

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

LUCAS ANDRÉ LUDWIG

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

CURITIBA

2019

LUCAS ANDRÉ LUDWIG

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

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

Orientador: Prof. Dr. Marconi Rodrigues
de Farias

CURITIBA

2019

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	v
AGRADECIMENTOS	vi
FORMATO DA DISSERTAÇÃO	vii
RESUMO GERAL.....	viii
GENERAL ABSTRACT	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE GRÁFICOS.....	xii
LISTA DE TABELAS.....	xxiii
LISTA DE ABREVIATURAS	xiv
CAPÍTULO 1	1
1 BREVE REVISÃO SOBRE DERMATITE ATÓPICA CANINA.....	1
2 BIOLOGIA E ECOLOGIA DOS ÁCAROS DE POEIRA DOMÉSTICA	4
3 ALÉRGENOS DE ÁCAROS DE POEIRA DOMÉSTICA	10
4 ALÉRGENOS DO GRUPO 2.....	133
5 RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS FRENTE AOS ÁCAROS DE POEIRA DOMÉSTICA	15
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O CAPÍTULO 1.....	17
REFERÊNCIAS	19
CAPÍTULO 2	24
INTRODUÇÃO	25
MATERIAL E MÉTODOS	26
Critérios de inclusão	26
Critérios de exclusão.....	26
Obtenção de amostras de soro.....	26
Coleta de informações ambientais	26
ELISA	26
Imobilização antigênica.....	26
Bloqueio.....	27
Preparação e incubação das amostras de soro dos cães	27
Preparação e incubação dos anticorpos	27

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

Dedico este trabalho à minha avó, Ana Cecília Marchiori

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

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

RESUMO GERAL

Dermatite atópica é uma doença cutânea inflamatória, pruriginosa, geneticamente predisposta, com sinais clínicos característicos e geralmente associada a produção de anticorpos IgE contra alérgenos ambientais, como pólenes, fungos e de ácaros de poeira, principalmente as espécies *D. pteronyssinus* e *D. farinae*. O objetivo deste estudo foi determinar a sensibilidade ao extrato bruto de *D. farinae* e seus alérgenos Der f 2 e Zen 1, em cães com dermatite atópica. Para isto, foram selecionados 100 cães com diagnóstico clínico de dermatite atópica após exclusão de outras dermatopatias pruriginosas, excluindo-se cães submetidos à imunoterapia alérgeno específica ou não-específica. Os cães eram de diferentes raças e idades e oriundos do serviço de dermatologia veterinária da Clínica Veterinária Escola da PUCPR e da Clínica de Dermatologia e Alergia Veterinária Dermatovet, ambas situadas em Curitiba-PR. No momento da anamnese, perguntas foram realizadas a fim de saber a possibilidade destes cães terem contato com mobília e material têxtil que possam abrigar ácaros de poeira doméstica. Amostras de sangue de cada cão foram coletadas e o soro foi obtido, congelado e enviado ao laboratório Zenoaq, localizado em Koriyama, Fukushima, Japão. As amostras foram analisadas por ELISA para mensurar os níveis séricos de IgE contra os alérgenos pesquisados, se estabelecendo 0,200 de densidade ótica de IgE como ponto de corte. Todos os dados foram analisados de forma descritiva. Para a comparação de proporções entre os alérgenos foi utilizado qui-quadrado e o cálculo do coeficiente de *Spearman* foi utilizado para correlacionar a sensibilidade ao extrato bruto de *D. farinae* com seus alérgenos. Como resultados, a sensibilidade ao extrato bruto de *D. farinae* (92%) e ao Zen 1 (77%) foi superior ao Der f 2 (56%) ($p < 0,001$). Houve correlação na sensibilização entre extrato bruto de *D. farinae* e Zen 1 ($p < 0,001$), fato não observado entre este e Der f 2 ($p < 0,002$) e entre Der f 2 e Zen 1 ($p < 0,02$). A sensibilização ao *D. farinae* e seus alérgenos foi associada com irrestrita exposição à mobília e material têxtil domiciliar. Concluiu-se que cães com dermatite atópica são frequentemente sensibilizados a *D. farinae* e, seus alérgenos Der f 2 e Zen 1, são alérgenos maiores nestes animais. A sensibilização ao Zen 1 parece ser a principal responsável pela sensibilização ao ácaro *D. farinae*.

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

GENERAL ABSTRACT

Atopic dermatitis is a genetically predisposed inflammatory and pruritic allergic skin disease, with characteristic clinical signs and generally associated with the production of IgE antibodies against environmental allergens, as pollens, molds and house dust mites, mainly the species of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *D. farinae*. The aim of this study was to observe the serological sensitivity to crude extract of *D. farinae*, beyond its allergens Der f 2 and Zen 1, in dogs with atopic dermatitis. For that, 100 dogs with clinical diagnosis of atopic dermatitis after exclusion others pruritic skin diseases and dogs that already received specific or non-specific immunotherapy. These dogs were of different breeds and ages and they were presented at the veterinary dermatology service of veterinary teaching hospital of PUCPR and at the clinic of veterinary dermatology and allergy Dermatovet, both in Curitiba-PR. At the time of anamnesis, some question were applied to know the possibility of these dogs had contact with furniture and textile material which could shelter house dust mites. Sera samples were obtained and further analyzed by ELISA test to measure serum IgE levels against these allergens with an established cut-off of 0,200 IgE optical density. All data were analyzed in a descriptive form. For comparison of proportion between allergens, the chi-square test was used and the Spearman rank correlation coefficient was used to correlate the sensitivity to crude *D. farinae* and its allergens. As results, the IgE sensitivity to crude *D. farinae* (92%) and Zen 1 (77%) was higher than Der f 2 (56%) ($p<0,001$). There was a correlation in sensitization to crude *D. farinae* and Zen 1 ($p<0,001$) that was not observed between crude *D. farinae* and Der f 2 ($p<0,002$) and Der f 2 and Zen 1 ($p<0,02$). The sensitization to *D. farinae* and its allergens was associated with an unrestricted exposition to furniture and textile material. As conclusion, dogs with atopic dermatitis are frequently sensitized to *D. farinae* and its allergens, Der f 2 and Zen 1, may be considered majors in these dogs. The sensitization to Zen 1 may be the mainly responsible for the sensitization to crude *D. farinae*.

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

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

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

CAPÍTULO 2

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

Figura 5. Correlação entre valores de densidade óptica (OD) de IgE ao Der f 2 e Zen 1	
.....	31

LISTA DE GRÁFICOS

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

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

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

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

CAPÍTULO 2

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

LISTA DE ABREVIATURAS

DAC	Dermatite atópica canina
IL	Interleucina
Th	Linfócito T auxiliar (<i>helper</i>)
CCL17/TARC	<i>Thymus-and activation-regulated chemokine</i>
HDM	Ácaros de poeira doméstica (<i>house dust mites</i>)
UR	Umidade relativa do ar
OMS	Organização Mundial da Saúde
kDa	Quilodauton
<i>D. farinae</i>	<i>Dermatophagoides farinae</i>
<i>D. pteronyssinus</i>	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
TSLP	Linfopoetina estromal tímica
Der f	<i>Dermatophagoides farinae</i>
Zen	Nome provisório do alérgeno (Zen = Zenoaq)
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
MD-2	Fator de diferenciação mieloide 2
IFN	Interferon

CAPÍTULO 1

1 BREVE REVISÃO SOBRE DERMATITE ATÓPICA CANINA

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

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

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

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

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

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

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

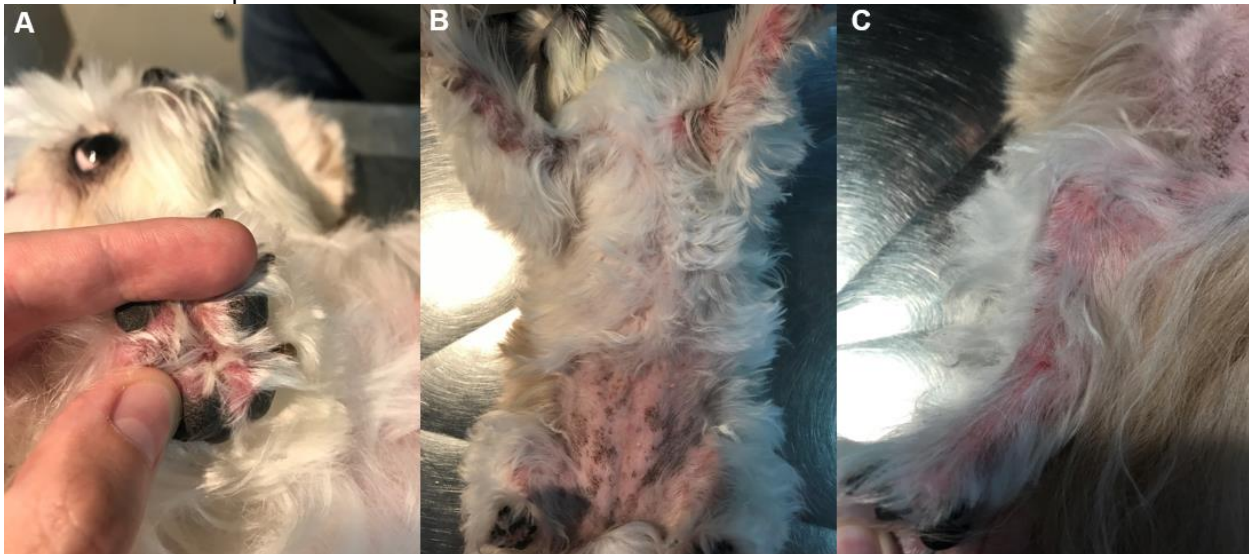
Após o diagnóstico clínico, testes alérgicos podem ser realizados a fim de identificar quais possíveis alérgenos estão relacionados com o desencadeamento dos sinais clínicos, através de provas cutâneas e/ou sorológicas, que têm como alvo a presença de IgE alérgeno-específica (Hensel et al., 2015).

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



Fonte: o autor, 2017

Figura 1. Cão com dermatite atópica. A: Eritema interdigital. B: Eritema, pápulas e alopecia em axilas, porções ventrais de membros torácicos, abdômen e virilha. C: Eritema e alopecia em virilha e porção medial de membro pélvico.



Fonte: o autor, 2017

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

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

Embora não haja cura para esta doença, uma terapia de controle eficaz a longo prazo pode ser realizada ao combinar diferentes tipos de opções terapêuticas potencializando seus benefícios e reduzindo efeitos adversos (Saridomichelakis e Olivry, 2016).

2 BIOLOGIA E ECOLOGIA DOS ÁCAROS DE POEIRA DOMÉSTICA

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

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

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

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

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



Fonte: Chan *et al.*, 2015

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

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

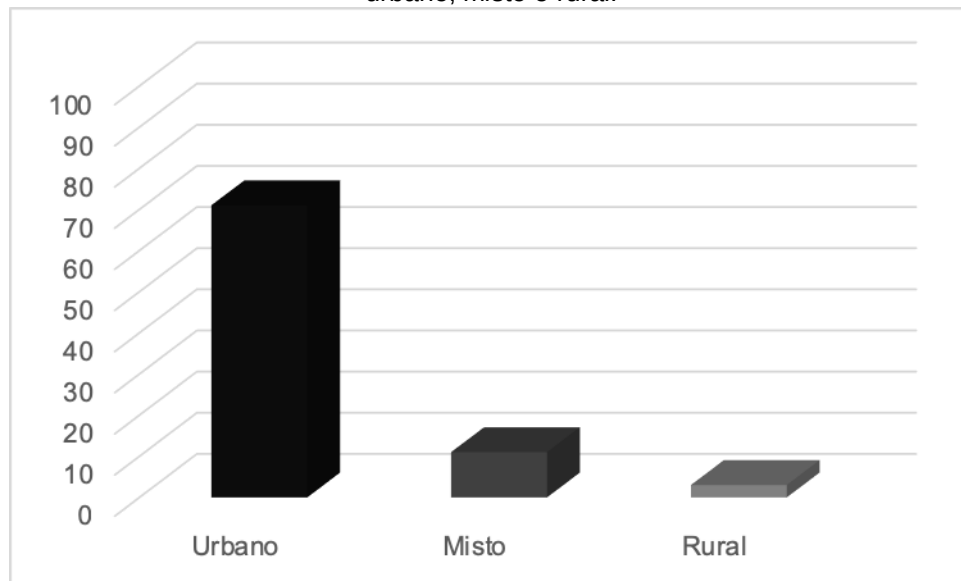


Fonte: Thomas, 2010

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

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

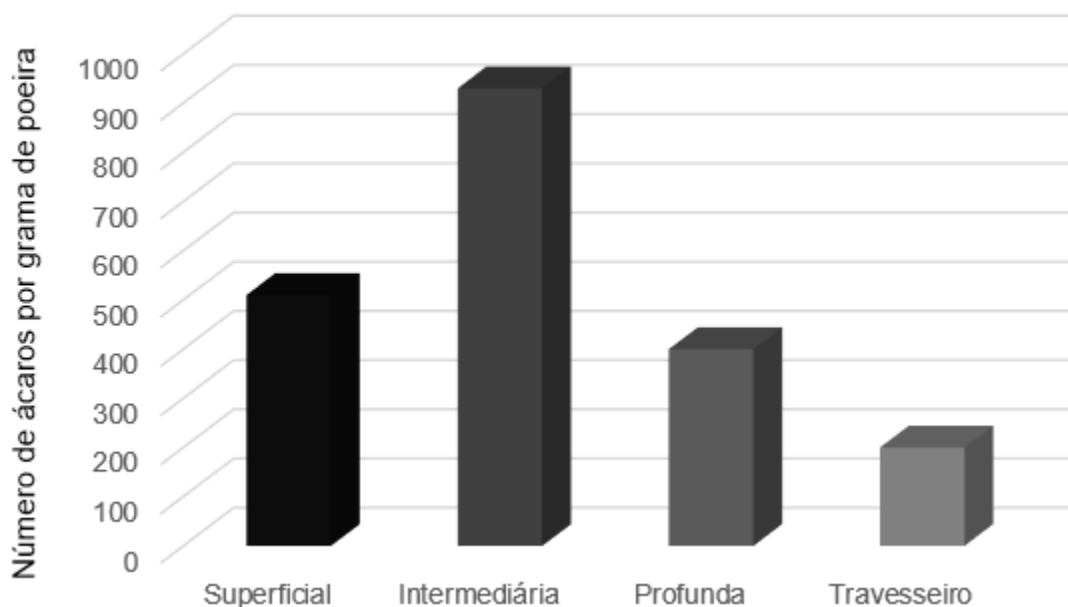
Gráfico 1. Porcentagem de concentração de ácaros de poeira doméstica separados em ambientes urbano, misto e rural.



Fonte: adaptado de Agratorres et al., 1999.

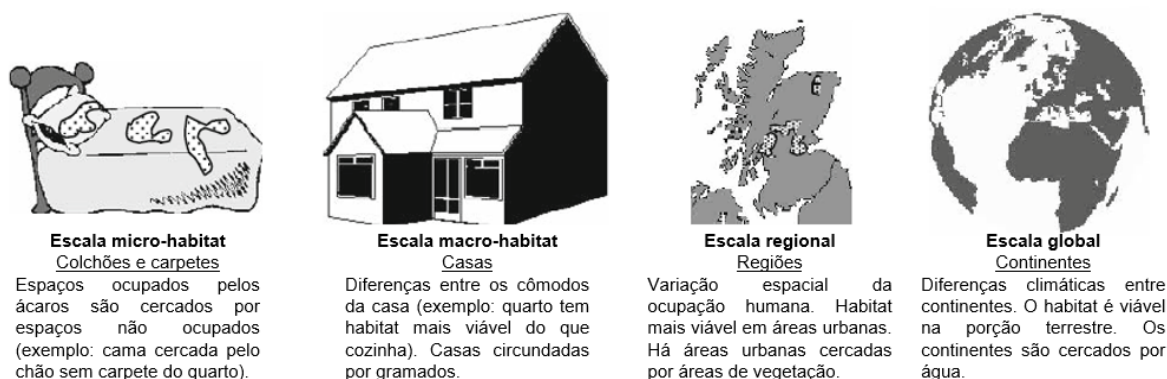
A intensa mobilização de pessoas suporta também a mobilização e migração de ácaros concomitantemente. Há evidências de migração de ácaros em mobílias, o que leva à dispersão dos ácaros domésticos entre continentes, com possíveis efeitos na genética e evolução das espécies (Colloff, 2009). A ecologia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

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



Fonte: adaptado de Colloff, 2009.

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



Fonte: adaptado de Colloff, 2009.

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

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

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

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

3 ALÉRGENOS DE ÁCAROS DE POEIRA DOMÉSTICA

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

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

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

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

Fonte: adaptado de Breiteneder e Chapman, 2014.

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

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

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

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

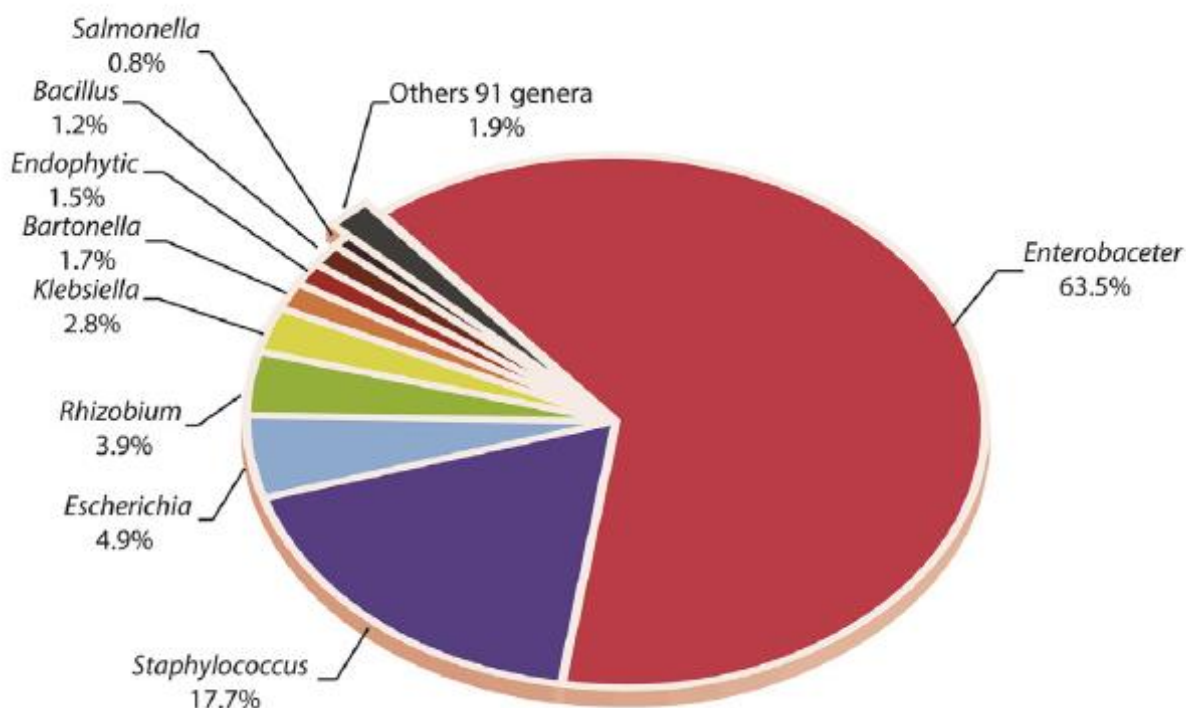
Tabela 2. Relação de alérgenos derivados de *D. farinae*, suas estruturas bioquímicas e pesos moleculares. Notar que alguns alérgenos possuem estrutura e/ou peso molecular ainda desconhecidos.

Alérgeno	Estrutura bioquímica	Peso molecular (KDa)
Der f 1	Protease cistínea	27
Der f 2	Família NPC2	15
Der f 3	Tripsina	29
Der f 4	Alfa-amilase	57.9
Der f 6	Quimotripsina	25
Der f 7	Proteína de aumento da permeabilidade bactericida	30-31
Der f 8	Glutathione S-transferase	32
Der f 10	Tropomiosina	37
Der f 11	Paramiosina	98
Der f 13	Proteína ligante a ácido graxo	
Der f 14	Apolipoforina	177
Der f 15	Quitinase	98/109
Der f 16	Gelsolina/villina	53
Der f 17	Proteína ligante ao cálcio	53
Der f 18	Quitinase	60
Der f 20	Arginina quinase	40
Der f 21		14
Der f 22		
Der f 23	Proteína tipo peritrofina	19
Der f 24	Proteína ligante ao Ubiquinol-citocromo c redutase	13
Der f 25	Triose-fosfato isomerase	34
Der f 26	Miosina de cadeia leve	18
Der f 27	Serpina	48
Der f 28	Proteína de choque térmico	70
Der f 29	Ciclofilina	16
Der f 30	Ferritina	16
Der f 31	Cofilina	15
Der f 32	Pirofosfatase inorgânica secretada	35
Der f 33	Alfa-tubulina	52
Der f 34	enamina/imina deaminase	16
Der f 35		14.4 kDa, natural e recombinante
Der f 36		23

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

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

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



Fonte: Chan et al., 2015

4 ALÉRGENOS DO GRUPO 2

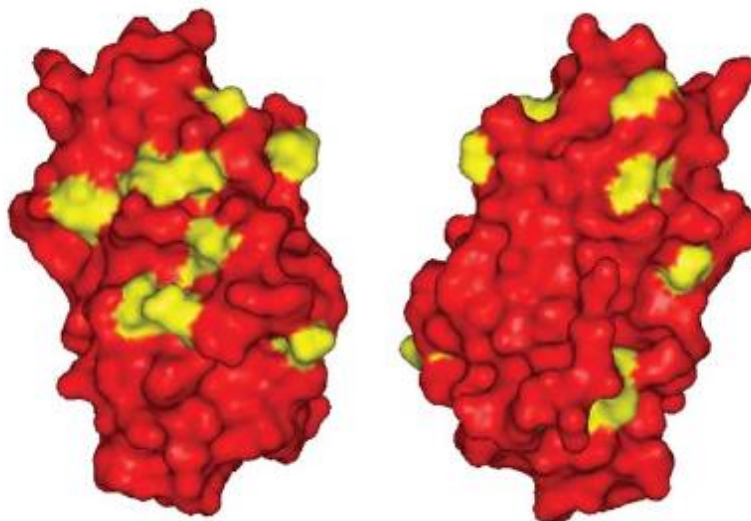
Os alérgenos do grupo 2 são classificados como proteínas ligantes a lipídios e possivelmente não são enzimas. Outros grupos com a mesma classificação são os grupos 13 e 14 (Colloff, 2009). O grupo 2 apresenta homologia estrutural com o fator de diferenciação mieloide 2 (MD-2), e pode ser classificado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

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

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

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

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



Fonte: Johanensen, 2005.

5 RESPOSTAS IMUNOLÓGICAS FRENTE AOS ÁCAROS DE POEIRA DOMÉSTICA

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

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

entrar mais facilmente via epitélio folicular pouco cornificado (Pucheu-Haston et al., 2008).

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

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

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

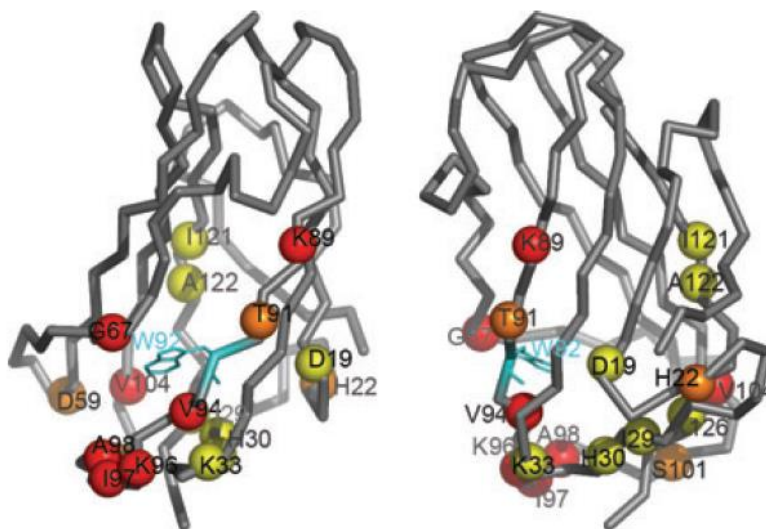
Citocinas promotoras de resposta Th2 são expressas principalmente na fase aguda do eczema atópico, ao passo que a medida que a doença torna-se crônica, ocorre maior expressão de citocinas Th1 (principalmente IFN-gamma), Th17 (IL-17) e Th22 (IL-22) (Eyerich e Novak, 2013). Citocinas Th1 são induzidas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

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

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

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

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



Fonte: Ichikawa et al., 2009.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE O CAPÍTULO 1

A dermatite atópica é uma doença que apresenta complexa imunopatogênese, sendo a sensibilização a ácaros de poeira doméstica uma das partes que a compõem.

Os alérgenos de HDM podem agir por diferentes vias imunológicas e novos estudos pesquisando os mecanismos de sensibilização dos diferentes grupos de alérgenos são necessários.

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

REFERÊNCIAS

Abidin SZ, Ming HT. Effect of a commercial air ionizer on dust mites *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* (Acari: Pyroglyphidae) in the laboratory. Asian Pac J Trop Biomed. 2012;2(2):156-158.

Agratorres JM, Pereira-Lorenzo A, Fernandez-Fernandez I. Population dynamics of house dust mites (acari: pyroglyphidae) in Santiago de Compostela (Galicia, Spain). Acarologia. 1999;40(1):59-63.

Allergen nomenclature [homepage]. USA. WHO/IUIS Allergen Nomenclature Sub-Committee. 2018. [acessado em: 10 ago 2018]. Disponível em <<http://www.allergen.org>>.

Arlian LG. Water balance and humidity requirements of house dust mites. Exp Appl Acarol. 1992;16(1-2):15-35.

Arlian LG, Bernstein IL, Gallagher JS. The prevalence of house dust mites, *Dermatophagoides* spp, and associated environmental conditions in homes in Ohio. J Allergy Clin Immunol. 1982;69(6):527-32.

Arlian LG, Confer PD, Rapp CM, Vyszenski-Moher DL, Chang JC. Population dynamics of the house dust mites *Dermatophagoides farinae*, *D. pteronyssinus* and *Euroglyphus maynei* (Acari: Pyroglyphidae) at specific relative humidities. J Med Entomol. 1998;35(1):46-53.

Arlian LG, Morgan MS. Biology, ecology and prevalence of dust mites. Immunol Allergy Clin N Am. 2003;23:443-468.

Arlian LG, Neal JS, Vyszenski-Moher DL. Reducing relative humidity to control the house dust mite *Dermatophagoides farinae*. J Allergy Clin Immunol. 1999;104(4):852-856.

Arlian LG, Platts-Mills TAE. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. J Allergy Clin Immunol. 2001;107(3):S406-S413.

Arlian LG, Yella L, Morgan MS. House dust mite population growth and allergen production in cultures maintained at different temperatures. J Allergy Clin Immunol. 2005;125(2):ab17.

Assunção DL, Farias MR, Barbosa MCR, Machado LHA. Evaluation of the concentration of allergens from mites in fur and household dust of dogs with atopic dermatitis. Pes Vet Bras. 2017;37(1):41-46.

Baris S, Ozen A, Akdeniz T, Karakoc-Aydiner E, Aydin O, Ercan H et al. House dust mites confer a distinct immunological feature among dermatitis. Iran J Allergy Asthma Immunol. 2016;15(4):264-274.

Bessot JC, Pauli G. Mite allergens: an overview. Eur Ann Allergy Clin Immunol. 2011;43(5):141-156.

Breiteneder H, Chapman MD. Allergen Nomenclature. In: Lockey RF, Ledford DK. Allergens and Allergen Immunotherapy: subcutaneous, sublingual and oral. 5. ed. Tampa: CRC Press, 2014.

Bizikova P, Pucheu-Haston CM, Eisenschenk MNC, Marsella R, Nuttall T, Santoro D. Review: Role of genetics and the environment in the pathogenesis of canine atopic dermatitis. Vet Dermatol. 2015;26(2):95-e26.

Bizikova P, Santoro D, Marsella R, Nuttall T, Eisenschenk MN, Pucheu-Haston CM. Review: clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis. Vet Dermatol. 2015;26(2):79-e24.

Bublin M, Eiwegger T, Breiteneder H. Do lipids influence the allergic sensitization process? J Allergy Clin Immunol. 2014;134(3):521-529.

Chan TF, Ji KM, Yim AKY et al. The draft genome, transcriptome, and microbiome of *Dermatophagoides farinae* reveal a broad spectrum of dust mite allergens. J Allergy Clin Immunol. 2015;135(2):539-548.

Colloff, MT. Dust mites. 1.ed. Collingwood: CSIRO, 2009; xiv.

Deboer, D. The future of immunotherapy for canine atopic dermatitis. Vet Dermatol. 2017;28:25-e6.

Dutra BMRS, Filho NAR, Zavadniak AF. Alérgenos inaláveis em Curitiba: uma revisão de sua relevância clínica. Rev Bras Alerg Immunopatol. 2001;24(5):189-195.

Eisenbarth SC, Piggott DA, Huleatt JW, Visintin I, Herrick CA, Bottomly K. Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen. J Exp Med. 2002;196(12):1645-1651.

Eyerich K, Novak N. Immunology of atopic eczema: overcoming the Th1/Th2 paradigm. Allergy. 2013;68(8):974-982.

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

Fijimura T, Aki T, Isobe T, Matsuoka A, Hayashi T, Ono K, Kawamoto S. Der f 35: An MD-2-like house dust mite allergen that cross-reacts with Der f 2 and Pso o 2. Allergy. 2017;72(11):1728-1736.

Hallas TE. The biology of mites. Allergy. 1991;46(11):6-9.

Hart BJ. Life cycle and reproduction of house-dust mites: environmental factors influencing mite populations. Allergy. 1998;53(48):13-17.

Ichikawa S, Takai T, Yashiki T, Takahashi S, Okumura K, Ogawa H, Kohda D, Hatanaka H. Lipopolysaccharide binding of the mite allergen Der f 2. Genes Cells. 2009;14(9):1055-1065.

Johannessen BR, Skov LK, Kastrup JS, Kristensen O, Bolwig C, Larsen JN, Spangfort M, Lund K, Gajhede M. Structure of the house dust mite allergen Der f 2: implications

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Olivry T, Mayhew D, Paps JS, Linder KE, Paredo C, Rajpal D, Hofland H, Cote-Sierra J. Early activation of Th2/Th22 inflammatory and pruritogenic pathways in acute canine atopic dermatitis skin lesions. *J Invest Dermatol*. 2016;136(10):1961-1969.

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

Platts-Mills TAE, Thomas WR, Aalberse RC, Vervloet D, Chapman MD. Dust mite allergens and asthma: report of a second international workshop. *J Allergy Clin Immunol*. 1992;89(6):1046-1060.

Platts-Mills TAE, Vervloet D, Thomas WR, Aalberse RC, Chapman M. Indoor allergens and asthma: report of the third international workshop. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100(6):S2-S24.

Pucheu-Haston CM, Jackson HA, Olivry T, Dunston SM, Hammerberg B. Epicutaneous sensitization with *Dermatophagoides farinae* induces generalized allergic dermatitis and elevated mite-specific immunoglobulin E levels in canine model of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy*. 2008;38:667-669.

Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Eisenschenk MNC, Santoro D, Nuttall T, Marsella R. Review: The role of antibodies, autoantigens and food allergens in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*. 2015;26(2):115-e30.

Pucheu-Haston CM, Bizikova P, Marsella R, Santoro D, Nuttall T, Eisenschenk MN. Review: lymphocytes, cytokines, chemokines and the T-helper 1-T-helper 2 balance in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol*. 2015b;26(2):124-e32.

Santoro D, Marsella R, Pucheu-Haston CM, Eisenschenk MN, Nuttall T, Bizikova P. Review: pathogenesis of canine atopic dermatitis: skin barrier and host micro-organism interaction. *Vet Dermatol*. 2015;26(2):84-e25.

Saridomichelakis M, Olivry T. An update on the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet J*. 2016;207:29-37.

Scheurer S, Toda M, Vieths S. What makes an allergen? *Clin Exp Allergy*. 2015;45:1150-1161.

Souza CCT, Filho NAR. Perfil de aeroalérgenos intradomiciliares comuns no Brasil: revisão dos últimos 20 anos. *Rev Bras Alerg Immunopatol*. 2012;35(2):47-52.

Sporik R, Chapman MD, Platts-Mills TAE. House dust mite exposure as a cause of asthma. *Clin Exp Allergy*. 1992;22:897-906.

Thomas WR. Geography of house dust mite allergens. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2010;28(4):211-24.

Thomas WE. Hierarchy and molecular properties of house dust mite allergens. *Allergol Int*. 2015;64(4):304-311.

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

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

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

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

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

CAPÍTULO 2

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

Autores:

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

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

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

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

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

Fonte financiadora: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) [Código de Financiamento 001], e com apoio da Zenoaq (Nippon Zenyaku Kogyo Co. Ltd).

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

Highlights

- Cães com dermatite atópica são sensibilizados por D. farinae.
- Der f 2 e Zen 1 são considerados maiores em Curitiba, Brasil.
- O contato constante com material têxtil pode facilitar a sensibilização a estes alérgenos.

INTRODUÇÃO

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

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

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

O objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade aos extratos de *Dermatophagoides farinae* bruto, ao Der f 2 e Zen 1 em cães com dermatite atópica.

MATERIAL E MÉTODOS

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

Critérios de inclusão

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

Critérios de exclusão

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

Obtenção de amostras de soro

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

Coleta de informações ambientais

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

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

ELISA

Imobilização antigênica

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

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

Bloqueio

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

Preparação e incubação das amostras de soro dos cães

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

Preparação e incubação dos anticorpos

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

Reação enzima-substrato

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

Leitura da absorvância

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

Análise estatística

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

A correlação entre as mensurações de densidade óptica dos alérgenos Zen 1 e Der f 2 em relação a *Dermatophagoides farinae* bruto, e entre Zen 1 e Der f 2, foram

determinados pelo cálculo do coeficiente de *Spearman*, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

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

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

RESULTADOS

Dados epidemiológicos

Ao todo, 100 cães foram incluídos, de 23 raças diferentes, com predomínio de Lhasa Apso, Shih Tzu, Maltês e Bulldog Francês, bem como animais sem raça definida (SRD). A idade variou entre 11 meses e 14 anos, com mediana de 5 anos. Em relação ao gênero, 44% eram machos e 56% eram fêmeas.

Sorologia

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

Ao correlacionar os valores de densidade óptica de IgE aos alérgenos purificados com o extrato bruto de *D. farinae*, observou-se alta correlação entre Zen 1 e extrato bruto de *D. farinae* (Spearman $r = 0,88$, $p < 0.001$; figura 3), ao passo que observou-se uma baixa correlação deste com Der f 2 (Spearman $r = 0,30$; $p < 0.002$; figura 4). Ainda, não observou-se correlação entre os valores de densidade óptica entre Zen 1 e Der f 2 (Spearman $r = 0,22$, $p < 0.02$, figura 5).

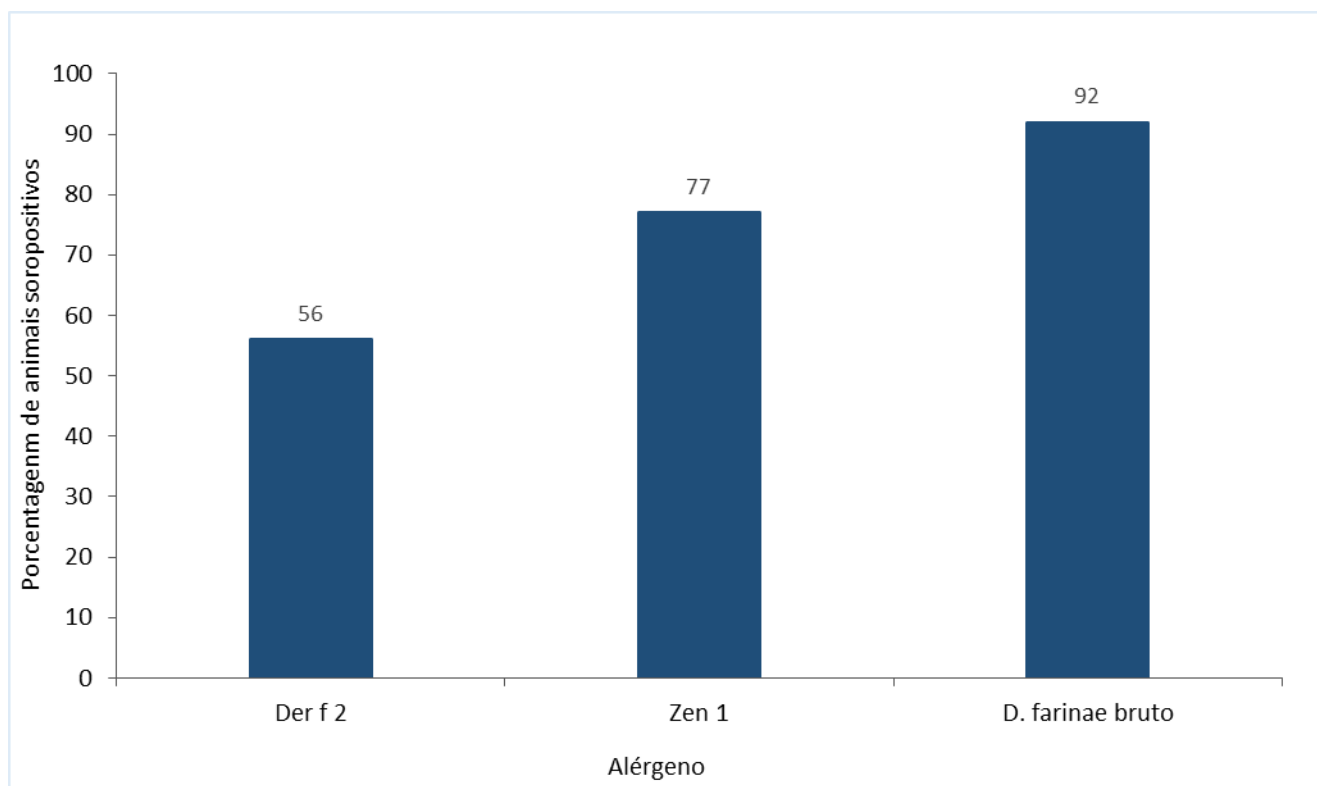


Figura 1. Percentual de animais soropositivos na mensuração de IgE para *D. farinae* bruto, Der f 2 e Zen 1.

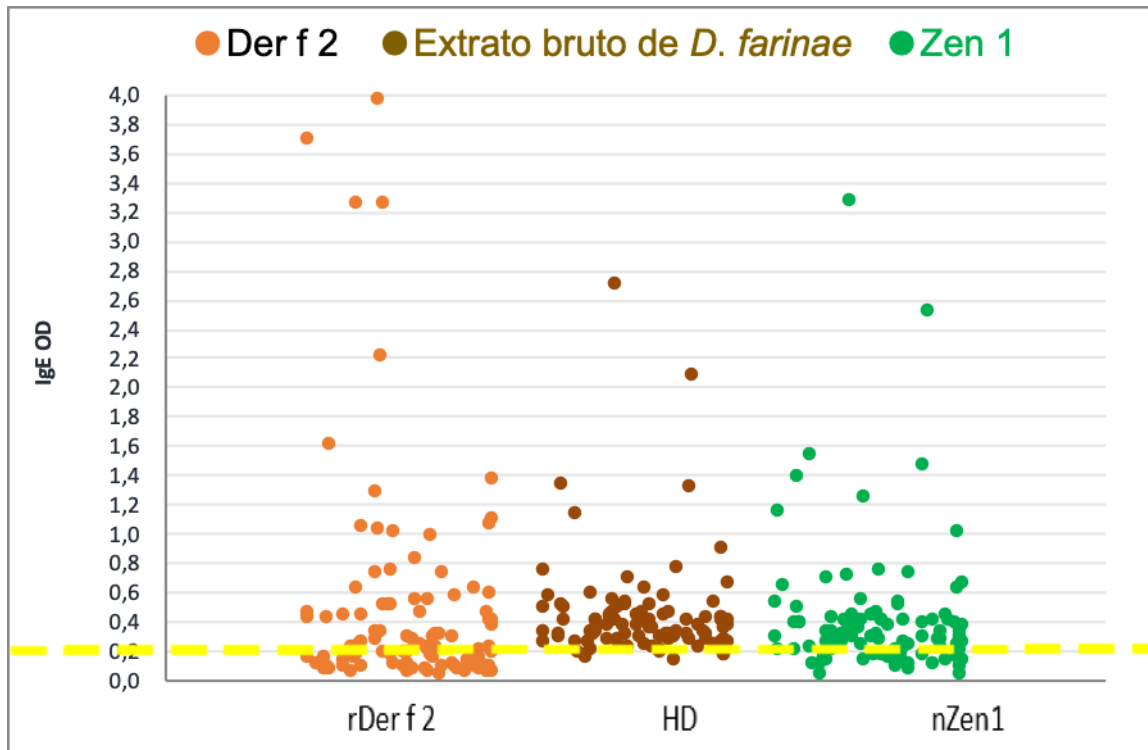


Figura 2. Todos os valores de densidade óptica de IgE para cada alérgeno, no total de 100 amostras de soro provenientes de cães com dermatite atópica. HD: extrato bruto de *D. farinae*.

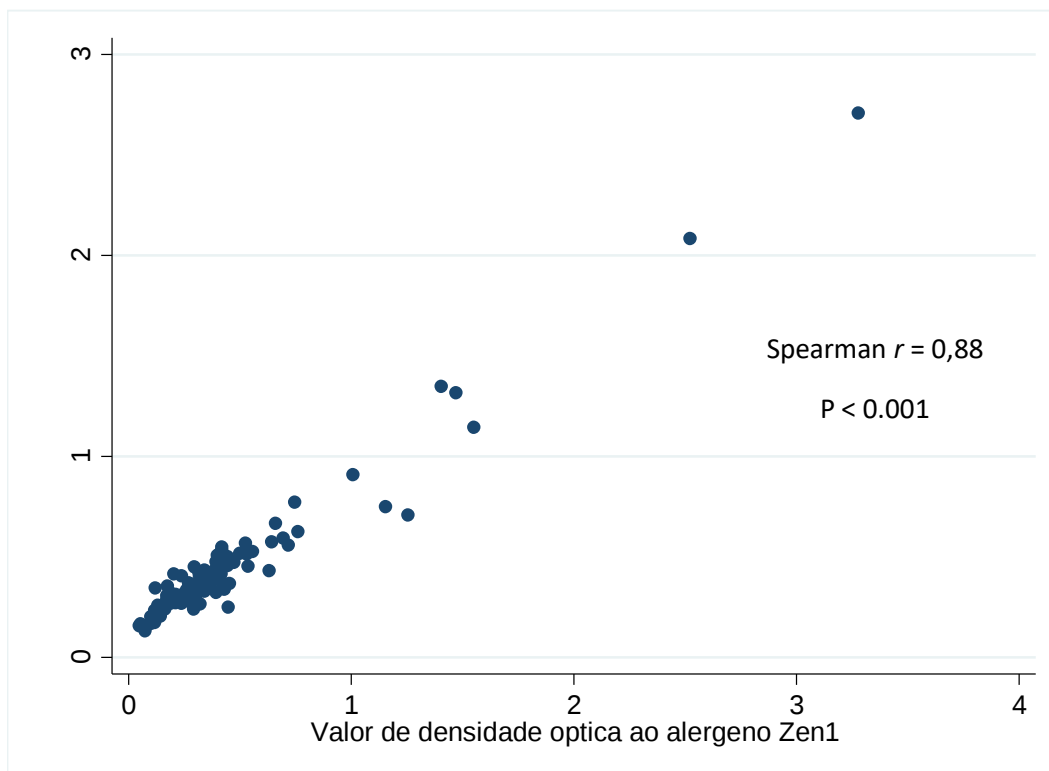


Figura 3. Correlação entre valores de densidade óptica (OD) de IgE ao *Dermatophagoides farinae* bruto (HDM) e Zen 1.

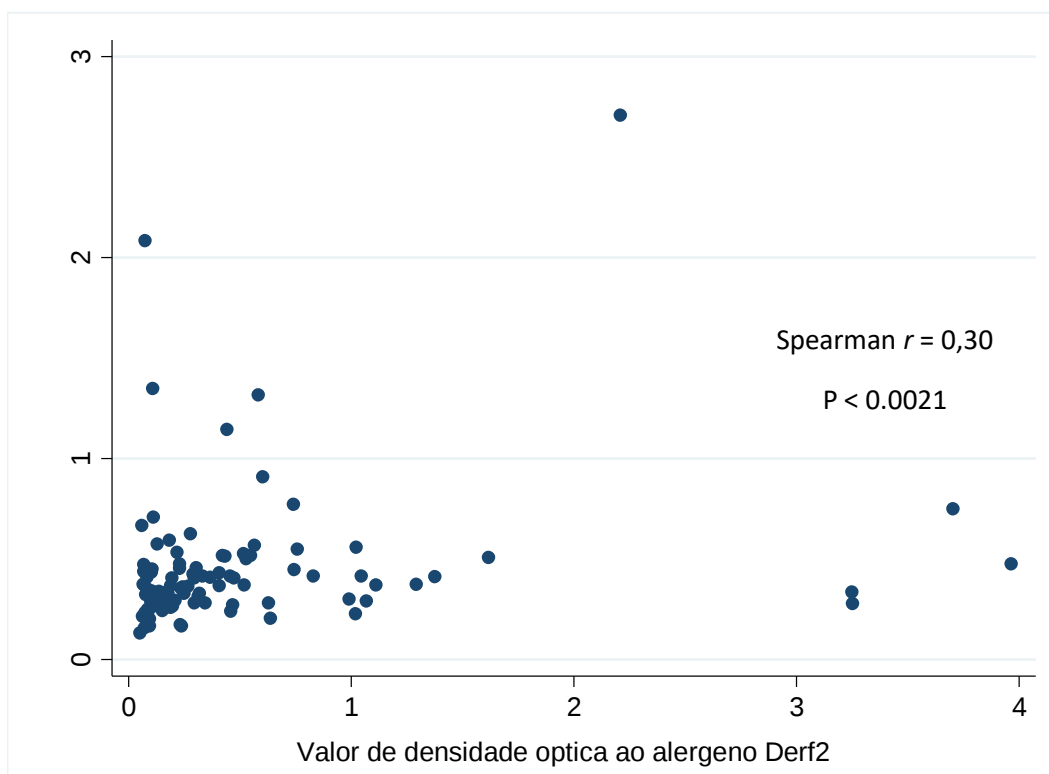


Figura 4. Correlação entre valores de densidade óptica (OD) de IgE ao *Dermatophagoides farinae* bruto (HDM) e Der f 2.

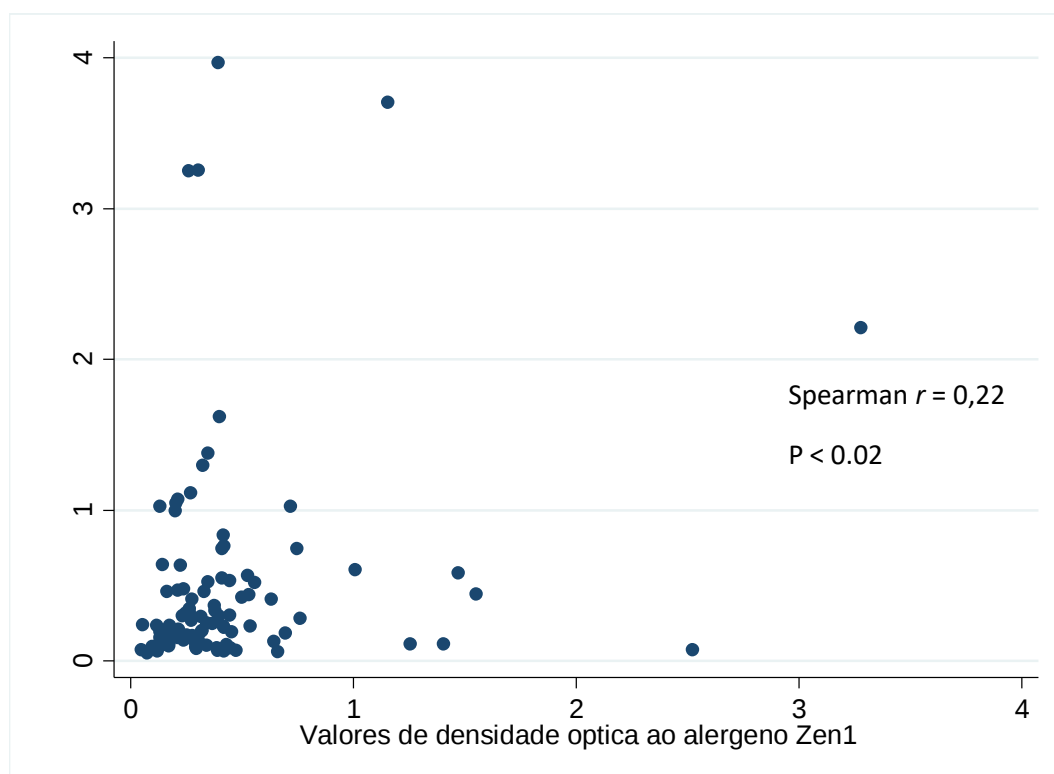


Figura 4. Correlação entre valores de densidade óptica (OD) de IgE ao Der f 2 e Zen 1.

Alérgenos e contato com materiais ambientais

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

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

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

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

DISCUSSÃO

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

No Brasil, *D. pteronyssinus* é encontrado mais comumente em regiões costeiras, com umidade mais elevada, ao passo que *D. farinae* encontra-se em maiores concentrações em regiões secas e quentes (Souza e Rosário, 2012). Alérgenos de *D. pteronyssinus* parecem ser mais comuns na poeira domiciliar na região investigada (Dutra et al., 2001; Farias et al., 2015; Assunção et al., 2017) e é importante ressaltar que alérgenos do grupo 2 de *D. farinae* e *D. pteronyssinus* dividem até 85% de suas sequências de aminoácidos, e reações cruzadas entre eles podem ocorrer (Masuda et al., 1999; Smith et al., 2001). Porém, cães com dermatite atópica podem ser mais comumente sensibilizados a *D. farinae* do que a outros ácaros (Bensignor e Carlotti, 2002; Foster et al., 2003; Farmaki et al., 2012), mesmo quando estes são mais comumente encontrados no ambiente (Farmaki et al., 2012).

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

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

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

Uma alta soropositividade ao alérgeno Zen 1 também foi observada no presente trabalho, o qual é um alérgeno de alto peso molecular de 188 kDa (variando de 150 a 250 kDa). Este alérgeno foi primeiramente identificado em estudo japonês publicado em 2008, no qual o soro dos cães com dermatite atópica reconheceram bandas de 188 kDa de *D. farinae* que não apresentava homologia com os alérgenos até então reconhecidos (Tsukui et al., 2008). Este alérgeno foi caracterizado e sequenciado e ganhou o nome provisório de Zen 1, que ainda é utilizado atualmente. No primeiro estudo publicado que pesquisou presença de IgE contra o Zen 1 nativo, dos 33 cães com dermatite atópica espontânea nos Estados Unidos (Estado da Carolina do Norte), 88% foram soropositivos ao alérgeno, ao passo que 90% de 29 cães foram positivos na Europa (França e Suíça), caracterizando este novo alérgeno como maior nestas localidades (Olivry et al., 2017). Em seguida, este alérgeno também foi considerado maior na região sudeste da Inglaterra, onde 76% de 59 cães foram considerados positivos (Patel et al., 2019). Em adição, proteínas de 175 kDa foram identificadas em um estudo que caracterizava um extrato de *D. farinae*, que poderia ser Zen 1 (Moya et al., 2016). Interessantemente, no Brasil, um estudo prévio demonstrou que cinco de 10 cães reconheceram bandas de 225 kDa, através de western blot, que também poderiam ser Zen 1, mas nenhuma investigação posterior foi realizada neste caso (Cunha et al., 2012). Finalmente, um estudo demonstrou que cães com dermatite atópica apresentaram maior produção de anticorpos IgG, especificamente IgG1, contra uma proteína de 180 kDa de *D. farinae* (Hou et al., 2006).

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

No presente estudo, os níveis de densidade óptica entre o extrato bruto de *D. farinae* e Zen 1 foram significativamente correlacionados, o que não aconteceu com Der f 2 e o extrato bruto. Assim, provavelmente, a sororreatividade ao extrato bruto de *D. farinae* está fortemente relacionada aos alérgenos de alto peso molecular, como o Zen 1, como observado por outros autores (Olivry et al., 2017; Patel et al., 2019). Também não houve correlação entre Der f 2 e Zen 1, o que pode representar que o Zen 1 seja de diferente origem biológica do Der f 2 e possivelmente não há reação cruzada entre eles.

O papel de anticorpos IgE na fisiopatogenia da dermatite atópica ainda requer melhores esclarecimentos. Os efeitos fisiológicos e patofisiológicos da IgE são manifestados através da interação com seus receptores de alta afinidade (FcεR1α) e de baixa afinidade (CD23), na superfície de células efectoras, principalmente mastócitos, basófilos e eosinófilos, promovendo a liberação de citocinas e mediadores inflamatórios, além de regular mudanças na produção de anticorpos por plasmócitos e linfócitos B, e na apresentação de antígenos por linfócitos B e células dendríticas (Hammerberg, 2014). É sabido que cães não atópicos podem apresentar altos níveis de IgE específica a determinados alérgenos (Lian e Haliwell, 1998; Roque et al., 2011; Lauber et al., 2012). Entretanto, alguns cães experimentalmente sensibilizados podem apresentar baixos níveis de IgE alérgeno específico (Okayama et al., 2011). Essa controversa correlação entra níveis de IgE e doença clínica pode ser explicada pela possibilidade de apenas a porção variável deste é direcionada contra alérgenos ambientais (Pucheu-Haston et al., 2015). Assim, o fato destes animais apresentarem níveis sorológicos de IgE acima do ponto de corte implica em sensibilização, mas não necessariamente em desenvolvimento e desencadeamento de sinais clínicos, uma vez que a imunopatogênese da doença é extremamente complexa. A molécula de IgE pode ser funcionalmente heterogênea, com frações que diferenciam-se em alergenicidade, mobilidade e habilidade de ligar-se à outras moléculas (Pucheu-Haston et al., 2015). Contudo, a resposta benéfica em humanos com dermatite atópica após utilizar terapia parenteral com anticorpo monoclonal direcionado a IgE comprova que este anticorpo tem papel importante na patofisiologia da doença (Sheinkopf et al., 2008).

A importância de alérgenos de *D. farinae* na dermatite atópica em cães também pode ser reforçada através da resposta positiva à imunoterapia com Der f 2 recombinante conjugado a pullulan, os quais apresentaram melhora na manifestação clínica da doença, redução nos seus escores clínicos e de prurido, além de redução no uso de medicação, após poucos meses de uso do produto (Olivry et al., 2017; Kawano e Mizuno, 2017; Fischer et al., 2018). Interessante observar que tanto cães sabidamente positivos para Der f 2, como cães apenas positivos para *D. farinae* bruto se beneficiaram desta opção terapêutica, e este produto se mostrou benéfico em cães sensibilizados a múltiplos alérgenos ambientais, além de *D. farinae* (Kawano e Mizuno, 2017). Assim, é possível que a imunoterapia anti-Der f 2 estimule vias imunorregulatórias minimizando resposta Th2. Adicionalmente, o adjuvante utilizado na imunoterapia anti-Der f 2 é o polissacarídeo pullulan, que apresenta propriedades de redução do poder de reconhecimento de IgE e de sua alergenicidade, além de promover citocinas Th1 (Mehvar, 2003; Wang et al., 2016).

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

A alta soropositividade aos alérgenos aqui demonstrados coincide com uma alta exposição à material reservatório de ácaros de poeira doméstica. Em Curitiba, a temperatura média anual é de cerca de 20°C, com umidade relativa do ar entre 60-80% (Instituto Nacional de Meteorologia do Brasil), o que torna o ambiente ideal para o desenvolvimento e reprodução de ácaros da espécie *Dermatophagoides* (Arlian e

Platts-Mills, 2001). É notório que estes ácaros são altamente concentrados em ambientes domiciliares, especialmente em locais onde há presença de mobiliário e material têxtil como estofados, como tapetes, colchões, sofás e camas (Arlian e Morgan, 2003; Assunção et al., 2017) e a grande maioria dos animais positivos para os alérgenos testados tinham liberdade de trânsito dentro de seus domicílios.

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

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

Em conclusão, cães com dermatite atópica são frequentemente sensibilizados a *D. farinae*, e seus alérgenos Der f 2 e Zen 1 são alérgenos maiores nestes animais. A sensibilização ao Zen 1 parece ser a principal responsável à sensibilização ao ácaro *D. farinae* e a frequente exposição com mobília e materiais têxteis domiciliares pode favorecer a esta sensibilização.

REFERÊNCIAS

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

Hensel P, Santoro D, Favrot C *et al.* Canine atopic dermatitis: detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res* 2015; 11: 196.

Arlian LG, Platts-Mills TAE. The biology of dust mites and the remediation of mite allergens in allergic disease. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 3: S406-413.

Agratorres JM, Pereira-Lorenzo A, Fernandez-Fernandez I. Population dynamics of house dust mites (acar: pyroglyphidae) in Santiago de Compostela (Galicia, Spain). *Acarologia* 1999; 40: 59-63.

Arlian LG, Morgan MS. Biology, ecology and prevalence of dust mites. *Immunol Allergy Clin N Am* 2003; 23: 443-468.

Nuttall TJ, Hill PB, Bensignor E *et al.* House dust and forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2006; 17: 223-35.

Yamamoto M, Haruna T, Yasui K *et al.* A novel atopic dermatitis model induced by topical application with *Dermatophagoides farinae* extract in NC/Nga mice. *Allergol Int* 2007; 56: 139-148.

Pucheu-Haston CM, Jackson HA, Olivry T *et al.* Epicutaneous sensitization with *Dermatophagoides farinae* induces generalized allergic dermatitis and elevated mite-specific immunoglobulin E levels in canine model of atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 667-669.

McCall C, Hunter S, Stedman K *et al.* Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; 78: 231-247.

Nuttall TJ, Lamb JR, Hill PB. Characterisation of major and minor *Dermatophagoides* allergens in canine atopic dermatitis. *Res Vet Sci* 2001; 71: 51-7.

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

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

Yamashita L, Fujiwara C, Azuma R *et al.* Determination of antigenic proteins of housedust mites in 90 dogs suffering from atopic dermatitis. *J Vet Med Sci* 2002; 64: 673-6.

Moya R, Carnés J, Sinovas N *et al.* Immunoproteomic characterization of a *Dermatophagoides farinae* extract used in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* 2016; 1: 1-8.

Olivry T, Dunston SM, Favrot C *et al.* The novel high molecular weight *Dermatophagoides farinae* protein Zen-1 is a major allergen in North American and European mite allergic dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2017; 28: 177-e38

Thomas WE. Hierarchy and molecular properties of house dust mite allergens. *Allergol Int* 2015; 64: 304-311.

Colloff, MT. *Dust mites*. Collingwood: CSIRO, 2009.

Ichikawa S, Takai T, Yashiki T *et al.* Lipopolysaccharide binding of the mite allergen Der f 2. *Genes Cells* 2009; 14: 1055-1065.

Scheurer S, Toda M, Vieths S. What makes an allergen? *Clin Exp Allergy* 2015; 45: 1150-1161.

Tsukui T, Sakaguchi M, Ohashi S *et al.* Analysis of house dust mite (*D. farinae*) allergens in canine atopic dermatitis. *J Aller Clin Immunol* 2008; 121: S34 (abstract).

Favrot C, Steffan J, Seewald W *et al.* A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol* 2010; 21: 23-31.

Day MJ, Corato A, Shaw SE. Subclass profile of allergen-specific IgE antibodies in atopic dogs. *Res Vet Sci* 1996; 61: 136-142.

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

Goicoa A, Espino L, Rodriguez I *et al.* Importance of house dust and storage mites in canine atopic dermatitis in the geographic region of Galicia, Spain. *Acta Vet Hung* 2008; 56: 163-71.

Farmaki R, Saridomichelakis MN, Leontides L *et al.* Dust mite species in the households of mite-sensitive dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* 2012; 23: 222-e45.

Lauber B, Molitor V, Meury S *et al.* Total IgE and allergen-specific IgE and IgG antibody levels in sera of atopic dermatitis affected and non-affected Labrador-and Golden retrievers. *Vet Immunol Immunopathol* 2012; 149: 112-118.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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. *Vet Dermatol* 2006; 17: 306-312.

Randall AJ, Hillier A, Cole LK *et al.* Quantitation of house dust mite allergens (Der f 1 and group 2) on the skin and hair of dogs. *Am J Vet Res* 2005; 66: 143-149.

Instituto Nacional de Meteorologia. Disponível em < <http://www.inmet.gov.br/portal/>>.

Eaton K, Downing FS, Griffiths DA *et al.* Housedust mites (*D. pteronyssinus*) in pets' beds and their relation to dust allergy. *Clin Allergy* 1985; 15: 151-154.

Randall A, Hillier A, Cole LK *et al.* Quantitation of house dust mites and house dust mite allergens in the microenvironment of dogs. *J Vet Res* 2003; 64: 1580-1588.

Raffan E, Lawrence H, Henderson T *et al.* Prevalence of the group 1 *Dermatophagoides* allergens Der p 1 and Der f 1 in homes with no dogs, healthy dogs and *Dermatophagoides*-sensitized atopic dogs in Liverpool. *Vet Dermatol* 2005; 16: 253-260.

Neal JS, Arlian LG, Morgan MS. Relationship among house-dust mites, Der f 1, Fel d 1 and Can f 1 on clothing and automobile seats with respect to densities in houses. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2002; 88: 410-415.

Teplitsky Vm Mumcuoglu KY, Babai I *et al.* House dust mites on skin, clothes and bedding of atopic dermatitis patients. *Int J Dermatol* 2008; 47: 790-795.

Clarke D, Burke D, Gormally M *et al.* Dynamics of house dust mite transfer in modern clothing fabrics. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2015; 114: 335-340.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

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

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

APÊNDICES

APÊNDICE A

Termo de consentimento de uso animal

TERMO DE CONSENTIMENTO DE USO ANIMAL

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

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

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

Termo de consentimento de uso animal (continuação)

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

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

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

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

Assinatura do Proprietário

Assinatura do Pesquisador

TELEFONES

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

Orientador: Marconi Rodrigues de Farias

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

ANEXOS

ANEXO A

Normas do periódico Veterinary Immunology and Immunopathology

O idioma para publicação é o inglês.

As normas encontram-se, em inglês, disponíveis no link
<<https://www.elsevier.com/journals/veterinary-immunology-and-immunopathology/0165-2427/guide-for-authors>>

ANEXO B

Parecer do CEUA



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

Curitiba, 23 de novembro de 2017.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01185 – 2ª versão

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

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

MARCONI RODRIGUE DE FARIAS

EQUIPE DE PESQUISA

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

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CURSO

Medicina Veterinária

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

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

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

Parecer do CEUA (continuação)



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

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

Atenciosamente,

Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha

Coordenador

Comissão de Ética no Uso de Animais

