

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

JULIANE POSSEBOM DE OLIVEIRA

**TESTES ALÉRGICOS DE PUNTURA, DE CONTATO E IMMUNOBLOTTING
NA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ALÉRGENOS DE ÁCAROS E
ALIMENTARES EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA**

*(Food and mite dust allergen sensibility evaluation of immunoblotting, prick and
patch tests in atopic dogs)*

CURITIBA

2019

JULIANE POSSEBOM DE OLIVEIRA

**TESTES ALÉRGICOS DE PUNTURA, DE CONTATO E IMMUNOBLOTTING
NA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ALÉRGENOS DE ÁCAROS E
ALIMENTARES EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA**

*(Food and mite dust allergen sensibility evaluation of immunoblotting, prick and
patch tests in atopic dogs)*

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

Orientador: Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias.

CURITIBA

2019



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Câmpus Curitiba

PUCPR
GRUPO MARISTA

**ATA Nº 0017 E PARECER FINAL DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM
CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA JULIANE POSSEBOM DE OLIVEIRA**

Aos 05 dias do mês de dezembro do ano de dois mil e dezenove, às 8h30, realizou-se na sala de Pós 08, 2º andar, Bloco Amarelo, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa da tese da doutoranda Juliane Possobom de Oliveira, intitulada: **“ESTUDO DOS TESTES ALÉRGICOS DE PUNTURA, DE CONTATO E IMMUNOBLOTTING NA AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE A ALÉRGENOS DE ÁCAROS E ALIMENTARES EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA”**. A doutoranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Marconi Rodrigues de Farias (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Herberto José Chong Neto (UFPR), Vânia de Oliveira Carvalho (UFPR), Nelson Augusto Rosário Filho (UFPR) e Luiz Henrique Araújo Machado (UNESP). Procedeu-se à exposição da tese, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a tese, que foi considerada APROVADA.

MEMBROS

Prof Dr Marconi Rodrigues de Farias - Orientador
Prof Dr Herberto José Chong Neto (UFPR)
Profa Dra Vânia de Oliveira Carvalho (UFPR)
Prof Dr Nelson Augusto Rosário Filho (UFPR)
Prof Dr Luiz Henrique Araújo Machado (UNESP)

ASSINATURA

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 05 de dezembro de 2019.

Caroline Nocera Bertton
Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	V
AGRADECIMENTOS	VI
FORMATO DA TESE	VII
RESUMO GERAL	VIII
ABSTRACT	IX
CAPÍTULO 1	10
INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO	10
CAPÍTULO 2	19
IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE SENSIBILIZAÇÃO A ALÉRGENOS DE <i>DERMATOPHAGOIDES</i> SPP. EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA.....	19
CAPÍTULO 3	40
TESTES ALÉRGICOS DE PUNTURA E DE CONTATO NA AVALIAÇÃO DA REAÇÃO ADVERSA A ALIMENTOS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA	40
CAPÍTULO 4	68
CONSIDERAÇÕES FINAIS	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXO	75

DEDICATÓRIA

Dedico essa conquista a minha família, alicerce da minha vida, sem vocês nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

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

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

Agradeço ao meu marido, Gustavo, por estar sempre presente, me apoiando em todos os momentos, sua dedicação e cuidados com a Cecília foram fundamentais para a conclusão de mais essa jornada.

Às minhas irmãs: Daniele e Gabriela, aos meus sogros, Bento e Sandra, sempre me apoiando e colaborando de infinitas formas, são os pequenos gestos que nos fortalecem.

As minhas colegas de pós graduação, Bruna Pacheco Duarte e Camilla Alcalá, por compartilhar momentos de dificuldade e alegrias nas descobertas da ciência. À minha sócia, colega, MV Pollyanne Cramer Schmidlin, muito me apoiou e me ajudou no meu dia a dia, obrigada por segurar firme e me apoiar nos projetos que a Dermatovet colaborou.

A aluna de PIBIC, Ariane de Cassia Oliveira Cruz e de estágio curricular Louise Bacher, futuro de vocês será brilhante, obrigada por toda ajuda e apoio durante esse experimento.

A MV Marcia Lima, amiga de estudos, da vida, mesmo longe, sempre caminhamos juntas e a MV Larissa Condas, obrigada por todos os momentos de ajuda, explicação e acolhimento.

A Pós Graduação em Ciência Animal da PUCPR, por mais essa oportunidade de continuidade dos meus estudos.

Ao meu mestre de toda jornada, meu orientador, professor Dr. Marconi Rodrigues de Farias, seus ensinamentos me acompanham a longa data, obrigada por mais esse ciclo que está se encerrando, espero que muitos ainda venham no futuro.

FORMATO DA TESE

Esta tese é composta por:

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

(As referências do capítulo 1 encontram-se ao final da tese).

CAPÍTULO 2: Artigo 1 intitulado: “**Identificação sorológica de sensibilização a alérgenos de *Dermatophagoides* spp. em cães com dermatite atópica**”, a ser enviado para a revista *Veterinary Immunology and Immunopathology*.

Link para Authors Guidelines: <https://www.elsevier.com/journals/veterinary-immunology-and-immunopathology/0165-2427/guide-for-authors>

CAPÍTULO 3: Artigo 2 intitulado: “**Testes alérgicos de puntura e de contato na avaliação da reação adversa a alimentos em cães com dermatite atópica**” a ser enviado para a revista *Veterinary Dermatology*.

Link para Authors Guidelines:

<https://onlinelibrary.wiley.com/page/journal/13653164/homepage/forauthors.html>

CAPÍTULO 4: CONSIDERAÇÕES FINAIS

RESUMO GERAL

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória, pruriginosa, crônica, com sinais clínicos característicos e geralmente associada a produção de imunoglobulina-E (IgE) contra alérgenos ambientais ou alimentares. O uso de testes alérgicos cutâneos, como teste intradérmico (IDT) e de puntura, tem sido amplamente utilizados para avaliar sensibilização a alérgenos ambientais. Entretanto, para alérgenos alimentares há uma escassez de estudos na veterinária. O teste de contato tem se mostrado sensível e adequado para auxiliar nas formulações de dietas restritivas em pacientes com suspeita de reação adversa a alimentos (RAA), mas a correlação desse exame com o teste de puntura não foi avaliada na veterinária. Alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e o *Dermatophagoides farinae* (Df) são importantes na origem de eczema atópico em cães, e sua identificação é fundamental para padronização dos testes e resposta a protocolos de imunoterapia. O objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência da sensibilização aos ácaros e aos alimentos em cães com DA, bem como identificar os principais alérgenos de Dp e Df envolvidos na sensibilização dos cães e a correlação do uso dos testes alérgicos de puntura e contato para diagnóstico de RAA em cães. Para avaliação da sensibilidade aos ácaros, selecionou-se 31 cães com DA stricto sensu, submetidos a IDT e a teste sorológico (Heska®). Foi realizado SDS-PAGE seguido de *immunoblotting*, para detecção das bandas. Foram incluídos 14 cães, destes 12 reagiram a Dp e 7 ao Df. As principais reações para Dp estavam entre 14,4 kDa e 31 kDa, e para Df, entre 14,4 kDa a 31 kDa e acima de 97,4 kDa, mostrando que alérgenos de baixo peso molecular são principais para cães sensíveis a Dp e Df, e alérgenos de alto peso molecular são principais somente para Df. Para avaliação dos alérgenos alimentares, realizou-se testes alérgicos de puntura e de contato, seguido de dieta restritiva em 21 cães com DA. Avaliou-se escala de prurido (pVAS) e score de CADESI-4 nos dias 0, 30 e 60. Os cães que apresentaram melhora dos sinais clínicos foram submetidos a teste de provocação (TP) para confirmar o diagnóstico de RAA. Dos 21 incluídos no estudo, 17 (81%) apresentaram melhora na escala de pVAS e CADESI-4 seguido de piora dos sinais clínicos após TP, sendo que em 94% o uso de medicação foi suspenso após dieta. A combinação dos testes apresentou valores de SE, SP, VPP e VPN de 80%, 66,7%, 66,7% e 80%, respectivamente, mostrando que os testes alérgicos de puntura e de contato, são bons guias para seleções dietéticas, auxiliando na detecção da RAA nos cães.

Palavras-chave: aeroalérgeno; trofoalérgeno; reação adversa a alimentos, alergia alimentar.

ABSTRACT

Atopic dermatitis (AD) is a chronic, pruritic, inflammatory disease with characteristic clinical features and associated with immunoglobulin-E (IgE) against environmental or food allergens. The diagnosis of the disease relies on a clinical approach and laboratory tests to detect allergic sensitization, such as intradermal (IDT) and prick tests that have been widely used to evaluate sensitization to environmental allergens. However, veterinary studies about food allergens are lacking. Patch testing has shown to be sensitive and a good aid in restrictive diet formulations for patients with suspected cutaneous adverse food reaction (CAFR), but the correlation of this test with prick test has not been elucidated so far. The most commonly implicated house dust mite allergens, which are important for precipitation of atopic eczema in dogs, are *Dermatophagoides pteronyssinus* (DEP) and *Dermatophagoides farinae* (DEF). Identifying their allergens is critical to standardization of allergy tests and to clinical response to immunotherapy protocols. The aim of this study was to evaluate the occurrence of mite and food sensitization in atopic dogs, as well as to identify the main DEP and DEF allergens involved in allergic sensitization, and the correlation of the use of prick and patch allergic tests for CAFR diagnosis in dogs. To evaluate sensitivity to mites, 31 dogs with AD *stricto sensu* were submitted to ITD and serological test (Heska®) and all with sensitivity to at least one of the mites tested in both tests were enrolled in the study. SDS-PAGE was then performed, followed by immunoblotting, to detect the bands. Of the 14 dogs enrolled in the study, 12 reacted to DEP and 7 to DEF. The main reactions for DEP were between 14.4 kDa and 31 kDa, and for DEF, were between 14.4 kDa and 31 kDa and above 97.4 kDa, showing that low molecular weight allergens are major allergens for dogs sensitive to DEP and DEF; and high molecular weight allergens are major allergens only for DEF. For the evaluation of food allergens as extrinsic factors in AD, allergic prick and patch tests were performed on 38 dogs, followed by a restrictive diet. Pruritus scale (pVAS) and CADESI-4 score were evaluated on days 0, 30 and 60. Dogs that presented clinical improvement underwent provocation test (PT) to confirm the diagnosis of CAFR. Twenty-one dogs were included in the study. Of these, 17 (81%) showed pVAS scale and CADESI-4 improvement, followed by worsening of clinical features after PT, and in 94% of the dogs, medication use was suspended after diet. The combination of the tests presented SE, SP, PPV and NPV values of 80%, 66.7%, 66.7% and 80%, respectively, showing that prick and patch tests are good guides for dietary selection, assisting in the detection of CAFR in dogs.

Keywords: environmental allergen; food allergen; adverse reaction to food, food allergy.

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO E CONTEXTUALIZAÇÃO

1. DERMATITE ATÓPICA EM CÃES

A dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória de pele de origem genética, pruriginosa, crônica, com sinais clínicos característicos e geralmente associado a produção de imunoglobulina-E (IgE) contra alérgenos ambientais (Halliwell, 2006). Porém, devido a DA ser uma doença multifatorial que envolve defeitos de barreira cutânea, desregulação imunológica, disbiose e sensibilização alérgica, a formação de IgE alérgeno-específica não são pré-requisitos para o seu desenvolvimento (Nuttall et al., 2013).

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

Uma subdivisão da DA foi criada de acordo com o fator extrínseco da doença: “DA *stricto sensu*” (DA_{ss}), relacionada especificamente à sensibilização a alérgenos ambientais; “DA *lato sensu*” (DA_{ls}), relacionada ao eczema atópico em animais polissensibilizados a alimento e a alérgenos ambientais e “DA *simill*” caracterizada pela presença de eczema atópico sem correlação com produção de IgE alérgeno-específico (Pucheu-Haston et al., 2015).

Cães com DA manifestam sinais clínicos perenes e sofrem exacerbações sazonais, dependendo dos alérgenos envolvidos. O início da manifestação dos sinais clínicos varia entre seis meses e três anos de idade e, nos casos de início antes do primeiro ano de vida, 38-48% estão relacionados à sensibilização alimentar (Jackson et al., 2005; Picco et al., 2008).

O prurido é o principal sinal clínico da DA, sendo ele crônico, perene, alesional, intenso a grave, acompanhado ou não de infecções de pele de origem

bacteriana e/ou fúngica, bléfaró-conjuntivite e otite crônica bilateral, intermitente ou persistente. As lesões primárias associadas à DA consistem de pápulas e máculas eritematosas, porém, é comum o desenvolvimento de lesões secundárias como escoriações, alopecia autoinduzida e, com a cronicidade, hiperqueratose, descamação e liquenificação (Olivry et al., 2010).

A distribuição das lesões varia de acordo com a cronicidade da doença e dos alérgenos precipitantes, mas geralmente envolve face, porção côncava dos pavilhões auriculares, condutos auditivos, superfície cervical ventral, inguinal, axilas, abdome, períneo, regiões flexurais e extremidade distal dos membros, principalmente os torácicos (Olivry et al., 2010) (Figura 1).

O diagnóstico de DA é realizado através do histórico e dos sinais clínicos conjugados à exclusão de outras dermatopatias pruriginosas de origem infectoparasitária e alérgica (Nuttall et al., 2019) e caso o animal apresente ao menos cinco ou seis, dos oito critérios abaixo, estabelecidos por Favrot et al. (2010):

- a. Início dos sinais clínicos entre seis meses e três anos de idade;
- b. Redução do prurido após uso de corticosteroides;
- c. Cão domiciliado;
- d. Presença de otite externa;
- e. Interdígitos afetados;
- f. Prurido primário;
- g. Bordas das orelhas não afetadas;
- h. Região dorsolombar não afetada.

Testes alérgicos cutâneos e/ou sorológicos não são diagnósticos de DA, podendo ser utilizados para identificar os possíveis alérgenos relacionados com o desencadeamento dos sinais clínicos (Hensel et al., 2015).



Figura 1: Topografia lesional da dermatite atópica. A. Periocular; B. Interdigital de membros torácicos; C. Axilas; D. Perioral; E. Abdome e virilha; F. Perianal; G. Flexura anticubital; H. Porção côncava dos pavilhões auriculares; I. Superfície cervical ventral.

Fonte: arquivo pessoal.

1.1 Alérgenos ambientais e alimentares

Os alérgenos dos ácaros da poeira doméstica (APD), mais comumente *Dermatophagoide farinae* e *D. pteronyssinus*, são considerados importantes alérgenos ambientais relacionados com DA em humanos e cães (Schildt et al.,

2017) e respondem pela sensibilização alérgica em 30 a 100% dos casos (Randall et al., 2003).

D. farinae é encontrado em climas continentais secos (Nuttall et al., 2006), o *D. pteronyssinus* é vulnerável a flutuações de umidade (Arlian e Morgan, 2003), sendo predominante em países de clima temperado e tropical (Nuttall et al., 2006).

Alérgenos principais ou 'major' são definidos como aqueles reconhecidos por mais que 50% do soro de pacientes alérgicos, e alérgenos secundários ou 'minor' são aqueles reconhecidos por menos que 50% dos pacientes (Thomas et al., 1998).

Os principais alérgenos descritos em cães com DA são oriundos de enzimas digestivas ou de proteínas ligadoras (Bessot e Pauli, 2011), sendo eles: Der p 1 (25 kDa) e Der p 2 (14 kDa), provenientes do *D. pteronyssinus*, e Der f 1 (25 kDa), Der f 2 (14 kDa), Der f 10 (37 kDa), Der f 15 (98 kDa), Der f 18 (60 kDa), Zen 1 (188 kDa) provenientes do *D. farinae* (Noli et al., 1996; Mccall et al., 2001; Weber et al., 2003; Tsukui et al., 2008).

Em humanos, Der p 1, Der p 2 e, recentemente, o Der p 23 (14 kDa) são considerados alérgenos principais (Weghofer et al., 2013), sendo que o Der p 23 é mais prevalente em crianças com asma moderada a grave (Jiménez-Feijoo et al., 2019). Em veterinária ainda não foi identificada sensibilização a esse alérgeno.

Os alérgenos alimentares (trofoalérgenos) capazes de induzir resposta de hipersensibilidade geralmente são proteínas (Commins, et al., 2009). Assim, carboidratos podem desencadear alergia quando conjugados às proteínas (glicoproteínas) (Roitel et al., 2017). Trofoalérgenos são tipicamente solúveis em água, estáveis ao calor, resistentes a proteases digestórias e possuem peso molecular maior de 10 kDa (Verlinden et al., 2006).

Em humanos, um pequeno número de proteínas é responsável por grande parte das reações alérgicas (Tabela 1). Em cães, os alimentos mais comumente causadores de reações são a carne bovina, derivados lácteos, frango e o trigo (Roudebush, 2013; Mueller et al., 2016).

Tabela 1: Principais alérgenos alimentares no ser humano:

Alérgeno	Fonte de alimento
<i>Proteína animal</i>	
Caseína	Leite
Tropomiosina	Crustáceos e moluscos
'EF-hand proteína' ex: parvoalbumina	Peixe
<i>Proteína vegetal</i>	
Bet v 1 superfamília	Fruta, soja e vegetais
Superfamília Cupin	Nozes, legumes e sementes
Superfamília Prolamina	Cereais, frutas e vegetais
Cisteína protease família C1	Soja e kiwi
Profilina	Frutas, vegetais e legumes

Fonte: Adaptado de Noli et al., 2014

1.3 Patofisiologia da doença

Cães com DA possuem uma barreira epidérmica defeituosa devido à redução na expressão de lipídios no estrato córneo, especialmente ceramidas, além de alteração na expressão de filagrina, o que conduz à maior perda transpidérmica de água (Santoro et al., 2015). Provavelmente esses defeitos permitam uma maior aderência microbiana e desenvolvimento de disbioses, penetração de proteínas alergênicas e início de respostas inflamatórias e imunoalérgicas anormais (Nuttall et al., 2019).

Assim como em humanos, cães com DA apresentam hiper-reatividade imunológica (Nuttall et al., 2019). O aumento da penetração dos alérgenos através da pele leva à captação, processamento e sua apresentação pelas células de Langerhans através do complexo principal de histocompatibilidade classe II, aos linfócitos T_H0 , e sua diferenciação para células T_H2 (Sehra et al., 2016).

Nos quadros agudos da doença a resposta imunológica predominante é a T_H2 , e envolve citocinas como IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IL-31 (Marsella et al., 2012; Olivry et al., 2016). Numa fase crônica da doença, devido a polissensibilização e disbioses, além da resposta T_H2 , há também envolvimento de células T_H1 , T_H17 e T_H22 (Olivry et al., 2016).

1.4 Reação adversa a alimentos

A reação adversa a alimentos (RAA) em cães já é descrita desde o século passado (Pomeroy, 1934; Walton, 1967) e incluem alergia alimentar e intolerância alimentar. A alergia alimentar, ou hipersensibilidade alimentar (HA,) é descrita como um efeito adverso à saúde, decorrente de uma resposta imune específica, que ocorre após a exposição a um determinado alimento, podendo ser uma resposta IgE mediada, não IgE ou combinação de ambas (Burks et al., 2012; Bhagat et al., 2017). Por outro lado, a intolerância alimentar ocorre por respostas a componentes alimentares farmacologicamente ativos, como histaminas, reação a toxinas ou processos de indigestibilidade e alterações na motilidade e secreção do trato digestório (Boyce J. et al., 2010) (Tabela 2).

Tabela 2: Definições utilizadas para diferenciar os tipos de reações adversa ao alimento.

Definições	
<i>Reação adversa a alimentos</i>	Qualquer resposta clinicamente anormal correlacionada à ingestão de alimentos ou aditivos alimentares.
<i>Intolerância alimentar</i>	Resposta fisiológica anormal ao alimento sem envolvimento imunológico.
<i>Hipersensibilidade alimentar</i>	Reação adversa ao alimento imunologicamente mediada.

Fonte: a autora, 2019

Apesar da grande exposição aos diversos antígenos alimentares, apenas uma pequena porcentagem de indivíduos desenvolve hipersensibilidade ao alimento (Chehade e Mayer, 2005; Marsella et al., 2012), porque uma resposta imunológica normal às proteínas alimentares está associada com a adequada indução de tolerância oral. Quando ocorre uma falha nessa tolerância, pode resultar no desenvolvimento de HA (Wang e Sampson, 2011).

Um trato intestinal danificado permite a penetração excessiva de alérgenos alimentares, levando a uma sobrecarga do sistema fagocítico mononuclear do intestino. Isso combinado com a predisposição genética à hiper-reatividade,

pode levar ao desenvolvimento de hipersensibilidade a alérgenos alimentares (Marsella et al., 2012). Evidências demonstram que a sensibilização ao alimento também pode ocorrer por via epicutânea em pacientes atópicos, os quais possuem uma função de barreira cutânea prejudicada (Lack, 2012).

As hipersensibilidades alimentares em humanos comumente são relacionadas com reações do tipo I (IgE-mediadas), e desencadeiam reações semelhantes àsquelas descritas pelos alérgenos de ácaros, com produção de IgE e sensibilização mastocitária, levando à liberação de histamina, proteases, leucotrienos e prostaglandinas (Verlinden et al., 2006; Bhagat et al., 2017). Esses mecanismos ocorrem em minutos ou poucas horas após a exposição e podem levar a reações anafilactoides como urticária, angioedema e até choque anafilático (Pali-Scholl et al., 2017) acometendo a pele e os sistemas gastrintestinal (GI) e respiratório. Em indivíduos com dermatite atópica reações mediadas por células ou reações mistas (IgE e não IgE-dependentes) podem ser observadas e os sinais clínicos geralmente ocorrem dias após exposição ao alimento (Wang e Sampson, 2011; Lack, 2012).

Em cães, já foi demonstrada presença de IgE sérico específico para alimentos sendo considerado um indicador de hipersensibilidade do tipo I. No entanto, estudos não demonstraram correlação da presença de IgE sérico com alteração clínica, após a exposição ao alérgeno ofensor (Mueller e Olivry, 2017). Em adição, células dentríticas podem liberar IL-12, para ativar os linfócitos T_H0 em T_H1 , e iniciar uma resposta tardia, mediada por células a alimentos, que podem ocorrer após horas ou até 2-3 dias da ingestão do alérgeno (Verlinden et al., 2006). Clinicamente, podem apresentar-se como prurido ou diarreia e, histologicamente, ser associadas a um infiltrado linfocítico, plasmocítico e mastocítico (Mueller e Unterer, 2018).

Os sinais gastrintestinais normalmente vistos nesses pacientes são diarreia, vômitos, tenesmo, fezes amolecidas, flatulência, aumento do peristaltismo intestinal (Picco et al., 2008; Favrot et al., 2010; Hensel et al., 2015), e fístula perianal (Proverbio et al., 2010). Além desses, a presença de vômitos e diarreia intermitentes e sinais de colites ou borborigmos foram associados em 50 a 60% dos cães com HA (Jackson, 2007).

O principal sinal clínico cutâneo observado em cães com dermatite atópica que desenvolvem alergia alimentar é o prurido crônico, que se apresenta

de forma grave, normalmente não responsivo a corticosteroides (Picco et al., 2008) e que, em 47% dos casos pode ser sua única manifestação (Favrot et al., 2010), ou estar associados a outros sinais primários, como pápulas e eritema, podendo evoluir para sinais secundários, como alopecia autoinduzida, crostas, escoriação e erosão. Em pacientes com resposta a antígenos alimentares mediada por células do tipo T_H1 , além do prurido crônico, a disqueratose e a liquenificação tegumentar são comumente observados. As dermatites piotraumáticas, a piodermite superficial bacteriana, a dermatite por *Malassezia* spp., as otites externas e as pododermatites são complicações comuns (Proverbio et al., 2010; Hensel et al., 2015).

Cães com HA apresentam até três vezes mais otites quando comparados com animais não afetados (Proverbio et al., 2010), sendo a prevalência da otite externa crônica, nesses animais, variável e estudos mostram prevalência entre 26 até 80% (Chesney, 2002; Loeffler, et al., 2006; Picco et al., 2008; Favrot et al., 2010; Proverbio et al., 2010).

Até o presente momento não há testes laboratoriais disponíveis para confirmar a presença de HA nos cães (Hensel et al., 2015; Olivry et al., 2015; Johansen et al., 2017). Assim, a confirmação da HA deve ser realizada por meio de dieta restritiva pelo período de 5 a 8 semanas, seguida de teste de provocação com o alimento ofensor (Olivry, et al, 2015).

A HA é diagnosticada quando ocorre melhora parcial ou total dos sinais clínicos de prurido após dieta restritiva pelo período de 5 – 8 semanas. Nos cães com HA, deve ocorrer recorrência dos sinais clínicos após teste de provocação com o alimento ofensor em até 14 dias (Rosser, 1993; Olivry, et al, 2015). As dietas restritivas podem incluir dietas caseiras, composta por fonte inédita de proteína e de carboidrato ao animal, ou por meio de ração comerciais hidrolizadas ou ultra-hidrolizadas.

O objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência da sensibilização aos ácaros e aos alimentos em cães com DA, bem como identificar os principais alérgenos de Dp e Df envolvidos na sensibilização dos cães e a correlação do uso dos testes alérgicos de puntura e contato para diagnóstico de RAA em cães.

CAPÍTULO 2

(Artigo científico a ser submetido para publicação no periódico *Veterinary Immunology and Immunopathology*)

IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE SENSIBILIZAÇÃO A ALÉRGENOS DE *DERMATOPHAGOIDES* SPP. EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA

JULIANE POSSEBOM^a; VICTOR ESPÍRITO SANTO CUNHA^b; MARCIA ELIZABETH KEIM MAGHELI LIMA^a; MARCONI RODRIGUES DE FARIAS^a

^a Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, Rua Imaculada Conceição, 1155, 80215-901 Curitiba-PR, Brasil.

^b FDA Allergenic, Rua Abolição, 413, 20755-170, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Correspondência:

Marconi Rodrigues de Farias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, Rua Imaculada Conceição, 1155, 80215-901 Curitiba-PR, Brasil.

E-mail: marconi.puc@terra.com.br

Conflitos de interesse:

Não há conflitos de interesse no desenvolvimento deste estudo.

Highlights

- Cães com dermatite atópica são sensíveis a ácaros da poeira doméstica.
- Alérgenos de alto peso molecular são alérgenos principais de cães.
- Cães sensíveis a *Dermatophagoides farinae* e *Dermatophagoides pteronyssinus* reagem a proteínas de baixo peso molecular.

RESUMO

Introdução: Alérgenos de ácaros da poeira doméstica (APD) são causa comum de sensibilização e de precipitação de eczema em cães com dermatite atópica (DA). As principais espécies de ácaros da poeira domiciliar em regiões de clima tropical e subtropical são *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e *Dermatophagoides farinae* (Df). A identificação dos seus alérgenos é fundamental para padronização de testes intradérmicos (IDT) e resposta a imunoterapia.

Objetivos: O objetivo desse estudo foi avaliar a frequência da sensibilização aos APD e identificar os principais alérgenos de Dp e Df envolvidos na sensibilização de cães com DA *stricto sensu*.

Métodos: Foram selecionados 31 cães com DA *stricto sensu*, os quais obedeciam pelo menos seis dos oito critérios de Favrot (2010), não apresentaram melhora dos sinais clínicos após exclusão de outras dermatopatias pruriginosas e após dieta com proteína original por oito semanas. Todos estes cães foram submetidos a IDT e a teste sorológico (Heska®) e foram incluídos no estudo os cães que apresentaram sensibilidade a pelo menos um dos ácaros testados em ambos os testes. Com o soro dos cães, foi realizado SDS-PAGE, usando gel de poliacrilamida a 15%, seguido de *immunoblotting*, utilizando anti-IgE canina monoclonal.

Resultados: Quatorze cães com DA foram incluídos no estudo, outros 17 não reagiram aos ácaros em ambos os testes. Destes 14 cães, 12 reagiram a Dp e 7 ao Df. Dos cães sensíveis a Dp, 6 (50%), 10 (83%) e 9 (75%) reagiram a bandas com pesos moleculares próximo a 14,4 kDa, 21,5 kDa e entre 21,5 a 31 kDa, respectivamente. Nos cães sensibilizados ao Df, 5 (71%) reagiram a bandas até 31 kDa, 3 (43%) a bandas entre 45 e 66,2 kDa e 4 (57%) a bandas acima de 97,4 kDa.

Conclusão e relevâncias clínicas: Os cães com DA são mais sensibilizados ao ácaro Dp e seus alérgenos de baixo peso molecular são os principais responsáveis pela sensibilização, considerados como alérgenos principais. Por outro lado, para Df houve sensibilização tanto para alérgenos de baixo quanto de alto peso molecular na população estudada.

Palavras-chave: Ácaros da poeira doméstica; Alérgenos; Teste intradérmico; Teste Sorológico.

Abreviações:

DA – Dermatite atópica

APD – Ácaros da poeira doméstica

Df – *Dermatophagoides farinae*

Dp – *Dermatophagoides pteronyssinus*

SOROL – Teste sorológico

MW – Peso molecular

IDT – Teste alérgico intradérmico

URA – Umidade relativa do ar

INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) é definida como uma doença tegumentar inflamatória, pruriginosa, crônica, que envolve alterações genéticas complexas que conduzem à disfunção de barreira epidérmica e à hiper-reatividade imunológica (Gonzales et al., 2013), geralmente associadas à produção de anticorpos IgE contra alérgenos ambientais (Hensel et al., 2015).

Os alérgenos dos ácaros da poeira doméstica (APD), mais comumente o *Dermatophagoides farinae* (Df) e *D. pteronyssinus* (Dp), são considerados importantes alérgenos ambientais relacionados com DA em humanos e cães (Schildt, et al., 2017)

Alérgenos principais são definidos como alérgenos reconhecidos por mais de 50% dos soros de pacientes alérgicos, enquanto alérgenos secundários são aqueles reconhecidos por menos de 50% dos pacientes (Thomas et al., 1998).

Os principais alérgenos de ácaros associados à sensibilização em cães com DA são oriundos de enzimas digestivas ou de proteínas ligadoras (Bessot e Pauli, 2011), sendo eles: Der p 1 (25 kDa) e Der p 2 (14 kDa), provenientes do Dp; e Der f 1 (25 kDa), Der f 2 (14 kDa), Der f 10 (37 kDa), Der f 15 (98 kDa), Der f 18 (60 kDa), Zen 1 (188 kDa) provenientes do Df (Noli et al., 1996; Mccall et al., 2001; Weber et al., 2003; Tsukui et al., 2008).

Na Europa Ocidental e nos Estados Unidos o Der f 2 é considerado um alérgeno secundário (Nuttall et al., 2001; Olivry et al., 2017), porém estudos mostram o Der f 2 como alérgeno principal no Japão (Yamashita et al., 2002), Espanha (Moya et al., 2016) e Inglaterra (Patel et al., 2019).

Em humanos, Der p 1 e Der p 2 são considerados os principais alérgenos associados à sensibilização e precipitação de rinite e asma alérgica (Weghofer et al.,

2013). Entretanto, o Der p 23 (14 kDa) tem sido recentemente descrito como causa de sensibilização e asma moderada a grave em crianças (Jiménez-Feijoo et al., 2019). Em medicina veterinária, a sensibilização a este alérgenos em cães com DA ainda não foi identificada.

No sul do Brasil, o Der p 1 é o principal alérgeno encontrado na poeira domiciliar no microambiente de cães com dermatite atópica, quando comparado a Der f 1 e Blo t 5 (Assunção et al., 2014).

Como DA em cães é uma doença de alta ocorrência e que não apresenta cura, apenas controle, a identificação precisa de quais alérgenos de ácaros participam da sensibilização e do desenvolvimento de prurido é um passo importante para orientações de controles ambientais e desenvolvimento de testes alérgicos *in vitro* e *in vivo* mais precisos, o que subsidia protocolos de imunoterapia mais eficientes e melhoria na qualidade de vida dos pacientes (Cunha et. al, 2012).

O objetivo desse estudo foi avaliar a ocorrência da sensibilização e identificar os principais alérgenos de Dp e Df envolvidos na sensibilização de cães com DA.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo transversal, não pareado, com amostra sistematizada e não randomizado.

Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR) sob o registro de número 833, na data 12 de dezembro de 2013.

Critérios de inclusão

Cães com histórico de prurido crônico, primário e perene, diagnosticados com DA pelos critérios estabelecidos por Favrot et al. (2010), após exclusão de outras dermatopatias pruriginosas. Todos foram submetidos à dieta restritiva com proteína original por seis a oito semanas, sendo incluídos no estudo apenas cães que não apresentaram melhora parcial ou total dos sintomas após a dieta restritiva

Todos os animais do estudo foram submetidos a testes alérgicos intradérmico (IDT) e sorológico e foram incluídos apenas os cães que apresentaram reação em ambos os testes a pelo menos um dos ácaros testados.

Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo os cães com DA que apresentaram:

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

Teste alérgico intradérmico

Para a realização do IDT foi utilizado como controle negativo solução salina fenolada e, como controle positivo, solução contendo 0,1 mg/mL de histamina base, conforme estudo prévio de limiar irritativo (Ferreira et al., 2016). Os extratos para teste alérgico foram produzidos pela FDA-Allergenic (Laboratório de Antígenos, Rio de

Janeiro, Brasil) a partir do corpo total de ácaros e possuíam concentrações de 100 UBE/mL.

O IDT foi realizado conforme estabelecido por Hillier e DeBoer (2001), e sua interpretação foi objetiva, sendo considerado resultado positivo as reações papulares no local da aplicação com média igual ou superior ao valor do ponto de corte calculado para cada paciente.

Teste sorológico alérgeno-específico

Amostras de soro dos cães foram avaliadas no laboratório TECSA (MG, Brasil), para determinar sensibilidade aos ácaros Dp e Df pelo método de ELISA através do teste sorológico Allercept® (HESKA – Suíça), que utiliza a fração FceR1-alfa como reagente identificador de IgE alérgeno-específica.

Os soros dos cães foram diluídos na proporção de 1:6 com ácido peracético (TRIS-HCL). Dessa diluição de soro, foram adicionados 100mcL em cada poço da placa, que permaneceu refrigerada em câmara úmida durante a noite.

Após esse período, a solução de TRIS-HCL foi utilizada para lavagem e foi adicionada solução contendo a fração FceR1-alfa diluída em ácido peracético. A placa foi mantida em câmara úmida, à temperatura ambiente (22°C), por 120 minutos e nova lavagem foi realizada.

Adicionou-se solução de TRIS-HCL e streptavidina-FA à placa, que foi mantida à temperatura ambiente, em câmara úmida novamente, por mais 60 minutos. Uma série de quatro lavagens consecutivas foram realizadas, com ácido peracético, e foi adicionado o substrato p-NPP (para-nitrofenilfosfato). A placa foi mantida por mais 60 minutos protegida da luz. Usou-se então solução de bloqueio da reação, à base de

cisteína, e foi realizada a leitura imediata em espectrofotômetro, com filtro de 405nm. Foram consideradas reações positivas maiores ou iguais a 150 unidades.

Immunoblotting

Os extratos alergênicos foram filtrados e concentrados, por meio do Amicon YM 10, em uma membrana de nitrocelulose, com poros para separação de proteínas com peso molecular acima de 10 kDa. Os extratos de Dp e Df foram separados usando SDS-PAGE a 15% (Laemmli, 1970) e transferidos para membrana de nitrocelulose (Milipore), com poros de 0,45 µm, através do sistema *Trans-Blot SD Semi Dry Transfer Cell* (Bio-Rad). Utilizou-se 10µL de padrão de peso molecular (Biotinylated SDS PAGE Standards, Low Range, Bio-Rad). A membrana foi umedecida com tampão de transferência (Tris 15.6mM, glicina 120 mM e metanol 20%) e as proteínas foram transferidas a 200 V por 1 hora.

As membranas foram bloqueadas com leite em pó (Merck, Doremstadt, Germany) a 3% em solução salina tamponada com fosfato contendo Tween (PBS/Tween), sob agitação durante uma hora e, em seguida, incubadas com o soro de cão (1:5) à temperatura ambiente, por uma hora, sob agitação. Após lavagem com PBS/Tween, as membranas foram incubadas com conjugado anti-IgE monoclonal de cão (diluição 1:10.000) durante a noite, a 4°C e sob agitação. Em seguida foram novamente lavadas com PBS/Tween e adicionada estreptavidina (Mediwiss Alanytic GmbH), permanecendo sob agitação por mais 30 minutos. Logo após, a membrana foi exposta ao substrato Farbstoff BCIP/NBT (Mediwiss Alanytic GmbH) durante cinco minutos para detecção das bandas de proteínas.

Análise estatística

Os dados populacionais foram apresentados descritivamente em porcentagens, de acordo com as variáveis de sexo e raça, enquanto a idade dos pacientes foi descrita em média com desvio padrão.

A proporção de animais reagentes a Dp ou Df foi comparadas usando teste de proporção de amostra única, com α e intervalo de confiança definidos a $<0,05$ e 95%, respectivamente (Moore et al., 2012).

As reações aos alérgenos Dp e Df observadas em imunoblotting foram apresentadas descritivamente em valores absolutos de bandas com diferentes pesos moleculares (reações) e de animais reagentes. Estes dados foram avaliados para normalidade por meio do teste de Shapiro_Wilk (Shapiro e Wilk, 1965). Para determinar as bandas moleculares mais frequentemente observadas, foi aplicado o teste não paramétrico Q de Cochran, que permite inferência na comparação de respostas múltiplas não mutuamente exclusivas (Jann, 2005). Subsequentemente, como *post hoc*, foi aplicado o teste não paramétrico de McNemar com correção de Bonferroni, permitindo inferência sobre os pares de bandas com pesos moleculares significativamente diferentes (Jann, 2005). Ambos os testes foram calculados com $\alpha <0,05$ e 95% de intervalo de confiança.

A análises foram realizadas no software STATA 14, version 14 (College Station, Texas, USA).

RESULTADOS

Epidemiologia

Dos 31 cães selecionados inicialmente, 14 (45,2%) obedeceram aos critérios de inclusão e foram mantidos no estudo, sendo que 6 (43%) cães eram machos e 8 (57%) eram fêmeas. A idade média foi de 5 anos e desvio padrão de 3 anos e 6 meses.

A raça mais representada foi o Labrador (4/29%), os outros 10 (71%) cães eram das raças Lhasa Apso, Pinscher, Shar-pei, Shih-tzu, Poodle, Terrier brasileiro e Beagle.

Dos 14 cães testados, 12 (86%) cães foram sensíveis ao Dp e 7 (50%) ao Df em ambos os testes, tendo maior proporção de pacientes reagentes a Dp em relação a Df ($p=0,02$). Desses 14 cães, 5 (36%) foram sensíveis para os dois ácaros (Tabela 1).

Tabela 1: Relação dos animais selecionados, correlacionando a raça, idade (em anos), sexo e os resultados dos testes alérgicos realizados. Dp: *Dermatophagoides pteronyssinus*; Df: *Dermatophagoides farinae*; IDT: teste intradérmico; SOROL: teste sorológico; pos: positivo; neg: negativo

Animal	Raça	Idade	Sexo	Dp		Df	
				IDT	SOROL	IDT	SOROL
1	Beagle	3	M	neg	pos	pos	pos
2	Shih-tzu	2	F	pos	pos	pos	pos
3	Poodle	4	F	pos	pos	pos	neg
4	Labrador	5	F	pos	pos	neg	pos
5	Shar pei	3	F	pos	pos	neg	neg
6	Lhasa apso	11	M	pos	pos	neg	neg
7	Pincher	4	M	pos	pos	neg	pos
8	Lhasa apso	3	F	pos	pos	pos	pos
9	Labrador	12	F	pos	pos	neg	pos
10	Terrier brasileiro	2	M	pos	pos	pos	pos
11	Labrador	8	F	pos	pos	pos	pos
12	Pinscher	9	F	pos	pos	neg	pos
13	Shar pei	3	M	pos	pos	pos	pos
14	Labrador	1	M	neg	pos	pos	pos

Fonte: a autora, 2019.

Immunoblotting

Bandas de reações aos alérgenos de Dp e Df foram detectadas em 11 e 7 cães respectivamente. Dos cães sensibilizados ao Dp, foram detectadas 28 reações, as

bandas mais reconhecidas estavam entre os pesos moleculares de 14,4 kDa, 21,5 kDa e entre 21,5 – 31 kDa, $Q=71,25$ (12), $p<0,001$ (Tabela 2) (Figura 1). Dos cães sensibilizados ao Df, 31 reações foram detectadas, sendo os intervalos de 21,5 – 31 kDa e acima de 97,4 kDa, os mais relevantes, $Q=33,64$ (12), $p=0,001$ (Tabela 2) (Figura 2).

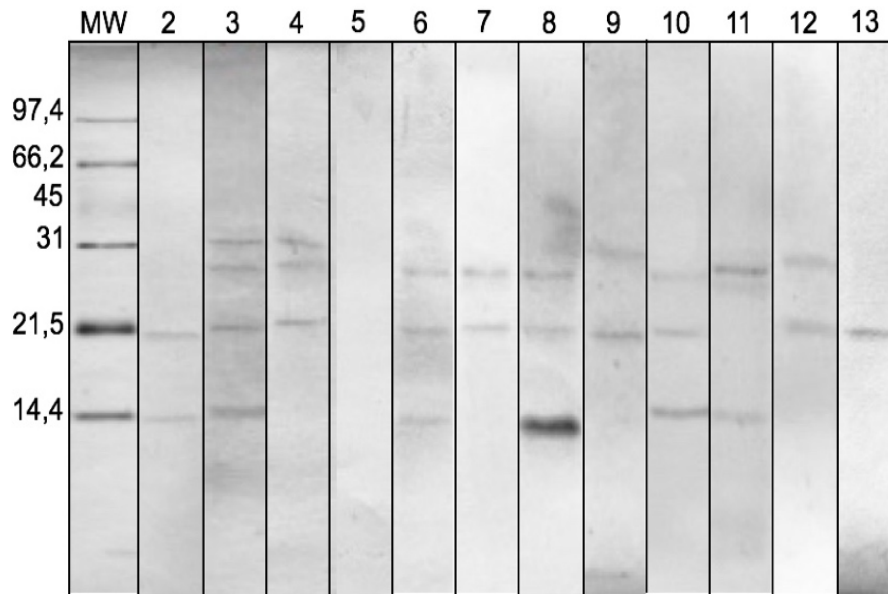


Figura 1: Immunoblot (anti-IgE) de extrato de *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), em soros de 12 cães com dermatite atópica, alérgicos a Dp. MW: peso molecular padrão (kDa). Nenhuma reação é vista no paciente 5.

Fonte: arquivo pessoal.

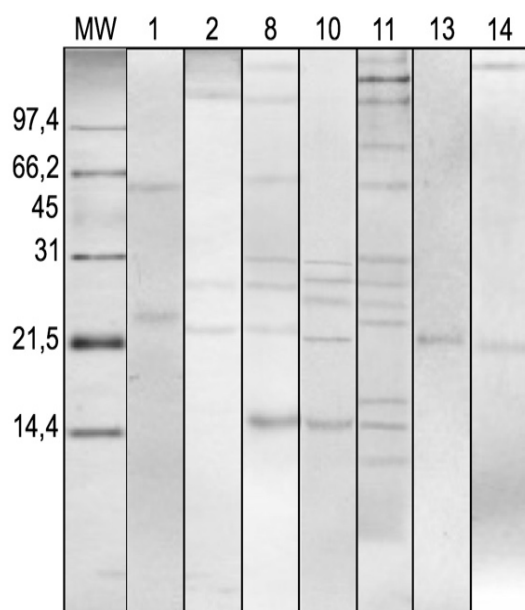


Figura 2: Immunoblot (anti-IgE) de extrato de *Dermatophagoides farinae* (Df) em soros de 7 cães com dermatite atópica, alérgicos a Df. MW: peso molecular padrão (kDa).

Fonte: arquivo pessoal.

Tabela 2: Peso molecular das proteínas reagentes para ácaros *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp) e *Dermatophagoides farinae* (Df) pelo Immunoblotting em 14 cães com DA, apresentadas em valores absolutos e porcentagem.

Padrão peso molecular (kDa)	Dp		Df	
	Reações (N=28)	Cães (N=11)	Reações (N= 31)	Cães (N=7)
< 14,4	0	0	1 (3%)	1 (14%)
14,4 ^a	6 (21%)	6 (55%)	3 (10%)	3 (43%)
14,4 - 21,5	0	0	1 (3%)	1 (14%)
21,5 ^{ab}	10 (36%)	10 (91%)	5 (16%)	5 (71%)
21,5 - 31 ^{ab}	10 (36%)	9 (91%)	8 (26%)	5 (71%)
31	2 (7%)	2 (18%)	3 (10%)	3 (43%)
31,1 - 45	0	0	0	0
45	0	0	0	0
45 - 66,2	0	0	3 (10%)	3 (43%)
66,2	0	0	0	0
66,2 - 97,4	0	0	1 (3%)	1 (14%)

97,4	0	0	0	0
> 97,4 ^b	0	0	6 (19%)	4 (57%)

^a DEP: Significativamente diferente das demais bandas, encontradas em menor quantidade ou ausentes, após *post hoc* teste de MacNemar com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

^b DEF: Tendência a diferença significativa às demais bandas, encontradas em menor quantidade ou ausentes, após *post hoc* teste de McNemar com correção de Bonferroni ($p=0,07$).

Fonte: a autora, 2019.

DISCUSSÃO

Os testes alérgicos dos cães com DA, sorológico e IDT mostraram maior sensibilidade a Dp, em relação a Df, frequência que pode ser justificada pelo clima prevalente no sul do Brasil, onde a média anual de temperatura é de 17°C e a umidade relativa do ar (URA) é de 80% (SIMEPAR, 2019), que são propícios para a proliferação desses ácaros.

No presente estudo, foi identificado que 55% e 43% dos cães sensíveis ao Dp e Df, respectivamente, reconheceram uma banda com peso molecular próximo a 14,4 kDa possivelmente Der p 2 e Der f 2. Em 91% dos cães sensíveis ao Dp foram reconhecidos alérgenos entre 21,5 a 31 kDa, o que é sugestivo de ser o Der p 1.

Esta frequente sensibilização a alérgenos de baixo peso molecular pode ser explicada pelo fato de que estes mais facilmente podem transpor a epiderme em cães com dermatite atópica, os quais já apresentam defeitos de barreira tegumentar (Nuttall et al., 2013). Em adição, isto pode favorecer sua fagocitose e processamento pelas células de Langerhans, suscitando uma estimulação à resposta Th2 e consequente produção de IgE (Morris, 2010; Jacquet, 2013).

O Der p 1 é o principal alérgeno encontrado na poeira domiciliar no microambiente de cães com dermatite atópica no sul do Brasil, quando comparado a

Der f 1 e Blo t 5, com maior concentração média no tapete (2,18 µg/g), seguido do sofá (1,53 µg/g) e da cama (1,14 µg/g) (Assunção et al., 2014).

Em relação aos alérgenos do grupo 2, cerca de 43 a 100% dos cães com DA apresentaram anticorpos IgE contra Der f 2 (Masuda et al., 1999 e Yamashita et al., 2002; Moya et al., 2016; Patel et al., 2019). No Brasil, 92% dos cães com DA são sensibilizados para Df, e desses, 56% apresentavam IgE específico para Der f 2 (Ludwig, 2019).

É importante ressaltar que ácaros de Df e Dp apresentam reações cruzadas entre si (Saridomichelakis et al., 2008) e evidências mostram que a homologia de Der f 2 e Der p 2 chega a 88% (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; Masuda et al., 1999; Smith et al., 2001).

No presente estudo, 55% dos cães reagiram a alérgenos com 14,4 kDa. Recentemente, o Der p 23, um alérgeno presente na porção final do intestino dos ácaros e que possui uma alta atividade antigênica (Weghofer et al., 2013) foi identificado, sequenciado e considerado um alérgeno principal em humanos, com peso molecular de 8 kDa, porém no SDS-PAGE foi reconhecido como uma banda de 14 kDa.

Em humanos, foi demonstrada correlação de asma persistente moderada/grave em crianças sensibilizadas a Der p 23 (Jiménez et al., 2019). Devido a sua alta antigenicidade, esse alérgeno pode ser um iniciador da alergia a ácaros e, uma vez estabelecida a sensibilização ao Der p 23, inicia-se a sensibilidade a outros alérgenos.

Reações a alérgenos de Df, de peso molecular próximo a 60 kDa, foram observadas em 43% dos cães no presente estudo, sugerindo Der f 18 (60 kDa) (Weber

et al., 2003) e, mais da metade dos animais reagiram a duas bandas superiores a 97,4 kDa. Como o Der f 15 apresenta bandas homólogas de 98 kDa e 109 kDa (McCall et al. 2001), possivelmente, estas foram reconhecidas nesse estudo. Ambos os alérgenos são pertencentes ao grupo de proteínas enzimáticas homólogas à quitinase de insetos e foram detectadas no sistema digestório do ácaro e não em suas fezes (McCall et al. 2001; Weber et al., 2003).

Recentemente, o Zen 1, um alérgeno de peso molecular de 188 kDa (variando de 150 a 250 kDa) e de função desconhecida (Tsukui et al., 2008; Olivry et al., 2017) foi descrito como um alérgeno principal nos Estados Unidos, França, Suíça e Inglaterra (Olivry et al., 2017; Patel et al., 2019). Um estudo no Brasil demonstrou que 77% dos cães com DA apresentam IgE específico para Zen 1 (Ludwig, 2019). Este alérgeno divide epítomos conformacionais de superfície com Der f 15 e, como estes convergem em porções altamente O-glicosiladas, é possível que apresentem reações cruzadas (Olivry et al., 2017).

Em conclusão, os cães com DA no sul do Brasil são frequentemente sensibilizados aos alérgenos de baixo peso molecular do Dp, sendo estes considerados alérgenos principais nestes animais, enquanto que para Df, há frequente sensibilização, tanto para alérgenos de baixo, quanto de alto peso molecular na população estudada.

FINANCIAMENTO:

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Governo Federal, bolsa de estudos para a pós-graduação *stricto sensu*. Brasília, Distrito Federal, Brasil.

REFERÊNCIAS

Assunção, D., Farias, M., Barbosa, M., Machado, L., 2017. Evaluation of the concentration of allergens from mites in fur and households dust of dogs with atopic dermatitis. *Pesq Vet Bras.* 37, 41-46.

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

Cunha V.E.S., Silva M. H., Faccini J.L.H., 2012. Serological identification of house dust mite allergens in dogs with atopic dermatitis. *Pesq Vet Bras.* 32(9):917-921.

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

Ferreira, R., Ferreiro, L., Machado, M., Cunha, V., Farias, M., Antunes E. 2016. Evaluation of different concentrations of histamine and skin irritant threshold concentration for house dust mites and a storage mite in healthy dogs submitted to intradermal testing. *Vet Dermatol.* 27 (Suppl. 1), 6–121

Gonzales, A.J., Humphrey, W.R., Messamore, J.E., Fleck, T.J., Fici, G.J., Shelly, J.A., Teel, J.F., Bammert, G.F., Dunham, S.A., Fuller, T.E., Mccall, R.B., 2013. Interleukin-31: its role in canine pruritus and naturally occurring canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 24: 48–e12.

Hensel, P., Santoro, D., Favrot, C., Hill, P., Griffin, C., 2015. Canine atopic dermatitis: Detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res* 11, 196.

Hillier, A., DeBoer, D.J., 2001. The ACVD task force on canine atopic dermatitis. (XVII): intradermal testing. *Vet Immunol Immunopathol.* 81: 289–304.

Jacquet A., 2013. Innate Immune Responses in House Dust Mite Allergy. *ISRN Allergy*, 2013, 1-18

Jann, B. 2005. Tabulation of multiple responses. *The Stata Journal.* 5(1):92-122.

Jiménez-Feijoo, R., Pascal, M., Moya, R., Riggioni, C., Domínguez, O., Lózano, J., Álvaro Lozano M, Piquert M, Machinena A, Folque M, Dias M, Carnés J A M. Plaza. 2019. Molecular diagnosis in house dust mite allergic patients suggests clinical relevance of Der p 23 in asthmatic children. *J Investig Allergol Clin Immunol.*, 30(4).

Johannessen, B.R., Skov, L.K., Kastrup, J.S., Kristensen, O., Bolwig, C., Larsen, J.N., Spangfort, M., Lund, K., Gajhede, M., 2005. Structure of the house dust mite allergen Der f 2: implications for function and molecular basis of IgE cross-reactivity. *FEBS Lett.* 579:1208-1212.

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

Ludwig, L., 2019. Avaliação da sensibilidade ao extrato bruto de dermatophagoides farinae e seus alérgenos derivados, Der f 2 e Zen 1, em cães com dermatite atópica.

[Dissertação]. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Mestrado em Ciência Animal.

Masuda, K., Tsujimoto, H., Fujiwara, S., Kurata, K., Hasegawa, A., Yasueda, H., Yamashita, K., DeBoer, D., Weck, A., Sakaguchi M., 1999. 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.* 72, 303-313.

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

Moore, D.S.; McCabe, G.P.; Craig, B.A. 2012. Chapter 8: Inference for Proportion. In: *Introduction to the Practice of Statistics.* 7th edition, p.473-510.

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

Moya, R., Carnés, J., Sinovas, N., Ramió, L., Brazis, P., Puigdemont, A., 2016. Immunoproteomic characterization of a *Dermatophagoides farinae* extract used in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1: 1-8.

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

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

Nuttall, T.J, Lamb, J.R., Hill P.B. 2001. Characterisation of major and minor *Dermatophagoides* allergens in canine atopic dermatitis. *Res Vet Sci.* 71: 51–57.

Olivry, T., Dunston, S., Favrot, C., Prélaud, P., Tsukui, T., 2017. 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.* 28: 177-e38.

Patel, A., Curtis, C.F., Cerundolo, R. 2019 Incidence of anti-Der f 2 and anti-Zen 1-specific immunoglobulin E antibodies in atopic dogs from South-East England *Vet Rec* 184: 317.

Schildt, K. J. M., Seppänen, R. T. K., Hielm-Björkman, A. K., Saijonmaa-Koulumies, L. E., Belova, S. 2017. Prevalence of house dust mites in the homes of atopic dogs in Finland. *Vet Dermatol.* 28(2): 225–e54.

Shapiro, S. S., Wilk, M. B. 1965. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika.* 52 (3–4): 591–611.

SIMEPAR, disponível em:
<http://www.simepar.br/prognozweb/simepar/timeline/boletim_climatologico> Acesso em 01 nov 2019.

Smith, A.M., Benjamin, D.C., Hozic, N., Derewenda, U., Smith, W.A., Thomas, W.R., Gafvelin, G., Van, H. M., Chapman, M.D. 2001. The molecular basis of antigenic cross-reactivity between the group 2 mite allergens. *J Allergy Clin Immunol.* 107: 977-984.

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

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

Tsukui, T., Sakaguchi, M., Ohashi, S., Kurata, K., Koyanagi, M., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H., Iwabuchi, S. 2008. Analysis of house dust mite (*D. farinae*) allergens in canine atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 121: S34 (abstract).

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

Weghofer, M., Thomas, W.R., Kronqvist, M., Mari, A., Purohit, A., Pauli, G., Horak, F., Grönlund, H., Van, H.M., Valenta, R., Vrtala, S. 2008. Variability of IgE reactivity profiles among European mite allergic patients. *Eur J Clin Invest.* 38(12):959-65.

Yamashita, K., Fujiwara, C., Azuma, R., Sawazaki T, Nakao Y, Hasegawa A .2002.
Determination of anti- genic proteins of housedust mites in 90 dogs suffering from ato-
pic dermatitis. J Vet Med Sci. 64: 673–676.

CAPÍTULO 3

(Artigo científico a ser submetido ao periódico: *Veterinary Dermatology*)

TESTES ALÉRGICOS DE PUNTURA E DE CONTATO NA AVALIAÇÃO DA REAÇÃO ADVERSA A ALIMENTOS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA

Juliane Possebom*, Ariane Cruz*, Marconi Rodrigues de Farias*.

*Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, Rua Imaculada Conceição, 1155, 80215-901 Curitiba-PR, Brasil.

Correspondência:

Marconi Rodrigues de Farias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Ciências da Vida, Pontifícia Universidade Católica do Paraná – PUCPR, Rua Imaculada Conceição, 1155, 80215-901 Curitiba-PR, Brasil.

E-mail: marconi.puc@terra.com.br

Fontes de financiamento:

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Governo Federal, bolsa de estudos para a pós-graduação *stricto sensu*. Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Conflitos de interesse:

Não há conflitos de interesse no desenvolvimento deste estudo.

Introdução – Teste de contato alérgico com alimentos tem sido indicado para realização de dietas restritivas e diagnóstico de RAA em cães com prurido crônico. Já em humanos, o teste de puntura e de contato realizados de forma conjunta aumentou a sensibilidade e a especificidade do diagnóstico de RAA em crianças com DA, fato ainda não avaliado criticamente em cães.

Objetivos – Avaliar sensibilidade(SE), especificidade(SE), valores preditivos negativo(VPN) e positivo(VPP) do teste de puntura e de contato alérgico, em cães com prurido crônico e perene com suspeita de RAA.

Material e métodos – Realizou-se teste de puntura para alérgenos ambientais e alimentares e teste de contato alérgico (TCA) em 38 cães com prurido crônico, primário e perene de origem alérgica, seguido de dieta restritiva baseada em seus resultados. Avaliações de pVAS e escore de CADESI-4 foram realizadas nos dias 0, 30 e 60. Os cães que apresentaram melhora clínica foram submetidos a teste de provocação (TP) por 15 dias para confirmar o diagnóstico de RAA. TP positivo e TP negativo foram realizados para avaliar SE e SP dos testes.

Resultados – Dos 38 cães triados, 21 reagiram a trofoalérgeno no teste de puntura e/ou no TCA e foram incluídos no estudo. Desses 21 cães, 14 (68%) apresentaram sensibilidade à aeroalérgenos. Houve melhora na escala de pVAS e CADESI-4 seguida de piora dos sinais clínicos após TP em 17 (81%) dos cães, sendo que em 94% deles o uso de medicação foi suspenso após à dieta. A combinação dos testes apresentou valores de SE, SP, VPP e VPN de 80%, 66,7%, 66,7% e 80%, respectivamente.

Conclusão e Importância clínica – Este estudo demonstrou que a maioria dos cães com prurido crônico e perene geralmente tem dermatite atópica *lato sensu* polissensibilizados a alérgenos alimentares e ambientais. A associação do teste de puntura e de contato alérgico permitem um diagnóstico presuntivo de reação adversa a alimentos, permitem a seleção de alimentos para serem utilizados em dietas restritivas e em testes provocativos, podendo ser realizado com 30 dias de dieta, o que permite o diagnóstico precoce de RAA em cães com dermatite atópica *lato sensu*.

INTRODUÇÃO

A reação adversa a alimentos (RAA) em cães inclui a alergia (ou hipersensibilidade) e intolerância alimentar. A hipersensibilidade alimentar (HA) é descrita como um efeito adverso à saúde, decorrente de uma resposta imune específica, que ocorre após a exposição a um determinado componente do alimento, que pode ser uma resposta mediada por anticorpos IgE, mediada por células ou pela combinação de ambas.^{1 2} A intolerância alimentar é uma resposta a componentes alimentares farmacologicamente ativos, como a histamina; reação a toxinas

microbianas ou, ainda alterações secretórias, de motilidade ou de indigestibilidade, como acontece com alguns carboidratos da dieta.³

Em cães com prurido crônico, a ocorrência de RAA oscila de 15 a 20%. Já em cães e gatos com dermatopatias de origem alérgica, sua ocorrência é de 10 a 25% e, em cães com dermatite atópica, é em torno de 30%. Assim, a RAA isolada, na qual todos os sinais clínicos são controlados somente com dietas restritivas, é incomum em cães e, a dermatite atópica é a principal condição mórbida que favorece a reações adversas tegumentares a componentes alimentares em cães.^{4,5}

A RAA deve ser considerada um diagnóstico diferencial em cães que apresentam prurido crônico, perene, associados ou não a sinais gastrintestinais (GI) como diarreia, vômitos, tenesmo, fezes amolecidas, flatulência, distensão, cólica visceral e aumento do peristaltismo intestinal.^{4,5,6-8}

Geralmente, o prurido associado à RAA em cães com DA é de intenso a grave, com resposta parcial aos corticosteroides⁶ e, em 47% dos casos, pode apresentar-se como única manifestação clínica (prurido alésional)⁷, ou estar associado à pápulas, eritema, escoriação, alopecia autoinduzida, erosão, crostas e, em casos crônicos, a disqueratose e liquenificação. Dermatite piotraumática, piodermite superficial, malasseziose e otite externa de caráter bilateral e recorrente são comorbidades comuns associadas à RAA em cães com DA.^{4,8}

O diagnóstico da RAA deve ser realizado por meio de dieta restritiva com proteínas originais, de origem caseira ou comercial (dietas com restrição antigênica, hipoalergênicas ou analergênicas ultra-hidrolisadas), seguida de teste de provocação alimentar. Em alguns pacientes, mais de uma dieta restritiva pode ser necessária para se obter um melhor controle dos sinais, visto que reações cruzadas entre componentes alimentares são comuns.^{4,9}

Até o momento, não existem no mercado testes comerciais eficazes para diagnóstico da RAA.^{2,10} Em humanos, realizam-se os testes sorológicos para dosar IgE total e específicos (sIgE) e o teste de puntura (*prick test*) para identificar o alimento alergênico, mas seus resultados positivos evidenciam a sensibilização ao alimento, e não confirma o diagnóstico de alergia alimentar.^{11,12} Na medicina veterinária, desconhe-se a sensibilidade (SE) e especificidade (SP), bem como os valores preditivos negativo e positivo do teste de puntura para alimentos.

Em um estudo recente, o teste de puntura foi avaliado para triagem da dieta restritiva em cães com prurido crônico com suspeita de RAA, e mostrou ser um teste

útil para o estabelecimento de protocolos de dieta restritiva em cães com suspeição de alergia alimentar e ou de dermatite atópica *lato sensu*.¹³

Como a reação adversa a alimentos em cães com dermatite atópica tem componente mediado por células, trabalhos que avaliem os testes de contato alérgico para alimentos em cães com prurido crônico foram recentemente desenvolvidos e demonstraram que este não pode ser utilizado no diagnóstico da RAA, porém, pelo seu alto valor preditivo negativo, pode ser indicado na seleção de dietas restritivas.²

Atualmente, na literatura médico veterinária, correlação entre o teste de puntura e de contato alérgico ainda não foi criticamente avaliada. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos negativo e positivo dos testes de puntura e de contato alérgico, de forma isolada e associada, no diagnóstico da RAA em cães com prurido crônico e perene.

MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo teve caráter experimental, com amostra sistematizada, longitudinal, cego, não controlado e não aleatorizado. Todos os procedimentos realizados foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais – PUCPR, sob o registro de número 01252 – 2ª versão, na data de 13 de setembro de 2018.

Grupo de estudo

Foram selecionados cães com prurido crônico, primário e perene, predominantemente nas regiões interdigitais, abdominal, axilar, inguinal, perioral ou perianal, e com histórico de otite crônica bilateral intermitente ou persistente, independente da raça, sexo ou idade. Todos os cães tiveram as infecções secundárias de origem bacteriana ou por *Malassezia* spp. devidamente tratadas, e dermatopatias pruriginosas de origem parasitária foram descartadas, por meio de raspados de pele. Controle acaricida e adequado controle de pulgas foram realizados por três semanas antes da do início do estudo e mantidos, com fórmulas de uso tópico a cada duas semanas durante todo o estudo.²

Todos os animais triados para o estudo foram submetidos a testes alérgicos de puntura e de contato para alimentos e, para serem incluídos, deveriam apresentar reação positiva no mínimo a um alimento testado, ou no teste de puntura, ou no teste de contato ou em ambos.

Para as realizações dos testes alérgicos cutâneos, todos os cães deveriam estar sem medicação prévia de anti-histamínicos e glicocorticoides tópicos por duas semanas e glicocorticoides sistêmicos por quatro semanas.²

Crítérios de exclusão

Cães que necessitavam de uso regular de medicações anti-histamínicas ou glicocorticoides.

Cães de temperamento agitado ou agressivo, que não permitissem a contenção manual para a realização dos testes.

Fêmeas em período de estro, gestação ou lactação.

Animais que apresentaram resultado negativo em ambos os testes alérgicos aos alimentos testados ou que não permaneceram 48 horas com o contensor utilizado no teste de contato alérgico.

Tutores que não realizassem a dieta restritiva conforme as instruções.

Testes de puntura

Para a execução do teste de puntura foi realizada tricotomia nos cães incluídos no estudo, com máquina de tosa com uma lâmina 40, em região lateral torácica, antes da higienização do local com solução fisiológica e marcação da pele com caneta dermatográfica, mantendo-se pontos equidistantes de 2,0 cm.¹⁴

Soluções à base de salina e histamina (10 mg/mL) foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. Os extratos alimentares testados foram à base de proteínas bovina, de frango, pescado, suíno, de ovo, leite, soja, trigo, além de arroz, batata inglesa e mandioca, nas concentrações de 1:20 p/v (peso/volume). Também foram avaliados sensibilização aos extratos de alérgenos ambientais provenientes dos ácaros *Dermatophagoides farinae* (Df), *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), *Blomia tropicalis* (Bt) e aos extratos de pólenes de *Cynodon dactylon* (Cn), *Paspalum notatum* (Pn), *Lolium perenne* (Lp) e *Lolium multiflorum* (Lm), contendo 10 HEP de potência (equivalente a 10.000 UBE/mL).¹⁵ Todos os extratos e controles utilizados foram manipulados pelo Laboratório Veterinary Allergenic (Laboratório de Antígenos, Rio de Janeiro, Brasil), na concentração de 50% de glicerol e 0,45% de fenol, os quais foram submetidos às análises de padronização e potência.

Para a realização do teste de puntura, puntores de plástico com ponta dupla do tipo *Duotip-Test*[®] foram utilizados (Lincoln Diagnostics, Decatur, EUA). Inicialmente, uma gota do extrato era mantida, por capilaridade, na ponta do puntor, que, em seguida, era colocado sobre a pele, em um ângulo de 45° a 60° e, logo após o contato desta com a pele era realizada a puntura, de forma a permitir a penetração percutânea do extrato¹⁶ (Figura 1). Após 15 minutos da puntura de cada extrato, realizava-se a leitura do teste. Pápulas eritematosas eram demarcadas com caneta dermatográfica e a sua mensuração (média entre o diâmetro maior e perpendicular) era realizada através de um paquímetro. A reação era considerada positiva quando a média do diâmetro era superior em 3 mm à média da pápula do controle negativo.^{14, 17} (Figura 2).



Figura 1: Aplicação do extrato alergênico na pele de cão com prurido crônico utilizando puntores de plástico com ponta dupla do tipo *Duotip-Test*[®] em ângulo de 45°.

Fonte: arquivo pessoal.



Figura 2: Demarcação cutânea das reações papulares positivas após o teste alérgico cutâneo de punctura em um cão com prurido crônico de origem alérgica. Fonte: arquivo pessoal.

Teste de Contato Alérgico

Os extratos para o teste de contato alérgico foram elaborados a partir dos seguintes alimentos: carnes cruas de bovino, suíno, frango, pescado, leite *in natura*, ovo de galinha inteiro (clara e gema), soja *in natura*, farinha de trigo, farinha de arroz, batata inglesa (*Solanum tuberosum*) cozida e mandioca (*Manihot esculenta*) cozida.²

Para a formação dos extratos, cada um dos compostos possuiu por um processador de alimentos Philips Walita RI7636/750W (Philips Electronics Nederland B.V., Eindhoven, Netherlands), pesados (aproximadamente 500 mg) e foi homogenizado com 0,2 mg de vaselina semi-sólida.² Em seguida, todos os extratos foram dispostos em poços individuais de 8 mm, em contêntores hipoalergênicos para teste de contato alérgico (Alergochambers® - Neoflex, São Paulo, Brasil), mantendo-se sempre um poço sem preenchimento, como controle negativo (Figura 3).

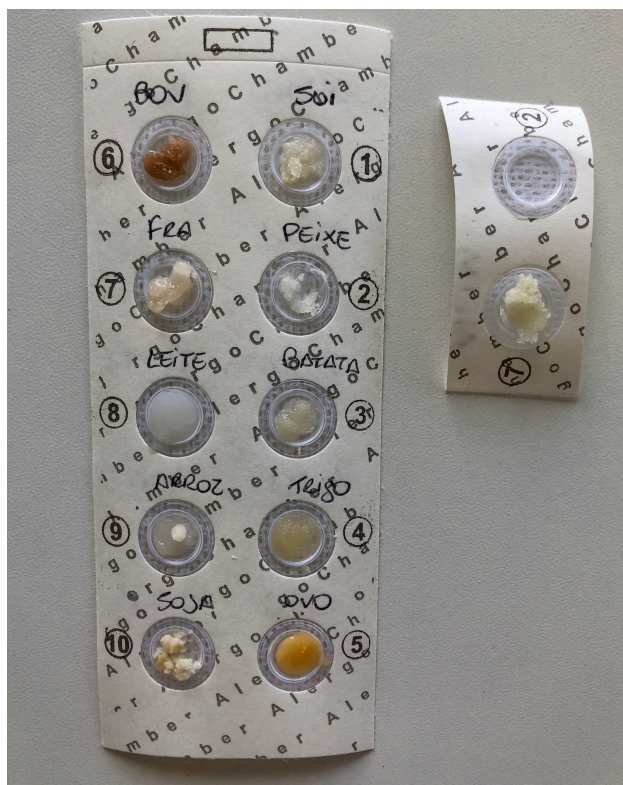


Figura 3: Fita hipoalergênica Alergochambers® (Neoflex, São Paulo, Brasil) com os extratos dos alimentos inseridos nos poços.

Fonte: arquivo pessoal.

Para aplicação do teste de contato alérgico, os cães foram submetidos a tricotomia na região lateral torácica, de aproximadamente 12 x 8 cm e o local foi higienizado com solução fisiológica. Os poços com os múltiplos extratos alimentares foram fixadas na área delineada e, para minimizar o risco de movimentação, os animais foram envolvidos com uma bandagem e, logo após, vestidos com roupa cirúrgica² (Figura 4).



Figura 4: Aplicação e fixação do teste de contato alérgico em cão com prurido crônico de origem alérgica.

Fonte: arquivo pessoal.

Após 48 h, os contensores (Alergochambers®) eram removidos e a presença de eritema, pápulas, placas eritematosas e ou microvesículas foram consideradas reações positivas, como estabelecido por Johansen et al. (2017)² (Figura 5).



Figura 5: Teste de contato em um cão com prurido crônico. A. Fita hipoalergênica Alergochambers® com os extratos de alimentos aderida à pele do cão. B. Interpretação do teste de contato após 48 horas. Setas em vermelho indicam reação de contato positiva.

Fonte: arquivo pessoal.

Dieta restritiva

De acordo com os resultados estabelecidos em ambos os testes alérgicos, elaborou-se uma dieta caseira restritiva para cada animal, a qual foi composta de uma fonte proteica e uma fonte de carboidrato que não causou reação nem no teste de punção e nem no teste de contato alérgico.

O cálculo da dieta foi realizado na dosagem de 50 g/kg de peso corporal do animal, pesada após o cozimento do alimento, e divididas em proporções iguais de proteína e carboidrato.¹⁸ A dieta restritiva foi mantida de forma exclusiva durante 60 dias.⁴

Avaliação do prurido e do escore lesional

Todos os cães incluídos no estudo foram avaliados conforme seus escores lesionais pela escala de CADESI-4¹⁹, e pela intensidade de prurido, a partir da escala Visual de Prurido (pVAS).²⁰ As avaliações foram realizadas antes de instituir a dieta

(dia 0), durante a dieta restritiva nos dias 30 e 60, e após 15 dias do teste de provocação (dia 75)⁹, ou conforme a necessidade do paciente.

Para avaliar a sensibilidade e a especificidade dos testes, realizou-se um teste de provocação com alimento que teve uma reação positiva (TP positivo) e com alimento que teve uma reação negativa (TP negativo), sendo cada TP realizado em momentos diferentes e avaliados por 15 dias.

No TP positivo optou-se por testar alimentos positivo em ambos os testes. Quando não era possível, selecionava-se aquele com maior reação, preferencialmente no teste de contato, seguido do teste de puntura. Para não tendenciar a interpretação na escala de pVAS durante o processo de TP, foi estabelecido um desafio cego, uma vez que os responsáveis pelos cães não tinham acesso aos resultados positivos e negativos dos alimentos testados.

Assim, a melhora clínica foi avaliada de acordo com a escala do pVAS dos pacientes. O valor de cada índice no dia 0 era comparado ao seu respectivo valor no dia 60 e, a partir dessa diferença de valores, calculou-se a porcentagem de melhora clínica de cada paciente, o qual foi classificado conforme quadro abaixo:

Quadro 1: Classificação adotada para avaliar o grau de melhora clínica dos pacientes com o uso da dieta restritiva.

Grau de melhora	Classificação de melhora do prurido
0	Sem melhora
Até 50%	Regular
50,1 - 80%	Boa
80,1 - 90%	Ótima
≥ 90%	Excelente

Fonte: adaptado de Pucheu-Haston et al., 2015.

Animais com prurido grave que necessitassem de medicação no período da dieta restritiva foram tratados com oclacitinib, na dose de 0,4–0,6 mg/kg, uma vez ao dia (Apoquel[®], Zoetis; São Paulo, Brasil). O medicamento foi sempre suspenso no mínimo sete dias antes (dia 23 e 53) de cada reavaliação, para o estabelecimento dos escores de CADESI-4 e pVAS. Nos cães cujo prurido havia apresentado melhora significativa já no dia 30, o uso da medicação foi descontinuado.

Os pacientes que apresentaram melhora clínica foram presumidos terem reação adversa a alimentos, porém o diagnóstico definitivo somente foi estabelecido quando os cães foram submetidos ao teste de provocação (TP) com sua alimentação

pregressa e apresentasse recidiva dos sinais clínicos, com aumento mínimo de um ponto na escala de pVAS. Em seguida, os cães eram submetidos ao TP com o presumido alimento ofensor, identificado nos testes alérgicos, e observado por 15 dias para a avaliação da recorrência de seus sinais clínicos.⁴

De acordo com o nível de melhora clínica dos animais, dividiu-se o diagnóstico do prurido crônico em:

- a- Alergia alimentar verdadeira: total melhora dos sinais clínicos com o uso da dieta de eliminação e piora após TP;²¹
- b- DA *lato sensu*: melhora parcial com o uso da dieta de eliminação e piora após TP e que apresentaram reações tegumentares positivas também ao teste de puntura a pelo menos um alérgeno ambiental;²¹
- c- DA *stricto sensu*: sem melhora com o uso da dieta de eliminação e reação positiva a pelo menos um alérgeno ambiental no teste de puntura;²¹
- d- DA *simili*: sem melhora com o uso da dieta de eliminação e sem reação a todos alérgenos ambientais testados no teste de puntura.²¹

Análise estatística

Os dados epidemiológicos foram descritos em porcentagem ou mediana. As variáveis incluídas foram raça, idade, sexo, presença de comorbidades e idade ao início dos sinais clínicos. Os dados relacionados aos testes de puntura e contato foram descritos em porcentagem de reações a alérgenos alimentares e ambientais.

As avaliações das escalas de prurido e CADESI-4 em cada dia do estudo foram apresentadas como média, desvio padrão, máximo e mínimo.²² A análise dos escores de ambas as escalas ao longo do tempo, foram analisadas por meio de análise de variância com medidas repetidas, com intervalo de confiança a 95% e $p \leq 0,05$.²²

As medidas de desempenho diagnóstico (sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e acurácia) dos testes de puntura e de contato alérgico foram calculadas de forma isolada e associada em relação ao desafio ao alimento (considerado a avaliação padrão ouro), por meio de tabelas 2x2, com intervalos de confiança a 95% e $p \leq 0,05$.²³

O índice de concordância entre os testes *de puntura* e *de contato* foram realizadas por análise de concordância Kappa de Cohen, fixando-se o nível de rejeição em 5% por Fleiss (1981).²⁴ A interpretação do valor de kappa foi feita baseada nos critérios de Landis e Koch (1977).²⁵

As análises foram realizadas no software STATA 14 (College Station, Texas, USA).

RESULTADOS

Animais excluídos do estudo

Foram submetidos ao teste de puntura e de contato alérgico 38 cães com prurido crônico, secundário à dermatite alérgica. Destes, 14 (36,8%) cães foram excluídos por apresentaram algum dos critérios de exclusão, 10 (58,8%) foram excluídos devido à desistência do tutor, relacionada às dificuldades da realização da dieta caseira, seu alto custo (principalmente em cães de grande porte), sensibilização emotiva por restringir a dieta ao cão ou pelo desinteresse em participar do estudo. Outros quatro (23,5%) cães foram excluídos porque não permaneceram 48 h com o contensor utilizado para o teste de contato alérgico.

Perda amostral

Três cães apresentam efeitos colaterais com o uso da dieta restritiva, sendo que dois cães apresentaram vômito e diarreia e um apresentou exacerbação do prurido e piodermite secundária, e só melhoraram mediante suspensão da dieta restritiva. Assim, 21 cães foram incluídos nesse estudo.

Características epidemiológicas

Dos 21 cães incluídos no estudo, 14 eram machos (66,8%) e sete fêmeas (33,3%), a mediana da idade foi de cinco anos, sendo a idade mínima um ano e a máxima 10 anos.

Testes cutâneos

Em relação aos 21 cães que completaram o estudo, além da sensibilidade aos trofoalérgenos, 14 (66,7%) também apresentaram sensibilidade a pelo menos um alérgeno ambiental testado, sendo que 13 (92,8%) destes cães apresentaram sensibilização a múltiplos alérgenos ambientais (Gráfico 1).

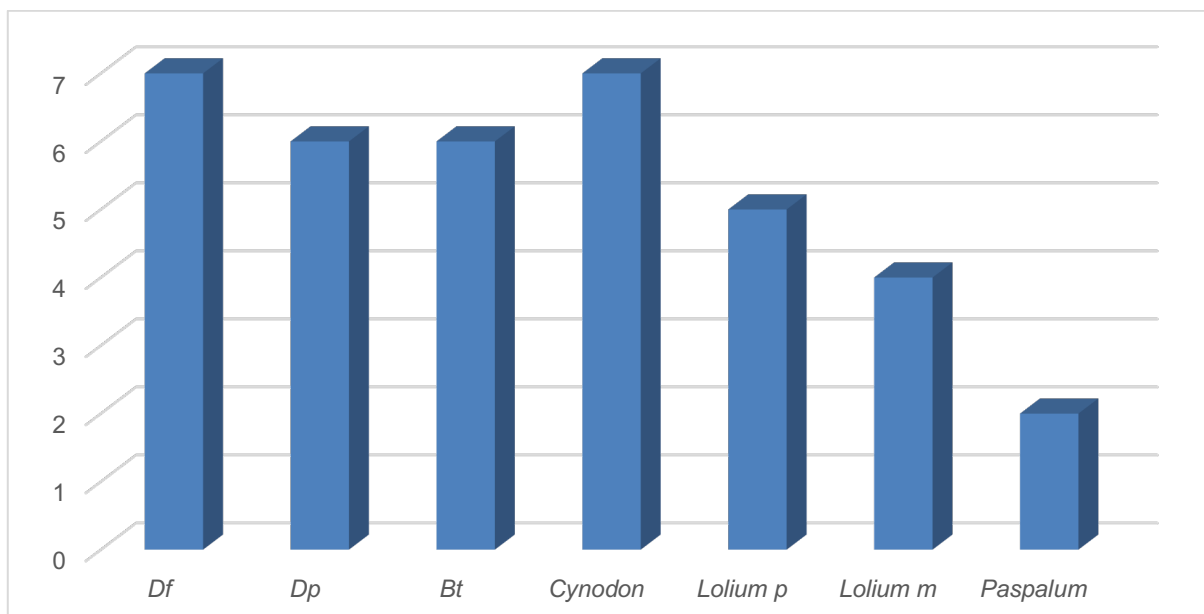


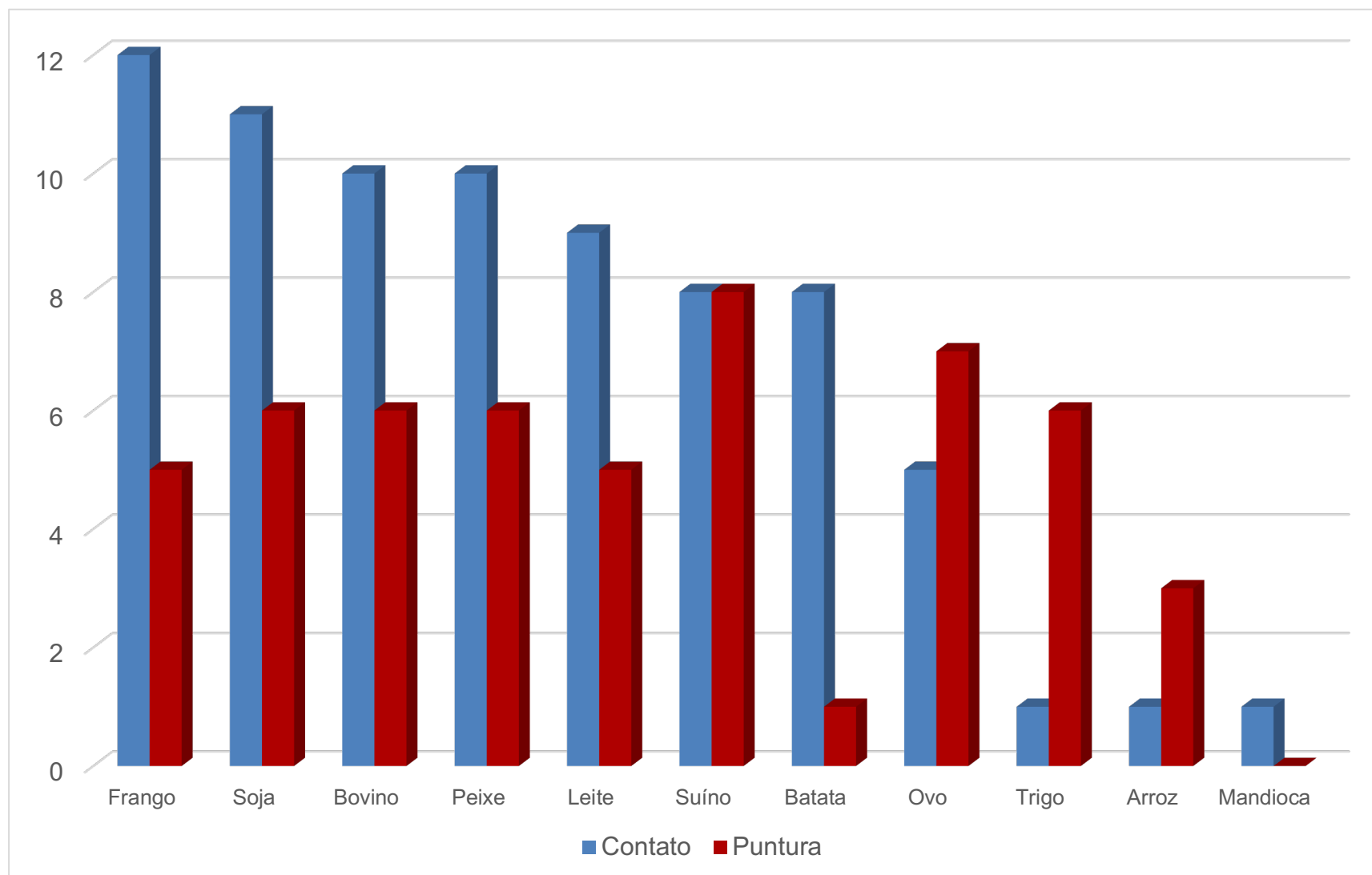
Gráfico 1: Prevalência de sensibilidade no teste de puntura em cães com dermatite atópica para alérgenos ambientais de ácaros e pólenes.

Dp: Dermatophagoides pteronyssinus; Df: Dermatophagoides farinae; Bt: Blomia tropicalis; Cynodon: Cynodon dactylon; Paspalum: Paspalum notatum; Lolium m: Lolium multiflorum; Lolium p: Lolium perenne.

Em relação aos alérgenos alimentares, no teste de puntura, a proteína suína foi a mais reagente (8/38%), seguida do ovo (7/33,3%), da soja, do peixe, do bovino e do trigo (6/28,6%), do frango e do leite (5/23,8%). Reações aos carboidratos foram observadas em 3 (14,28%) cães que reagiram ao arroz, um (4,76%) à batata e nenhum animal à mandioca (Gráfico 2).

No teste de contato alérgico, as proteínas também foram as principais causas de reações, das quais o frango reagiu em 12 (57,1%) cães, seguido da soja (11/52,4%), do peixe e da proteína bovina (10/47,6%), leite (9/42,8%), suína (8/38%), do ovo (5/23,8%) e do trigo (1/4,8%). A batata apresentou sensibilidade em 8 (38%) cães, e arroz e mandioca tiveram uma reação cada (4,8%) (Gráfico 2).

1



2 **Gráfico 2:** Demonstração gráfica do número de reações, aos diferentes alimentos testados no teste de puntura e no teste de contato
3 alérgico em cães com dermatite atópica.

Quatro pacientes reagiram a alimento somente no teste de puntura (19,04%), outros quatro apenas no teste de contato (19,04%), mas a maioria dos cães (13/61,90%) reagiram em ambos os testes, porém a diferentes alimentos. As análises de concordância entre os testes alérgicos são expostas na Tabela 1.

Tabela 1. Teste de concordância kappa entre os testes de puntura e de contato alérgico.

Testes	Concordância	kappa	Interpretação	kappa 95%CI	p
Puntura vs Contato Alérgico	38,45%	-0,17	Ausência de concordância	0,51-0,18	0,84

Os valores de sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivo, negativo e acurácia para o teste de puntura e para o teste de contato alérgico, de forma isolada e em conjunto, estão dispostos na tabela 2.

Tabela 2. Sensibilidade (SE), especificidade (SP), valor preditivo positivo (VPP) e negativo (VPN) e acurácia (AC) para os testes de puntura e de contato alérgico para alérgenos proteicos.

	SE (95%IC)	SP (95%IC)	VPP (95%IC)	VPN (95%IC)	AC
Puntura	45 (23,1-68,5)	75 (34,9-96,8)	81,8(48,2-97,7)	35,2(14,2-61,7)	60%
Contato	70 (45,7-88,1)	50 (15,7-84,3)	77,8(52,4-93,6)	40(12,2-73,8)	77%
Puntura/Contato associados	80(28,4-99,5)	66,7(22,3-95,7)	66,7(22,3-95,7)	80(28,4-99,5)	73%

Avaliação da resposta à dieta baseada nos testes alérgicos

Comparando os valores de escala de pVAS entre os dias 0 e 60, houve melhora clínica em 17 (81%) dos 21 cães incluídos no estudo. Desses, três apresentaram uma melhora em nível regular, nove em nível bom, cinco obtiveram melhora ótima e nenhum paciente obteve melhora excelente. Ao realizar o TP nesses 17 pacientes, todos tiveram recorrência do prurido. Assim, os 17 cães foram classificados inicialmente com RAA (Tabela 3).

Avaliando os valores de escore de CADESI-4, um grau de melhora clínica foi obtida em 17 (81%) cães, sendo que cinco deles apresentaram melhora em nível

regular, oito em nível bom, um apresentou melhora ótima e três pacientes obtiveram melhora excelente (Tabela 3).

Tabela 3. Valores absolutos e frequências no escore de pVAS a CADESI-4 em pacientes submetidos à dieta restritiva, classificando seus níveis de melhora clínica.

CLASSIFICAÇÃO	pVAS	CADESI-4
1 (<i>sem melhora</i>)	4 (19,0)	4 (19,0)
2 (<i>regular</i>)	3 (14,3)	5 (23,8)
3 (<i>boa</i>)	9 (42,8)	8 (38,0)
4 (<i>ótima</i>)	5 (23,8)	1 (4,80)
5 (<i>excelente</i>)	0	3 (14,3)

Escala visual de prurido (pVAS) e CADESI-4

A avaliação das médias e desvio padrão dos valores dos escores de prurido (pVAS) e escore lesional (CADESI-4) durante a dieta restritiva, nos dias 0, 30 e 60, e após o teste de provocação (75 dias), estão dispostas nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Os animais foram divididos conforme resposta à dieta de eliminação, em DA *lato sensu* e DA *stricto sensu*. Somente um paciente foi enquadrado em DA *silimi*, o mesmo apresentava escores de pVAS/CADESI-4 nos dias 0, 30 e 60 de 8/13, 7/5 e 7/5, respectivamente. Nesse paciente não foi realizado TP, pois ele não apresentou melhora clínica com a dieta de eliminação.

Tabela 4. Média dos escores da escala pVAS, em relação ao tempo de avaliação em cães com dermatite atópica (DA).

Dia do estudo	Média	Desvio Padrão	Mínima	Máxima
DA <i>lato sensu</i> (N=17)				
0	7,82	1,67	4	10
30 DIAS	3,65	1,62	2	6
60 DIAS	2,47	1,18	1	5
75 DIAS	6,11	1,99	3	9
DA <i>Stricto sensu</i> (N=3)				
0	6,67	1,15	6	8
30 DIAS	6	3,46	2	8
60 DIAS	6,67	1,53	5	8

Tabela 5. Média dos escores da escala CADESI-4 em relação ao tempo de avaliação em cães com dermatite atópica (DA).

Dia do estudo	Média	Desvio Padrão	Mínima	Máxima
<i>Lato sensu</i> (N=17)				
0	16,71	13,57	4	63
30 DIAS	8,23	5,37	0	18
60 DIAS	5,47	4,10	0	14
75 DIAS	14,17	12,84	0	59
<i>Stricto sensu</i> (N=3)				
0	13,33	10,97	7	26
30 DIAS	6,33	5,69	0	11
60 DIAS	6	2	4	8

A análise de variância de fator único foi aplicada aos 17 pacientes com DA *lato sensu* para determinar se houve diferença no escore de pVAS e de CADESI-4 ao longo de 30 e 60 dias de dieta restritiva, bem como, após o TP, com aproximadamente 75 dias no programa de estudo. Os resultados mostraram que a dieta restritiva permitiu diminuição significativa nas médias de escore de pVAS, nos momentos 30, 60 e 75 (teste de provocação), em relação ao início do estudo, $F(3) = 33,87$, $p < 0,01$; e do TP, em relação aos momentos 30 e 60, observando-se valor de $p < 0,01$ por meio das margens preditivas (Gráfico 3).

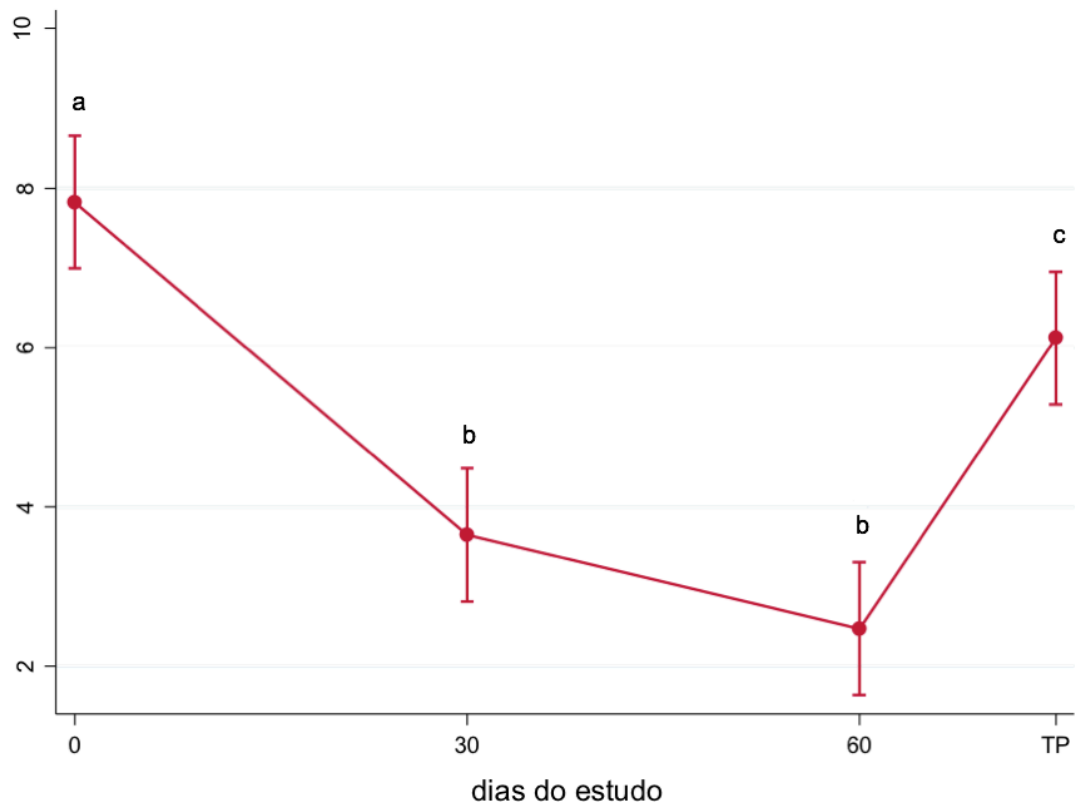


Gráfico 3: Distribuição linear média do escore pVAS e respectivos intervalos de confiança entre os tempos pré-dieta restritiva (dia 0), 30 e 60 dias de dieta, e após teste de provocação em pacientes DA *lato sensu*.

*Letras diferentes representam diferença estatística significativa nos resultados ($p < 0.01$)

Para o escore de CADESI-4, a diferença foi observada ao longo dos 30 e 60 dias em relação ao início do estudo, $F(3) = 10.33$, $p < 0,01$, e do desafio (teste de provocação) em relação a 30 e 60 dias de exclusão, observando-se valor de $p < 0,01$ (Gráfico 4).

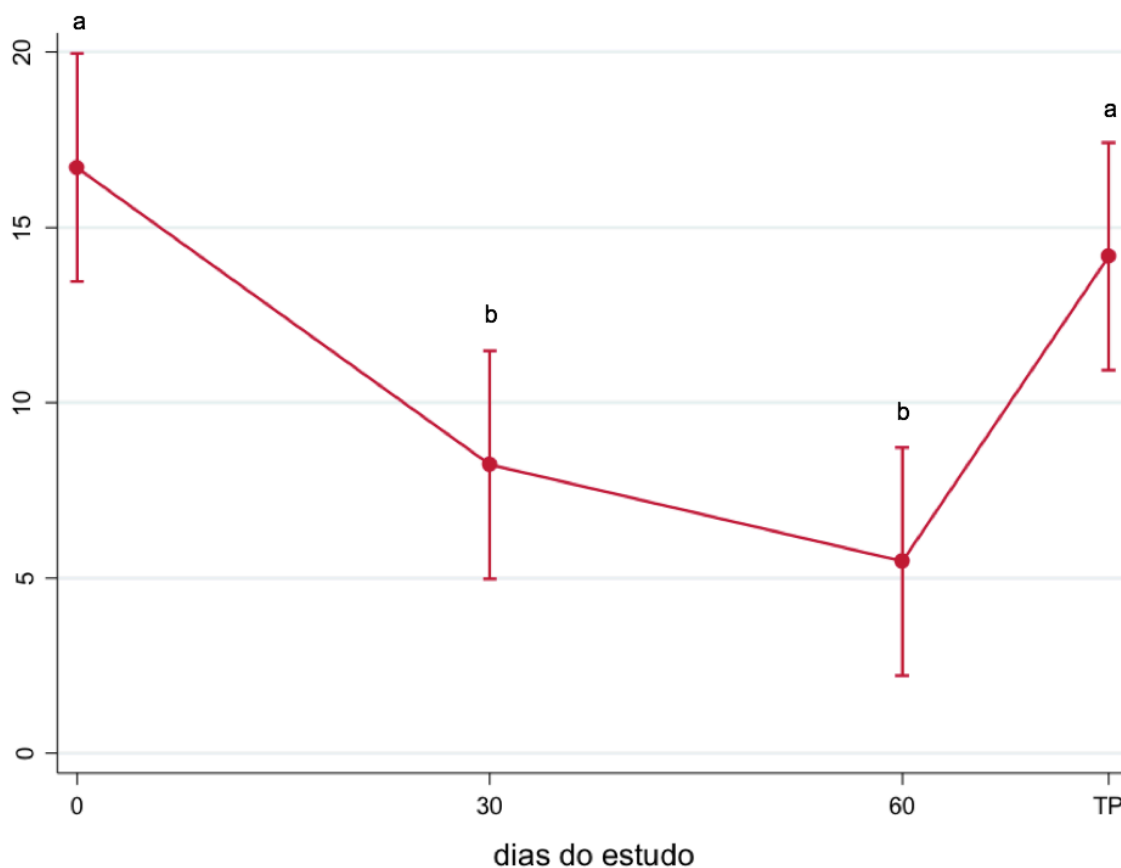


Gráfico 4: Distribuição linear média da escala de CADESI-4 e respectivos intervalos de confiança entre os tempos pré-dieta restritiva (dia 0), 30 e 60 dias de dieta, e após teste de provocação em pacientes DA *lato sensu*.

*Letras diferentes representam diferença estatística significativa nos resultados ($p < 0.01$)

Nos animais com DA *stricto sensu* e DA *simili*, o uso de medicação permaneceu em 75% dos cães, ao longo de todo o estudo, sendo que um animal necessitou do uso de prednisolona para controlar os sinais clínicos. Dos 17 cães com DA *lato sensu*, seis (35,3%) iniciaram a dieta conjunta ao uso de oclacitinib, porém, após 30 dias, quatro (23,5%) ainda permaneceram com uso e, após os 60 dias de dieta, somente um (5,9%) paciente manteve o uso da medicação.

Avaliando o índice de melhora clínica dos pacientes após dieta restritiva e o resultado do teste de puntura aos alérgenos ambientais, dividiu-se os pacientes com DA *lato sensu*, DA *stricto sensu* e DA *simili* e nenhum paciente se enquadrou como alergia alimentar. Dentre os 17 pacientes com DA *lato sensu*, 11 (64,7%) foram sensíveis a pelo menos um alérgeno ambiental, conforme o teste de puntura. Os dados de prevalência de raça, sexo, idade e sinais clínicos estão expostos na tabela 6.

Tabela 6: Padrões epidemiológicos de raça, idade, principais sinais clínicos e comorbidades em cães com dermatite atópica (DA) *lato sensu*, *stricto sensu* e *simili* incluídos no presente estudo..

	DA <i>lato sensu</i>	DA <i>stricto sensu</i>	DA <i>simili</i>	TOTAL
Número de cães	17	3	1	21
Raça				
<i>Bulldogue francês</i>	3	1	0	4
<i>Lhasa apso</i>	5	0	0	5
<i>Shih Tzu</i>	3	0	1	4
<i>Mestiços</i>	2	0	0	2
<i>Yorkshire terrier</i>	2	1	0	3
<i>Labrador</i>	0	1	0	1
<i>Maltês</i>	1	0	0	1
<i>Pug</i>	1	0	0	1
Idade do início dos sinais clínicos (anos)				
<1	6	2	1	9
1 a 3	6	1	0	7
4 a 10	5	0	0	5
Prurido				
<i>Perioral</i>	12	2	1	15
<i>Perianal</i>	4	0	0	4
<i>Periocular</i>	1	0	1	2
<i>Interdigital</i>	17	3	1	21
<i>Axila</i>	6	0	0	6
<i>Virilha/Abdome</i>	8	0	1	9
<i>Flexura antibubital</i>	3	2	0	5
Sinais gastrointestinais				
<i>Vômito</i>	5	1	0	6
<i>Diarreia</i>	5	1	0	6
<i>Flatulência</i>	2	0	1	3
Otite externa crônica	11	2	1	14
Disbiose bacteriana	8	2	1	11
Disbiose por <i>Malassezia</i>	2	0	0	2

DISCUSSÃO

A DA é caracterizada como uma doença de pele inflamatória, multifatorial, geralmente associada à produção de imunoglobulina-E (IgE) principalmente contra alérgenos ambientais.²⁶ Entretanto, estudos progressos têm demonstrado que a RAA

a alimentos pode ocorrer em até 40% dos cães com sinais de prurido crônico e perene, e que em metade desses cães apresentam DA *lato sensu*.²⁷⁻²⁹

O presente estudo demonstrou que 67% dos cães com prurido crônico de origem alérgica avaliados apresentavam sensibilidade a alérgenos ambientais e alimentares conjuntamente e, 81% deles, melhoraram com a dieta restritiva, o que demonstra que esses animais são polissensibilizados.

Avaliando os cães com DA *lato sensu* desse estudo, 100% deles tinham prurido como a principal queixa e apenas 35% apresentavam sinais gastrintestinais, o que denota que a pele é o principal órgão alvo da reação adversa a alimentos em cães com DA. Geralmente estes cães apresentam uma disfunção de barreira física epidérmica primária devida à diminuição da concentração de filagrina³⁰ e alterações na produção, na composição e na extrusão de ceramidas na camada granulosa, o que gera uma camada córnea defeituosa.^{31,32} Nos cães do presente estudo, os alérgenos alimentares podem ter estimulado uma resposta imunológica do tipo Th2 e a liberação de citocinas, como IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IL-31.³³⁻³⁵ Essa resposta inflamatória precoce aos alérgenos alimentares pode ter agravado o defeito de barreira cutânea e favorecido a penetração de proteínas alergênicas ambientais e o desenvolvimento da polissensibilização.⁵

Em adição, 47% dos cães apresentavam disbiose bacteriana e 12% por *Malassezia* spp. Possivelmente, a ativação da resposta Th2, o desenvolvimento precoce de alergia alimentar, a cronicidade e a polissensibilização, podem ter levado à redução da produção de peptídeos antimicrobianos tegumentares, justificando o aparecimento de infecções recorrentes nestes cães.

Em relação à topografia lesional, lesões inflamatórias e pruritogênicas foram principalmente observadas nas regiões interdigital e perioral e 65% dos cães tinham histórico de otite externa crônica recorrente. Esta diversidade topográfica pode estar relacionada à polissensibilização e à penetração de alérgenos por via percutânea e sistêmica, comum em cães com DA.³⁰

A RAA pode ser classificada como distúrbio mediado por IgE (Th2), mediado por células (Th1), porém, em pacientes humanos com dermatite atópica é comum a presença do caráter misto.^{12,36} Nos casos de suspeita de reação IgE mediada, o teste de puntura pode ser realizado para detectar sensibilização ao alimento em humanos.¹²

No presente estudo, o teste de puntura mostrou positividade em 81% dos cães, apresentou especificidade de 75% e valor preditivo positivo de 80%, o que mostra que

pode ser uma ferramenta útil no diagnóstico presuntivo de HA em cães com prurido crônico secundário à DA, além de ser de fácil execução em ambiente ambulatorial e de interpretação. Em adição, estes achados denotam a importância da resposta imunoalérgica IgE mediada a componentes alimentares em cães com DA *lato sensu*.

Em relação ao teste de contato alérgico, este também foi positivo em 81% dos cães e teve um VPP de 77,8%. Assim, o teste de contato alérgico pode auxiliar na presunção do diagnóstico da reação tardia aos alimentos, geralmente mediada por células, o que pode ser parcialmente responsável pelo prurido crônico nestes animais e, possivelmente, pelo desenvolvimento de eritrodermia, tendência à disqueratose e liquenificação tegumentar.³⁷

Porém, como o teste de contato com alimentos teve sensibilidade de 70% e especificidade de 50%, sugere-se que os extratos testados em contato com a pele podem induzir dermatite de contato irritante e levar a resultados falso positivos.

Em 62% dos cães foram observadas reações positivas, tanto ao teste de puntura, quanto ao teste de contato alérgico, o que sugere que cães com DA possam fazer simultaneamente reações imediatas e tardias a componentes alimentares, o que pode justificar a presença de prurido intenso, contínuo e perene nestes animais.

Ao avaliarmos os resultados do índice de Kappa, observamos que esses testes apresentam baixo nível de concordância. Isto ocorre porque os testes identificam mecanismos diferentes da doença e, enquanto o teste de puntura identifica resposta Th2, o teste de contato alérgico identifica resposta mediada por células, geralmente do tipo Th1. Assim, estes testes são complementares e quando no presente estudo foram utilizados de forma conjunta, aumentaram sua sensibilidade e seu valor preditivo negativo, o que permitiu a seleção de dietas restritivas e a escolha de alimentos utilizados no TP, e subsidiaram o diagnóstico da RAA em cães com DA em 81% das vezes.

Assim como em humanos, a ocorrência da RAA é variável e diverge entre os estudos entre 3 a 34%.³⁸ Já em cães, sua ocorrência variou de 10 a 20% na população canina com problemas cutâneos.²⁷ Esses dados variam conforme a população estudada e os critérios avaliados. Estudos avaliando a melhora do prurido crônico em cães com dermatite atópica com o uso de dieta restritiva e desafio mostraram uma ocorrência de RAA de 30 a 62%.^{8,28,39} O presente estudo demonstrou uma ocorrência de RAA em cães com DA de 81%. Assim, a reação adversa a alimentos como causa de prurido crônico é possivelmente negligenciada, e quando

dietas restritivas são realizadas baseadas em testes alérgicos, ao invés da anamnese, estas são mais frequentemente identificadas.

Possivelmente, a boa resposta observada nas triagens dietéticas baseadas em testes alérgicos *in vivo* deve-se ao fato de que muitos tutores de cães não se recordarem dos alimentos a que o animal já foi exposto, tornando difícil a seleção de dietas com proteínas originais baseadas apenas no histórico. Além disso, assim como ocorre em humanos, em cães é comum a ocorrência de reações cruzadas entre alimentos, como ocorre entre a proteína de frango e suína^{40,41}, frango e peixe^{42,43}, carne bovina com leite de vaca, cordeiro e veado.^{42,44,45}

Assim, os testes alérgicos auxiliam na realização de dietas restritivas com proteínas a que o animal não reaja, independente de ser inédita ou não, e permite muitas vezes seleções de dietas mais factíveis ao tutor, tornando-se de mais fácil execução, o que melhora a adesão ao teste.

A proteínas suína e de frango foram as mais reagentes nos testes de puntura e de contato, respectivamente, sendo que 59% dos cães com DA *lato sensu* reagiram ao frango e, ao realizar o TP positivo, todos apresentam piora do prurido, o que demonstra uma alta prevalência da alergia à proteína de frango na população estudada, diferentemente do estudo realizado por Roudebush (2013), em que somente 15% dos cães apresentavam esse tipo de reação adversa. Ao avaliarmos as rações mais relevantes no mercado nacional, o frango e o suíno são amplamente utilizados como fontes proteicas, fazendo que os cães tenham exposição contínua e precoce a esses alimentos, o que pode ter favorecido sua sensibilização e o desenvolvimento da RAA.

Até o presente momento, é estabelecido que o período de dieta restritiva ideal para o diagnóstico da reação adversa a alimentos é de 5 a 8 semanas.⁹ No presente trabalho, não houve diferença entre a melhora do prurido e do quadro sintomatológico entre os dias 30 e 60 de dieta restritiva. Após o TP, os valores médios de prurido e de CADESI mostraram diferenças significativas em relação aos dias 30 e 60, o que mostra que a melhora clínica que o paciente teve após 30 dias de dieta, não contribui para o diagnóstico de RAA. Desta forma, sugere-se que quando a dieta restritiva é realizada com comida caseira baseada nos resultados de testes alérgicos cutâneos *in vivo*, o período de dieta pode ser de 30 dias, antecipando assim o TP e o diagnóstico de RAA.

Este estudo demonstrou que a maioria dos cães com prurido crônico e perene geralmente tem dermatite atópica *lato sensu* e é polissensibilizada a alérgenos alimentares e ambientais. O teste de puntura e de contato alérgico permitem um diagnóstico presuntivo de reação adversa a alimentos, porém, sua conjunção permite a seleção de alimentos para serem utilizados em dietas restritivas e no teste provocativo, o qual pode ser realizado com 30 dias de dieta, permitindo um diagnóstico precoce de RAA em cães com dermatite atópica *lato sensu*.

REFERÊNCIAS

1. Burks W, James J, Eigenmann, P. *Food Allergy*. Elsevier Health Sciences, 2011, 25-25.
2. Johansen C, Mariani, C, Mueller, RS. Evaluation of canine adverse food reactions by patch testing with single proteins, single carbohydrates and commercial foods. *Vet Dermatol* 2017; 28: 473-109.
3. Boyce J. A. *et al.* Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 126: 51-58.
4. Hensel P, Santoro D, Favrot C, *et al.* Canine atopic dermatitis: Detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res.* 2015; 11: 196-197.
5. Nuttall TJ., Marsella R., Rosenbaum MR., *et al.* Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of atopic dermatitis in dogs. *J Am Vet Med Assoc*, 2019; 254:11.
6. Picco F., Zini E., Nett, C., *et al.* Wilhelm, S., Pfister, J., *et al.* A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Vet Dermatol.* 2008; 19: 150-152.
7. Favrot C, Steffan J, Seewald W. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Vet Dermatol.* 2010; 21: 23-31.
8. Proverbio D, Perego R, Spada E, Ferro E. Prevalence of adverse food reactions in 130 dogs in Italy with dermatological signs: a retrospective study. *J Small Anim Pract.* 2010; 51: 370–374.

9. Olivry T., Mueller R., Prelaud, P. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (1): Duration of elimination diets. *BMC Vet Res.* 2015; 11: 225.
10. Bethlehem S, Bexley J, Mueller RS. Patch testing and allergen-specific serum IgE and IgG antibodies in the diagnosis of canine adverse food reactions. *Vet Immunol Immunopathol*, 2012; 145: 582–589.
11. Lieberman J, Sicherer S. Diagnosis of Food Allergy: Epicutaneous Skin Tests, In Vitro Tests, and Oral Food Challenge. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2011; 11:58–64.
12. Yu W, Freeland DM, Nadeau KC. Food allergy: immune mechanisms, diagnosis and immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* 2016; 16: 751-765.
13. Alcalá, COR., Avaliação do teste de puntura, dieta restritiva e desafio dietético no diagnóstico da alergia alimentar em cães com dermatite atópica. [Dissertação de Mestrado] *Pontifícia Universidade Católica do Paraná*; Mestrado em Ciência Animal. 2019.
14. Bousquet J, Heinzerling L, Bachert C *et al.* Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*, 2011; 67(1): 18–24.
15. Cerdeiro APS, Farias, MR., Cunha, VES. Avaliação da sensibilização a pólenes de gramíneas por testes cutâneos em cães com dermatite atópica em Curitiba. Brasil. [Dissertação Mestrado] – *Pontifícia Universidade Católica do Paraná*, Curitiba, 2017. Disponível em: <<http://www.biblioteca.pucpr.br/pergamum/biblioteca/img.php?arquivo=/000072/000072a7.pdf>>.
16. Carnett, MJH, Plant JD. Percutaneous prick test irritant threshold concentrations for eight allergens in healthy nonsedated dogs in the USA. *Vet Dermatol*, 2018 29(2): 117–e47.
17. Valk *et al.* Low percentage of clinically relevant pistachio nut and mango co-sensitisation in cashew nut sensitised children. *Clin Transl Allergy* 2017 6: 8.
18. Rosser EJ. Diagnostic work of food hypersensitivity. *Vet Allergy*, 2014; 119 – 123.
19. Olivry T, Saridomichelakis M, Nuttall T *et al.* Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Vet Dermatol.* 2014; 25(2):77- 85.

20. Rybnicek J, Lau-Gillard PJ, Harvey R et al. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Vet Dermatol* 2009; 20: 115–122
21. 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(2):115-e30.
22. Moore DS, McCabe GP, Craig BA. Inference for Proportion. *Introduction to the Practice of Statistics*. 7th edition, 2012; 473-510.
23. Dohoo I, Wayne M, Stryhn H. Chapter 5: Screening and Diagnostic Tests. *Veterinary Epidemiologic Research*. 2nd edition. Prince Edward Island, Canada, 2010; 91-127.
24. Fleiss JL, et al. The measurement of interrater agreement. *Statistical methods for rates and proportions*. 1981; 2(212-236): 22-23.
25. Landis JR, Koch GG. An Application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics*. 1977 33: 363-374.
26. Halliwell R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet Immunol and Immunopathol*. 2006; 114: 207–208.
27. Chesney CJ. Food sensitivity in the dog: a quantitative study. *J Small Animl Pract* 2002; 43: 203–207.
28. Biourge, VC, Fontaine, J, Vroom, MW. Diagnosis of adverse reaction to food in dogs: efficacy of a soy-isolated hydrolyzate-based diet. *J Nutr* 2004; 134: 2062S-2064S
29. Loeffler A, Soares-Magalhaes R, Bond R, Lloyd D. A retrospective analysis of case series using home-prepared and chicken hydrolysate diets in the diagnosis of adverse food reactions in 181 pruritic dogs. *Vet Dermatol* 2006; 17: 273-279.
30. Marsella R, Papastavros V, Ahrens K, Santoro D. Decreased expression of caspase-14 in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Vet J*. 2016; 209:201–3
31. Reiter LV, Torres SM, Wertz PW. Characterization and quantification of ceramides in the nonlesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared with controls. *Vet Dermatol*. 2009; 20(4):260–6.
32. Chermrapai S, Broere F, Gooris G, Schlott et al. Altered lipid properties of the stratum corneum in Canine Atopic Dermatitis. *Biochim Biophys Acta. Biomembr*. 2018; 1860(2):526–33.

33. Marsella R, Sousa CA, Gonzales AJ *et al.* Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *J Am Vet Med Assoc* 2012; 241: 194–207
34. Olivry T, Mayhew D, Paps JS *et al.* Early activation of Th2/ Th22 inflammatory and pruritogenic pathways in acute canine atopic dermatitis skin lesions. *J Invest Dermatol* 2016; 136:1961–1969.
35. Bhagat RAS, Wazir VS, Mishra A, Maibam U. Food allergy in canines: A review. *J Entomol Zool St.* 2017; 5(6): 1522-1525
36. Wang J; Sampson HA. Food allergy. *J Clin Invest.* 2011;121(3):827–835.
37. Edwards KP, Martinez BA. Atopy patch testing for foods: A review of the literature *Allergy Asthma Proc* 2014; 35: 435–443.
38. Madsen C, Prevalence of food allergy: an overview. *Proc Nutr Soc* 2005; 64: 413–417
39. Vandresen G, Farias FR, Efficacy of hydrolyzed soy dog food and homemade food with original protein in the control of food-induced atopic dermatitis in dogs. *Pesq. Vet. Bras.* 2018; 38(7):1389-1393.
40. Hilger C, Swiontek K, Hentges F, *et al.* Occupational Inhalant Allergy to Pork followed by Food Allergy to Pork and Chicken: Sensitization to Hemoglobin and Serum Albumin. *Int Arch Allergy Immunol* 2010; 151:173-178.
41. Bexley J, Kingswell N, Olivry T. Serum IgE cross-reactivity between fish and chicken *Vet Dermatol* 2018; 29: 357.
42. Pali-Schöll I, Herrmann I, Jensen-Jarolim E, Iben C. Allergies, with Focus on Food Allergies, in Humans and Their Animals. *Springer International Publishing AG* E. Jensen-Jarolim (ed.), *Comparative Medicine*, 2017 .
43. Kuehn A, Codreanu-Morel F, Lehnert-Weber C *et al.* Cross-reactivity to fish and chicken meat – a new clinical syndrome. *Allergy*, 2016; 76: 1772-1781.
44. Ayuso R, Lehrer SB, Lopez M, Reese G, Ibanez MD, Esteban MM, *et al.* Identification of bovine IgG as a major cross-reactive vertebrate meat allergen. *Allergy*. 2000;55(4):348–54.
45. Martin A, Sierra MP, Gonzalez JL, *et al.* Identification of allergens responsible for canine cutaneous adverse food reactions to lamb, beef and cow's milk. *Vet Dermatol* 2004;15(6):349–56.

CAPÍTULO 4

CONSIDERAÇÕES FINAIS

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

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

O reconhecimento que alérgenos de baixo peso molecular podem sensibilizar cães com dermatite atópica é importante pois esses alérgenos são amplamente encontrados em produtos têxteis do domicílio, como cama, sofá e colchão, e seu controle através de aspiração é essencial para evitar a precipitação de eczema atópico. Em adição, os alérgenos de baixo peso molecular são os mais associados à sensibilização e precipitação de rinite e asma em seres humanos. Assim o cão com eczema atópico pode servir de sentinela para a exposição humana.

Testes alérgicos de puntura e de contato alérgico aumentou a detecção da RAA nos cães, que até o presente momento são negligenciadas em cães com prurido crônico.

A execução do teste do contato alérgico é trabalhoso, de difícil interpretação devido as reações de contato irritante ao alimento e ao contensor. Maiores estudos para aprimorar estes testes são necessários, como melhorias nos contensores, afim de diminuir o contato irritante, e ao mesmo tempo melhorar a aderência desses na pele. Estudos de padronização dos extratos para uso em cães, como limiar irritativo, devem ser realizados, para melhorar sua especificidade e diminuir reações de contato irritante.

REFERÊNCIAS

Arlan LG, Morgan MS. Biology, ecology, and prevalence of dust mites. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2003; 23: 443–468.

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

Bhagat, RAS; Wazir VS; Mishra A; Maibam, U. Food allergy in canines: A review. *J Entomol Zool Stud.* 2017; 5(6): 1522-1525.

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; 26:95–e26.

Boyce JA, Assa'ad A, Burks AW, Jones SM, Sampson HA, Wood RA, Plaut M, Cooper SF, Fenton MJ, Arshad SH, Bahna SL, Beck LA, Byrd-Bredbenner C, Camargo CA Jr, Eichenfield L, Furuta GT, Hanifin JM, Jones C, Kraft M, Levy BD, Lieberman P, Luccioli S, McCall KM, Schneider LC, Simon RA, Simons FE, Teach SJ, Yawn BP, Schwaninger JM. Guidelines for the diagnosis and management of food allergy in the United States: report of the NIAID-sponsored expert panel. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2010; 126, S1-58.

Burks, W., James, J., Eigenmann, P. *Food Allergy.* Elsevier Health Sciences, 24pp. 2011.

Cehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal Allergy Clin Immunology* 2005;115(1):3–12.

Chesney CJ. Food sensitivity in the dog: a quantitative study. *J Small Anim Pract.* 2002; 43: 203–207.

Commins SP, Satinover SM, Hosen J, Mozena J, Borish L, Lewis BD, Woodfolk JA, Platts-Mills TA. Delayed anaphylaxis, angio-edema, or urticaria after consumption of red meat in patients with IgE antibodies specific for galactose-alpha-1,3-galactose. *J Allergy Clin Immunol.* 2009; 123: 426–433.

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.

Halliwel R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006; 114: 207–208.

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

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

Jackson HA. Dermatological manifestations and nutritional management of adverse food reactions. *Vet Medicine* 2007; 1: 51-64.

Jiménez-Feijoo R, Pascal M, Moya R, Riggioni C, Domínguez O, Lózano J, Plaza A. Molecular diagnosis in house dust mite allergic patients suggests clinical relevance of Der p 23 in asthmatic children. *J Investig Allergol Clin Immunol.* 2019. 30(4).

Johansen C, Mariani C, Mueller RS. Evaluation of canine adverse food reactions by patch testing with single proteins, single carbohydrates and commercial foods. *Vet Dermatol,* 2017; 28(5), 473–e109.

Lack G. Update on risk factors for food allergy. *J Allergy Clin Immunol Pract.* 2012; 129: 1187–1197.

Loeffler A, Soares-Magalhaes R, Bond R, Lloyd D. A retrospective analysis of case series using home-prepared and chicken hydrolysate diets in the diagnosis of adverse food reactions in 181 pruritic dogs. *Vet Dermatol* 2006; 17; 273-279.

Marsella R, Sousa CA, Gonzales AJ, Fadok VA. Current understanding of the pathophysiologic mechanisms of canine atopic dermatitis. *J Am Vet Med Assoc* 2012;241:194–207.

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

Mueller RS, Unterer S. Adverse food reactions: Pathogenesis, clinical signs, diagnosis and alternatives to elimination diets. *Vet J.* 2018;236, 89–95.

Mueller RS, Olivry T. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (4): can we diagnose adverse food reactions in dogs and cats with in vivo or in vitro tests? *BMC Vet Res.* 2017;13, 275.

Mueller RS, Olivry T, Prelaud P. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (2): Common food allergen sources in dogs and cats. *BMC Vet Res.* 2016;12, 9.

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 Immunopat.* 1996; 52: 147–157.

Noli C, Foster A, Rosenkrantz W, eds: *Veterinary Allergy*, 1st edition, Wiley, 2014; 119 – 123.

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

Nuttall TJ., Marsella R., Rosenbaum MR., Gonzales AJ., Fadok, VA. Update on pathogenesis, diagnosis, and treatment of atopic dermatitis in dogs J Am Vet Med Assoc. 2019; 254:11

Nuttall TJ, Hill PB, Bensignor E, Willemse T. House dust and forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis. Vet Dermatol. 2006;17(4), 223–235.

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

Olivry T, Mayhew D, Paps JS, Linder KE, Peredo 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;136:1961–1969.

Olivry T, Mueller RS, Prelaud P. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (1): Duration of elimination diets. BMC Vet Res. 2015,11:225.

Pali-Schöll I, Herrmann I, Jensen-Jarolim E, Iben C. Allergies, with Focus on Food Allergies, in Humans and Their Animals. Comparative Medicine. 2017:109–129.

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

Pomeroy BS. Allergy and allergic reactions in the dog. Cornell Vet 1934; 24: 335–341.

Proverbio D, Perego R, Spada E, Ferro E. Prevalence of adverse food reactions in 130 dogs in Italy with dermatological signs: a retrospective study. *J Small Anim Pract.* 2010;51:370–4.

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.

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

Roitel O, Bonnard L, Stella A, Schiltz O, Maurice D, Douchin G, Jacquenet S, Favrot C, Bihain BE, Couturier N. Detection of IgE-reactive proteins in hydrolysed dog foods. *Vet Dermatol.* 2017;28(6), 589–e143.

Rosser EJ, Jr. Diagnosis of food allergy in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 1993; 203: 259–262.

Roudebush P. Ingredients and foods associated with adverse reactions in dogs and cats. *Vet Dermatol.* 2013;24(2):293-4.

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.

Schildt, KJM., Seppänen, RTK., Hielm-Björkman, AK., Saijonmaa-Koulumies, LE., & Belova, S. Prevalence of house dust mites in the homes of atopic dogs in Finland. *Vet Dermatol.* 2017;28(2),225–e54.

Sehra S, Krishnamurthy P, Koh B, Zhou HM, Seymour L, Akhtar N, Travers JB, Tuner MJ, Kaplan MH. Increased TH2 activity and diminished skin barrier function cooperate in allergic skin inflammation. *Eur J Immunol.* 2016;46:2609–2613.

Thomas WR, Smith W, Hales BJ. House dust mite allergen characterization: Implication for T-cells responses and immunotherapy. *Intl Arch Allergy Immunol.*1998;15: 9-14.

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

Verlinden A, Hesta M, Millet S, Janssens GPJ. Food Allergy in Dogs and Cats: A Review, *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2006;46:3, 259-273.

Walton GS. Skin responses in the dog and cat to ingested allergens. Observations on one hundred confirmed cases. *Vet Rec.* 1967; 81: 709–713.

Wang J, Sampson H. Food allergy. *J Clin Invest.* 2011; 121: 827–835.

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

Weghofer M, Grote M, Resch Y, Casset A, Kneidinger M, Kopec J, Thomas WR, Fernández-Caldas E, Kabesch M, Ferrara R, Mari A, Purohit A, Pauli G, Horak F, Keller W, Valent P, Valenta R, Vrtala S. Identification of Der p 23, a peritrophin-like protein, as a new major *Dermatophagoides pteronyssinus* allergen associated with the peritrophic matrix of mite fecal pellets. *J Immunol.* 2013;190:3059-67

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

ANEXO



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 12 de Dezembro de 2013.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 862 – 1ª Versão

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

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marconi Rodrigue de Farias

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

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária / Mestrado

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

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

APROVADO.

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

Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório ao CEUA-PUCPR descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.

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

Atenciosamente,

Prof. Dra. Marta Luciane Fischer

Coordenadora

Comitê de Ética no Uso de Animais.





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

Curitiba, 13 de setembro de 2018.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01251 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: COMPARAÇÃO ENTRE TESTE DE PUNTURA E TESTE DE CONTATO NO DIAGNOSTICO DE TROFOALÉRGENOS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA INDUZIDA POR ALIMENTO

AValiação do teste de puntura no diagnostico de trofoalérgenos em cães com dermatite atópica induzida por alimento

AValiação do teste de contato para diagnostico de hipersensibilidade a trofoalérgenos em cães com dermatite atópica

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

MARCONI RODRIGUES DE FARIAS

EQUIPE DE PESQUISA

CAMILLA OLIVEIRA ROSA ALCALÁ, JULIANE POSSEBOM DE OLIVEIRA, GABRIELA RIBEIRO RODRIGUES

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CURSO

Escola Ciências da Vida – Medicina Veterinária

VIGÊNCIA DO PROJETO	08/2018 a 12/2019	QUANTIDADE DE ANIMAIS	40
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Canis lupus familiaris</i>	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	Variável	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	Variável	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.

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



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

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. 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



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

