained in the articles. It is mandatory that they be original, unique, and destined exclusively to **ABMVZ**.

Reproduction of published articles

The reproduction of any published article is allowed as long as it is properly referenced. The results may not be commercially used.

The submission and protocol of articles is done exclusively online, at the address <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Copies will not be provided. The articles are available at the following address: www.scielo.br/abmvz

General Guidelines

- All article protocoling is done exclusively by the online Scielo publication system – ScholarOne, at <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>, and it is necessary to register at the website.

- Read “[STEP BY STEP – ARTICLE SUBMISSION SYSTEM THROUGH SCHOLARONE](#)”
- All communication between the several authors in the process of evaluation and publication (authors, reviewers and editors) will be done exclusively in electronic form through the System, and the author is automatically informed, via email, of any change in the article status.
- Pictures, figures, and drawings must be inserted in the text, and, when requested by the editorial team, must be sent separately, in a jpg file in high resolution (at least 300dpi), zipped, inserted under “Figure or Image” (step 6).
- It is the exclusive responsibility of the one submitting the article to certify that the authors are aware of and agree with the inclusion of their names in the submission.
- **ABMVZ** will communicate electronically with each author regarding their participation in the article. If at least one author does not agree with their participation as an author, the article will be considered a waiver by one author and the protocol will end.

Ethics Committee

It is mandatory to attach a pdf copy of the Certificate of approval for the research project which originated the article, issued by CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais – Ethics Committee for the Use of Animals) in your institution, according to Law 11794/2008. The document must be attached to “Ethics Committee” (step 6). We clarify that the number of the Approval Certificate must be mentioned in the Material and Methods section.

Types of articles accepted for publication

Scientific article

This is a complete report of an experimental work. It is based on the premise that the results are posterior to the planning of the research.

Text sections: Title (Portuguese and English), Authors and Affiliation (only on the “Title Page – step 6), Resumo, Abstract, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion (or Results and Discussion), Conclusions, Acknowledgements (when

applicable), and References.

The number of pages must not exceed 15, including tables, figures **and References**.

The number of References must not exceed 30.

Case report

Mainly contemplating the medical areas where the result precedes the interest in its disclosure or the occurrence of the results is not planned.

Text sections: Title (Portuguese and English), Authors and Affiliation (only on the “Title Page” step 6), Resumo, Abstract, Introduction, Casuistry, Discussion and Conclusions (when pertinent), Acknowledgements (when applicable), and References.

The number of pages must not exceed 10, including tables and figures.

The number of References must not exceed 12.

Communication

A brief report of partial results of an experimental work, worthy of publication, although insufficient or not consistent enough to constitute a scientific article.

The text, with a title in Portuguese and English, Authors and Affiliation (Only on the “Title Page”, step 6) must be compact, with no distinction of text sections specified for “scientific article”, although it must follow that order. When the communication is written in Portuguese it must contain an “Abstract”, and when written in English it must contain a “Resumo”.

The number of pages must not exceed 8, including tables and figures.

The number of References must not exceed 12.

Preparation of texts for publication

The articles must be written in Portuguese or English, in an impersonal manner.

Text formatting

- The text must **NOT** contain sub items in any section and must be presented in Microsoft Word and attached as a “Main Document” (step 6), in A4 format, with a 3cm margin (superior, inferior, left, and right), in Times New Roman font, size 12, and 1.5 spacing in all pages and sections of the article (from the title to the references), **with numbered lines**.
- Do not use footnotes. References to companies and products, for instance,

should come in parenthesis in the body of the text, in the following order: name of product, substance, company, and country.

Sections of an article

Title. In Portuguese and in English. Must contemplate the essence of the article and not go beyond 50 words.

Authors and Affiliation. Authors and Affiliation. The names of the authors are placed below the title, with identification of the institution to which they belong. The corresponding author and their email must be indicated with an asterisk, only in the “Title Page” (step 6) in Word.

Resumo and Abstract. Must be the same presented in the registration, with up to 200 words and one paragraph. Do not repeat the text and do not add literature revision. Include the main numerical results, mentioning them without explanation, when applicable. Each sentence must contain a complete information.

Palavras-chave and Keywords. Up to five and at least two*. * in the submission use only the Keyword (step 2) and in the body of the article mention the keyword (English) and palavra-chave (Portuguese), regardless of the language the article is submitted in.

Introduction. Brief explanation in which the problem, its pertinence and relevance, and the aims of the work are established. It must contain few references, sufficient to define it.

Material and Methods. Mention the experimental design, the material involved, the description of the methods used or correctly reference the methods already published. In the work that involves animals and/or genetically modified organisms **there must be the number of the CEUA approval Certificate.** (verify the Ethics Committee Item).

Results. Present the results found in a clear and objective manner.

Table. Group of alphanumerical data ordered in lines and columns. Use horizontal lines in separating headers and at the end of the table. The title of the table receives the word Table, followed by an Arabic numeral and period (ex.: Table 1.). In the text the table must be referred to as Tab, followed by a period and order number (ex.: Tab. 1), even when referring to several tables (ex.: Tab. 1, 2, and 3). It may be

presented with simple spacing and a font below size 12 (the smallest accepted size is 8). The Table legend must contain only that which is indispensable for its understanding. The tables must be inserted in the body of the text, preferably after the first citation.

Figure. Any illustration that presents lines and dots: drawing, picture, graphic, flow chart, scheme, etc. The legend initially receives the word Figure, followed by the Arabic numeral and period (ex.: Figure 1.) and is referred to in the text as Fig followed by a period and the order number (ex.: Fig.1), even when referring to more than one figure (ex.: Fig. 1, 2, and 3). Besides being inserted in the text, photos and images must be sent in high resolution jpg, in a zipped file, attached in the correct field in the submission screen for article registration. The figures must be inserted in the body of the text, preferably after the first citation.

***Note:** Every table and/or figure that has already been published must contain, below the legend, information regarding the source (author, authorization for use, date) and the corresponding reference must be in the References.*

Discussion. Discuss only the results obtained in the work. (Obs.: The sections Results and Discussion may be presented as one according to the author's preference, without prejudice to the parts).

Conclusions. The conclusions must be supported by the results of the executed research and be presented in an objective manner, **WITHOUT** literature review, discussion, repetition of results or speculation.

Acknowledgements. Optional. Must be expressed briefly.

References. The references must be related in alphabetical order, preferring articles published in national and international magazines, and indexed. Books and thesis must be referenced as little as possible, and only when indispensable. The general ABNT norms are adopted, **adapted** for ABMVZ as the examples below:

How to reference:

1. Citations in the text

The indication of the source in parenthesis comes before the citation to avoid interruptions in the sequence of the text, as the examples:

- Single author: (Silva, 1971) or Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) or Anuário... (1987/88)
- Two authors: (Lopes and Moreno, 1974) or Lopes and Moreno (1974)

- More than two authors: (Ferguson *et al.*, 1979) or Ferguson *et al.* (1979)
- More than one article cited: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) or (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), always in ascending chronological order, and alphabetical order of the articles for articles of the same year.

Citation of a citation. Every effort must be made to consult the original document. In exceptional situations the reproduction of information already cited by other authors may be reproduced. In the text, cite the last name of the author of the non consulted document with the year of publication, followed by the expression **cited by** and the last name of the author and year of the consulted document. In the References only the consulted source should be mentioned.

Personal communication. These are not part of the References. The citation should include the last name of the author, the date of the communication and name of the Institution to which the author is linked.

2. Periodicals (up to 4 authors, cite all of them. More than 4 authors, cite 3 authors and *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

3. Single publication (up to 4 authors, cite all of them. More than 4 authors, cite 3 authors and *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostridios. In: DUNNE, H.W. (Ed). *Enfermedades del cerdo*. México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed. Washington: National Academy of Sciences, 1968. 69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) –

Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

4. Electronic documents (up to 4 authors, cite all of them. More than 4 authors, cite 3 authors and *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market. Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em: <<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em: 27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994. Disponível em: <<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerald-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

Submission and publication fees

ONLY FOR NATIONAL ARTICLES

- **Submission fee:** The submission fee is R\$50.00, and must be paid through a bank slip issued by the Conveniar electronic system <http://conveniar.fepmvz.com.br/eventos/#servicos> (it is necessary to complete a registration). Only articles with a paid submission fee will be evaluated.

If the fee is not paid in up to 30 days it will be considered author waiver.

- **Publication fee:** The publication fee is R\$150.00, per page, upon the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank deposit, and the data will be informed when the article is approved.
OBS.: When the invoice information is different from the contact author's information an email must be sent to abmvz.artigo@abmvz.org.br communicating such need.

ONLY FOR INTERNATIONAL ARTICLES

- **Submission and Publication fee.** The publication fee is US\$ 100.00 (one hundred dollars) per page, and US\$ 50.00 (fifty dollars) for manuscript submission and will be billed to the corresponding author at the final proof of the article. The publication fee must be paid through a bank slip issued by the electronic article submission system. When requesting the bank slip the author will inform the data to be included in the invoice issuance.

Recourses and diligences

- If the author sends the answer to diligences requested by ABMVZ, or a recourse document, it must be attached in Word, in the item “Justification” (step 6), and must also be sent via email, in care of the Editorial Committee, to abmvz.artigo@abmvz.org.br.
- If the article is not accepted, the author may desire to send a recourse, and this must be done via email, at abmvz.artigo@abmvz.org.br.