

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

LUCIANA WANCURA MARCUZ

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO GÊNERO SEXUAL, DA CASTRAÇÃO E DA
EFICÁCIA DE UMA SOLUÇÃO NA MODULAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FEL D
1 NA PELAGEM DE GATOS (*Felis catus domestica*)**

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2014

LUCIANA WANCURA MARCUZ

**AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DO GÊNERO SEXUAL, DA CASTRAÇÃO E DA
EFICÁCIA DE UMA SOLUÇÃO NA MODULAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FEL D
1 NA PELAGEM DE GATOS (*Felis catus domestica*)**

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

Orientador: Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS

2014

TERMO DE APROVAÇÃO
(Responsabilidade da Secretaria do PPGCA)

(Entregue pela secretaria)

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	X
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	Xi
RESUMO GERAL.....	Xii
ABSTRACT.....	Xiii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	Xiv
LISTA DE QUADROS.....	Xv
LISTA DE FIGURAS.....	Xvi
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 ALÉRGENOS DE GATOS.....	3
3 ORIGEM E EXPOSIÇÃO A ALÉRGENOS DE GATOS.....	7
4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AOS ALÉRGENOS DO EPITÉLIO DE GATOS.....	9
5 CONTROLE AMBIENTAL DOS ALÉRGENOS PROVENIENTES DO EPITÉLIO DE GATOS.....	11
6 CONCLUSÃO.....	13
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	14
	14
CAPÍTULO 2	
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	19
2.1 OBJETIVO GERAL.....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19

3 MATERIAIS E MÉTODO.....	19
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	19
3.2 COMITÊ DE ÉTICA.....	19
3.3 SELEÇÃO DOS ANIMAIS E GRUPOS DE ESTUDO.....	20
3.3.1 Critérios de inclusão.....	20
3.3.2 Critérios de exclusão e perda amostral.....	20
3.3.3 Coleta das amostras.....	20
3.3.4 Acondicionamento das amostras.....	22
3.3.5 Avaliação das concentrações de Fel d 1 presente nas amostras.....	22
3.3.5.1 Preparo das amostras.....	22
3.3.5.2 Análise das concentrações de Fel d 1.....	24
3.3.6 Análise estatística.....	25
4 RESULTADOS.....	25
5 DISCUSSÃO.....	29
6 CONCLUSÃO.....	31
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32

CAPÍTULO 3	
RESUMO	33
ABSTRACT	34
1 INTRODUÇÃO	35
2 OBJETIVOS	36
2.1 OBJETIVO GERAL.....	36
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3 MATERIAIS E MÉTODO	36
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	36
3.2 COMITÊ DE ÉTICA.....	36
3.3 SELEÇÃO DOS ANIMAIS E GRUPOS DE ESTUDO.....	37
3.3.1 Critérios de inclusão e grupos experimentais.....	37
3.3.2 Critérios de exclusão e perda amostral.....	38
3.3.3 Coleta das amostras.....	38
3.3.4 Acondicionamento das amostras.....	42
3.3.5 Avaliação das concentrações de Fel d 1 presente nas amostras.....	42
3.3.5.1 Preparo das amostras.....	42
3.3.5.2 Análise das concentrações de Fel d 1 na pelagem de gatos..	44
3.3.6 Avaliação da segurança da solução moduladora de alérgenos.....	45
3.3.7 Análise estatística.....	47
4 RESULTADOS	47
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÃO	53
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
 CAPÍTULO 4	
CONCLUSÃO GERAL	55
 ANEXOS	 57

Dedico este Mestrado aos meus
pais, Eliana e Paulo, pelo apoio
incondicional para realização
deste sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, e por estar sempre presente em minha vida.

Ao Professor Doutor Marconi Rodrigues de Farias, pela orientação, por acreditar e me apoiar durante essa pesquisa.

Aos demais doutores, que com seus conhecimentos, inspiraram me a continuar me dedicando, em especial a Professora Doutora Cristina Sotomaior, pelo carinho, apoio e pelas conversas, sempre incentivando para concluir o trabalho.

Aos meus gatos, pacientes, que com seu charme, me permitiram entrar nesse fascinante universo que é o trabalho com eles.

Aos meus amigos e colegas de Mestrado, Jennifer Biscarra Bellio, Dévaki Assunção e Maicon Roberto Paulo, pelo apoio, viagens, estudos e incentivo.

Às estagiárias Maria Elisa Cavinato e Cristina Wolanski, que auxiliaram nas coletas e no desenvolvimento da pesquisa, vocês terão um futuro brilhante!

Às minhas amigas Pamela Maira Rocha e Larissa Kummer, pela paciência, compreensão e momentos de distração, quando foram necessários.

Às minhas irmãs, Cristina Marcuz e Ana Paula Marcuz e pais, Eliana Marcuz e Paulo Marcuz, pela compreensão em vários momentos em que estive ausente, e pelo incentivo de perseverar.

À Doutora Luisa Karla Arruda, por permitir que parte da pesquisa fosse realizada no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da Faculdade de Medicina da USP-Ribeirão Preto.

À Doutora Michelle Rodrigues Barbosa, pelo auxílio na etapa do laboratório, mostrando um universo novo da pesquisa científica.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram e participaram deste trabalho.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por quatro capítulos.

O capítulo 1 é uma revisão da literatura sobre a produção de alérgenos pelo gato doméstico, e sua relação com a sensibilização, rinite e asma alérgicas.

O capítulo 2 apresenta o artigo intitulado *Influência do gênero sexual e da castração na concentração de Fel d 1 na pelagem de gatos (Felis catus domestica)*.

O capítulo 3 se refere ao artigo *Avaliação da eficácia de uma solução moduladora de alérgenos na minimização da concentração de Fel d 1 na pelagem de gatos (Felis catus domestica)*.

O capítulo 4 se refere a conclusão geral da dissertação.

RESUMO GERAL

O Fel d 1 é o principal alérgeno do gato, pois 95% da população humana quando sensível a ele. Sendo o Fel d 1 considerado um agente ubiqüitário, altamente adesivo e de peso molecular baixo (36kDa), ele é facilmente encontrado em ambientes com e sem a presença de gatos. A rinite e asma alérgicas são doenças que estão diretamente ligadas com a qualidade de vida da população humana sensível ao Fel d 1, pois ele sendo carregado facilmente, os indivíduos são frequentemente sensibilizados a ele, precipitando as crises. Esse alérgeno é de difícil remoção na pelagem dos gatos, pois todos eles a produzem, assim como produzem os demais alérgenos (Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 5, Fel d 6, Fel d 7 e Fel d 8). A proposta do estudo foi a tentativa de reduzir a concentração de Fel d 1 na pelagem dos gatos por meio de solução moduladora de alérgenos, assim como avaliar a concentração de Fel d 1 em gatos de ambos os sexos e verificar a influência da castração na concentração do mesmo. A produção de Fel d 1 é diferente de acordo com o sexo do gato e a castração do mesmo, sendo que os machos apresentam uma quantidade levemente maior de alérgeno, quando comparado com as fêmeas, e ainda, os animais castrados apresentam quantidade consideravelmente maior que os não castrados, o que pode ser devido a grande quantidade de alérgeno em depósito, pelo hábito rotineiro de lambedura. Quando se trata da redução mecânica do alérgeno, observou-se que somente a solução moduladora de alérgenos não foi capaz de reduzir substancialmente a quantidade de alérgenos na pelagem dos gatos, assim como não foi observada ação residual do mesmo. Banhos de imersão por pelo menos três minutos são requeridos para a redução na concentração de Fel d 1, e esse apenas a reduz pelo período de 24 horas, sendo que após esse período a concentração volta ao valor de normalidade. Conclui-se que gatos produzem Fel d 1, independente de sexo ou ser castrado ou não, assim como conclui-se que a higienização do gato com solução moduladora de alérgeno não influencia na concentração de alérgeno na pelagem dos mesmos.

Palavras-chave: Asma. Rinite. Alérgeno.

ABSTRACT

The Fel d 1 is the major cat allergen, because 95% of the human population when sensitive to it. Fel d 1 is considered a highly adhesive and low molecular weight (36kDa) ubiquitous agent, it is easily found in environments with and without the presence of cats. The allergic rhinitis and asthma are diseases that are directly linked to the quality of life of the human population sensitive to Fel d 1, since it is easily adduced, individuals are often sensitized to it, precipitating crises. This allergen is difficult to remove the fur of cats, for they all to produce as well as produce other allergens (Fel d 2, Fel d 3, Fel d 4, Fel d 5, d 6 Fel, Fel d 7 and Fel d 8). The purpose of this study was to attempt to reduce the concentration of Fel d 1 in the fur of cats through modulating solution allergens, as well as evaluating the concentration of Fel d 1 in cats of both sexes, and the influence of castration on the concentration thereof. The production of Fel d 1 is different according to the sex of the cat and castration thereof, and the males have a slightly larger amount of allergen when compared with females, and also the amount castrated animals are considerably larger than non neutered, which may be due to large amount of allergen on deposit by the routine habit of licking. When it comes to mechanical reduction of the allergen, it was observed that only the modulating allergen solution was not able to substantially reduce the amount of allergens on the coat of cats, as well as no residual action thereof was observed. Immersion baths for at least three minutes are required to reduce the concentration of Fel d 1, and this only reduces the period of 24 hours, and thereafter the concentration back to the normal range. It follows that produce Fel d 1 cat, regardless of sex or castration or not, and it is concluded that the cleaning solution modulator with cat allergen does not influence the concentration of allergen in the same coat.

Keywords: Fel d 1. Asthma. Rhinitis. Allergen. Cats.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina Sérica Bovina
ELISA	Imunoensaio Enzimático
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PBS-T	Phosphate-Buffered Saline – Tween
kDa	Kilo Dalton
µg	Micrograma
ml	Mililitro
RPM	Rotações por minuto
IgA	Imunoglobulina A
IgE	Imunoglobulina E
IgM	Imunoglobulina M
IgG4	Imunoglobulina G subclasse 4
IL4	Interleucina 4
IL5	Interleucina 5
IL10	Interleucina 10
IL13	Interleucina 13
Th2	Linfócitos T auxiliares tipo 2
Fel d 1	Subgrupo de alérgeno com origem na lipocalina sebácea e salivar proveniente do epitélio de gatos
Fel d 2	Subgrupo de alérgeno com origem na albumina proveniente do epitélio de gatos
Fel d 3	Subgrupo de alérgeno com origem cisteína proveniente do epitélio de gatos
Fel d 4	Subgrupo de alérgeno com origem na lipocalina salivar proveniente do epitélio de gatos
Fel d 5	Subgrupo de alérgeno com origem na IgA felina
Fel d 6	Subgrupo de alérgeno com origem na IgM felina
Fel d 7	Subgrupo de alérgeno com origem na lipocalina salivar felina
Fel d 8	Subgrupo de alérgeno com origem na proteína laterina felina

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Principais alérgenos, sua origem, reatividade cruzada e índices de sensibilização dos principais alérgenos provenientes do epitélio de gatos.....	03

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. A – Sifão adaptador Dustream collection (Indoor Biothechnologies- Charlottesville USA) utilizados para o encaixe do filtro para coleta das amostras; B – Filtro coletor Dustream filters (Indoor Biothechnologies - Charlottesville USA) utilizado para reter a poeira durante a aspiração dos animais incluídos no projeto.....	22
Figura 2. Gato, mestiço, fêmea, ovariectomizada, no momento da contenção e aspiração para coleta da amostra de poeira da pelagem e posterior análise da concentração de Fel d 1.....	23
Figura 3. Peneira com malha de 0,03mm (Standard Sieve Series A.S.T.M-EUA) contendo pelos e placa de Petri devidamente identificada contendo amostra peneirada a partir de um gato, mestiço, fêmea, ovariectomizada.....	24
Figura 4. Suspensão das amostras no homogeneizador Biomixer, pelo período de oito horas em pernoite, para remoção do alérgeno da poeira, ficando concentrado na solução.....	25

Figura 5.	Gráfico com as concentrações médias de Fel d 1 entre gatos machos orquiectomizados e inteiros, mostrando que os gatos castrados possuem uma concentração significativamente maior de alérgeno quando comparado com gatos inteiros	27
Figura 6.	Gráfico com as concentrações médias de Fel d 1 entre gatos fêmeas ovariectomizadas e inteiras, mostrando que os gatos castrados possuem uma concentração significativamente maior de alérgeno quando comparado com animais inteiros.....	28
Figura 7.	Gráfico mostrando que apesar da concentração de Fel d 1 em gatos fêmeas não castradas ser superior quando comparado com a concentração de machos não castrados, essa diferença não é significativa.....	29
Figura 8.	Gráfico mostrando que a concentração de Fel d 1 em gatos machos castrados significativamente superior quando comparado com a concentração de Fel d 1 em fêmeas castradas.....	30
Figura 9.	Solução tópica moduladora de alérgenos, composta por colágeno hidrolizado, alantoína, pantenol e gel de aloe vera, utilizada nos gatos do grupo 1, após a aspiração do T0.....	38
Figura 10.	Sifão adaptador (Dustream collection ²) utilizado na aspiração das amostras, para retenção dos pelos e poeira da pelagem dos gatos.....	40
Figura 11.	Filtro (Dustream filters ³) utilizado para reter o material aspirado a partir animais incluídos em ambos grupos experimentais.....	40
Figura 12.	Momento da aspiração inicial (T=0) em um gato, utilizando aspirados de pó portátil.....	41
Figura 13.	Aplicação da solução moduladora de alérgenos em toda extensão da linha média dorsal, no momento T1, em um gato macho, orquiectomizado, adulto, incluído no projeto.....	42

Figura 14. Placa de Petri devidamente identificada, contendo a poeira fina, do material coletado por meio de aspiração.....	44
Figura 15. Centrifugação de 36 amostras, em 2500 rpm durante 20 minutos, na temperatura de 4°C, em uma centrífuga Eppendorf modelo 5810f.....	45
Figura 16. Placas com 96 poços utilizadas para o exame de ELISA, os 24 primeiros poços da placa A são da curva utilizada, os demais poços mostram forte reação para Fel d 1, na maioria das amostras incluídas no projeto.....	46
Figura 17. Demonstração das concentrações gerais de Fel d 1 entre os dois grupos (tratado e controle) no T0.....	48
Figura 18. Concentração média de Fel d 1 em cada um dos tempos com o tratamento com a solução moduladora de alérgenos.....	49
Figura 19. Concentração média de Fel d 1 em cada um dos tempos com o uso de água (A=T0, B=T1 e C=T2).....	50
Figura 20. Mostra de forma comparada as concentrações de Fel d 1 entre os dois grupos (tratado e controle) nos diferentes tempos de aspiração (T0 = primeira aspiração; T1 = uma hora após o uso do produto ou água; T2 = sete dias após o uso produto ou água).	51

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos, a prevalência das doenças alérgicas no mundo têm aumentado (Platts-Mills, 2009), e a rinite e a asma alérgicas são as doenças respiratórias crônicas mais frequentes do mundo industrializado e acometem entre 10 a 25% da população mundial (Casale e Dykewicz, 2004).

Na rinite alérgica observa-se resposta inflamatória da mucosa nasal após exposição a alérgenos ambientais, poluentes e irritantes primários, o que conduz à vasodilatação, edema de submucosa, congestão, espirros e prurido (Casale e Dykewicz, 2004; Camara et al., 2010).

A asma alérgica é caracterizada por aumento da resposta do tipo Th2 a alérgenos presentes e absorvidos pela mucosa bronquial, os quais conduzem ao aumento na produção de IgE alérgeno específico, desgranulação mastocitária, estimulação à inflamação eosinofílica, contração da musculatura lisa bronquial e broncoespasmo (Böttcher et al., 2003). Quando há cronificação da asma alérgica, podem ser observados, metaplasia epitelial, hipertrofia e hiperplasia da musculatura lisa bronquial, e fibroplasia peribronquial (Böttcher et al., 2003).

Como apresentam o mesmo espectro fisiopatológico de doença, a coexistência de doenças alérgicas no mesmo indivíduo é frequente, sendo estimado pela Academia Americana de Alergia, Asma e Imunologia que 38% dos pacientes com rinite tenham asma, e 78% dos pacientes com asma tenham rinite (Casale e Dykewicz, 2004).

Condições alérgicas como essas são capazes de reduzir a qualidade de vida social e econômica de seus portadores, seja pelo alto custo do tratamento, seja pela redução da sua produtividade (Casale e Dykewicz, 2004), além da estigmatização e absentismo escolar, mormente em crianças e pré-adolescentes.

A exposição a alérgenos de ácaros da poeira doméstica é considerada a principal causa de doenças alérgicas em humanos (Arruda, Santos e Ferriani, 2005; Platts-Mills, 2009). Entretanto, um aumento no número de relatos de alergia aos alérgenos do epitélio de gatos de estimação tem sido documentada.

Este fato está relacionado ao aumento do contato dos humanos com estes animais em ambientes domiciliares, como documentado pela Associação Americana de Produção de Produtos Pets que estimou que existam 93,6 milhões de donos de gatos nos EUA. A mesma pesquisa mostra que 33% dos proprietários têm pelo menos um gato, e 56% desses, tem mais de um (Portnoy et al., 2012).

As reações de hipersensibilidade a alérgenos do epitélio de gatos têm sido verificadas com maior frequência do que a observada em relação a outros animais de estimação, principalmente pelo maior contato dos gatos com seus proprietários, já que felinos geralmente frequentam os mesmos nichos de seus donos, além de apresentares, em comparação aos cães, menor tolerância aos banhos regulares, higienização e escovação de sua pelagem (Murray et al., 1983).

Os alérgenos de gatos geralmente apresentam natureza protéica, e tem sua origem nas secreções das glândulas perianal, sebácea e salivar, urina, saliva, escamas e pelos (Chapman e Wood, 2001; Eggleston e Bush, 2001; Platts-Mills, 2009; Portnoy et al., 2012). Suas concentrações no ambiente aumentam quando se aumenta o número de gatos, sendo que um gato introduzido em um ambiente, aumenta a concentração de Fel d 1 em apenas 30 minutos.

Outros fatores que contribuem para o aumento da concentração de alérgenos do epitélio de gatos no ambiente são a baixa ventilação e a presença de tapetes e carpete, que são os principais reservatórios (Portnoy et al., 2012).

Como geralmente estes alérgenos possuem menos de 5 μ m, estes permanecem suspensos no ar, independentemente da manipulação da poeira doméstica ou movimentação no ambiente domiciliar, o que faz com que suas concentrações no ar sejam superiores às observadas no piso, e sua inalação ocorram em quantidades de 10 a 100 vezes superiores às de alérgenos de ácaro (Portnoy et al., 2012).

O objetivo deste capítulo foi revisar os principais alérgenos provenientes do epitélio de gatos, sua origem, reações alérgicas e inflamatórias aos mesmos e formas de controle de suas concentrações ambientais.

2 ALÉRGENOS DE GATOS

Os alérgenos de gatos têm sido classificados de acordo com suas características biológicas e propriedades imunológicas (Portnoy et al., 2012). Seus principais alérgenos identificados são Fel d 1 (secretoglobulina), Fel d 2 (albumina), Fel d 3 (cistatina), Fel d 4 (lipocalina), Fel d 5 (IgA), Fel d 6 (IgM), Fel d 7 (proteína da glândula de Von Ebner - lipocalina) e Fel d 8 (laterina) (Portnoy et al., 2012; Lockey e Ledford, 2014) (Quadro 1).

Quadro 1: Origem, reatividade cruzada e índices de sensibilização dos principais alérgenos provenientes do epitélio de gatos.

ALÉRGENO	ORIGEM	REAÇÃO CRUZADA	SENSIBILIZAÇÃO
Fel d 1	Lipocalina Sebácea	-----	>90%
Fel d 2	Albumina Sérica	Albumina suína	20%
Fel d 3	Cistatina	Can f 1, Can f 2	60-90%
Fel d 4	Lipocalina	Equ c 1, Can f 6, Rat n 1, Mus n 1	63%
Fel d 5	IgA	-----	38%
Fel d 6	IgM	-----	-----
Fel d 7	Lipocalina	Can f 1 e lipocalina humana 1	38%
Fel d 8	Laterina	Equ c 4/5	19%

Fonte: Kelly, L.A., Erwin, E.A., Platts-Mills, T.A.E., 2012; Portnoy et al., 2012; Smith et al., 2013; Lockey e Ledford, 2014; Zahradnik e Raulf, 2014.

O Fel d 1 é o mais importante alérgeno do epitélio felino e responsável pela sensibilização em mais de 95% dos indivíduos alérgicos a gatos (Kaiser et al., 2007). Este não suscita reação cruzada e é produzido por gatos de todas as raças,

independente do gênero sexual e do comprimento da pelagem (Pereira, 2007; Portnoy et al., 2012).

O Fel d 1 é uma glicoproteína produzida nas glândulas sebáceas, anal e salivares (secretoglobulina), com peso molecular de 36kDa, e função biológica desconhecida (Kahradnik e Raulf, 2014). Este é encontrado na pele e pelagem dos gatos, sendo sua concentração na raiz folicular cerca de 10 vezes superior a das pontas dos pelos (Pereira, 2007; Kaiser et al., 2007). Bienboire-Frosini et al. (2012) citam que há diferença no peso molecular de Fel d 1, dependendo do sítio de produção do mesmo.

Os gatos produzem Fel d 1 na proporção de 3 a 7 μ g ao dia. Estes são estocados na pele e pelagem são distribuídos pelo corpo (Pereira, 2007) por lambedura principalmente (Grönlund et al., 2010). Sua quantidade nas amostras de pelos de gatos pode variar de 1 a 1770 μ g/g, com as maiores concentrações encontradas em pelos da região cervical. Estima-se que o total de Fel d 1 em um gato típico seja de 3 a 142 μ g/g com uma média de 67 μ g /g (Pereira, 2007).

Devido sua capacidade altamente adesiva e baixo peso molecular, o Fel d 1 pode ser encontrado em vários ambientes, mesmo sem a presença de gatos, e em concentrações capazes de precipitar reações alérgicas (Zahradnik e Raulf, 2014).

De acordo com Zahradnik e Raulf (2014), os principais vetores para a disseminação do Fel d 1 são as roupas e cabelo dos proprietários de gatos, sendo que mulheres carregam maior concentração de alérgeno, quando comparado aos homens, devido ao seu comportamento social de maior acolhimento ao felino.

Cyprowski et al. (2013) afirmaram em um estudo que o Fel d 1 foi encontrado em altas concentrações em creches e colégios infantis, em amostras coletadas do ar, piso, tapetes, camas e brinquedos de pelúcia.

O Fel d 2 é originário da albumina sérica felina e é onipresente em todos os gatos (Portnoy et al., 2012; Lockey e Ledford, 2014). Em um estudo com 117 pacientes alérgicos a gatos, 22% tinham IgE específico ao Fel d 2 (Lockey e Ledford, 2014). A reatividade cruzada entre a albumina felina e a albumina suína tem sido documentada por Portnoy et al. (2012).

O Fel d 3 é uma cistatina clonada a partir da pele de gato e caracteriza-se por uma proteína de 11KDa, contendo 98 aminoácidos (Lockey e Ledford, 2014). Este alérgeno mostrou 75 e 79% de homologia com cistatina A humana e bovina, respectivamente. Entre 60 e 90% das amostras de soro de indivíduos alérgicos a gatos apresentam IgE contra Fel d 3 (Portnoy et al., 2012).

O Fel d 4 é um alérgeno da família das lipocalinas, e foi encontrado primeiramente na saliva de gato e no tecido das glândulas salivares submandibulares (Lockey e Ledford, 2014). É uma causa importante de sensibilização alérgica, e apresenta reação cruzada com alérgenos de cavalo (Equ c 1), camundongo (Mus m 1), rato (Rat n 1), e cão (Can f 6).

O Fel d 4, Fel d 7, Can f 2 e Can f 6 são lipocalinas que podem causar reações cruzadas entre si (Lockey e Ledford, 2014), e 68 de 109 pacientes tiveram IgE específico para alérgenos de gatos e de cães (Portnoy et al., 2012).

Levando em consideração que o Fel d 4 é o segundo maior alérgeno de gatos, Lockey e Ledford (2014), observaram que metade dos indivíduos sensíveis ao Fel d 4, possuem níveis de IgE a este superiores aos níveis de IgE observados ao Fel d 1.

O Fel d 5 e o Fel d 6 são imunoglobulinas IgA e IgM, respectivamente, presentes principalmente na saliva felina (Lockey e Ledford, 2014). Um estudo com 81 pacientes humanos sensíveis a gatos, 38% apresentaram IgE específico ao Fel d 5, e uma quantidade semelhante ao Fel d 6 (Portnoy et al., 2012).

O Fel d 7 é um alérgeno da família das lipocalinas, como o Fel d 4. Cerca de 38% dos indivíduos alérgicos a gatos apresentam IgE para esse alérgeno, mas a concentração média de IgE específico a Fel d 7 é menor que a observada para Fel d 1, e somente 10% dos indivíduos alérgicos a gatos possuem níveis de IgE para Fel d 7 superiores aos observados para Fel d 1 (Lockey e Ledford, 2014).

O gene responsável pela produção de Fel d 7 é expressado somente nos tecidos linguais, e este constitui cerca de 0,3% das proteínas da saliva. O Fel d 7 é homólogo ao alérgeno de cão (Can f 1) e a lipocalina humana do tipo 1 (Smith et al., 2013; Lockey e Ledford, 2014;).

O Fel d 8 é uma laterina com peso molecular de 24 KDa. IgE específico ao Fel d 8 tem sido observado em cerca de 19% dos indivíduos alérgicos a gatos. Assim como o

Fel d 7, o Fel d 8 não foi encontrado em outros tecidos, mas enquanto o Fel d 7 é exclusivo de tecidos linguais, o Fel d 8 é produzido apenas pelas glândulas salivares submandibulares. O alérgeno de cavalo (Equ c 4/5) apresenta 42% de similaridade ao Fel d 8 (Smith et al., 2013; Lockey e Ledford, 2014).

3 ORIGEM E EXPOSIÇÃO A ALÉRGENOS DE GATOS

As concentrações de alérgenos de gato na poeira e no ar não estão bem definidas (Portnoy et al., 2012). Uma pequena correlação foi encontrada na concentração de alérgenos de gato entre o ar e a poeira em estudo de amostras no período de 24 horas (Portnoy et al., 2012).

Entretanto, a mensuração de alérgenos de gatos em poeira assentada não deve ser usado como substituto de exposição à partículas suspensas, já que o Fel d 1 tem partículas pequenas (<2µm), bem menores que a de alérgenos de ácaros da poeira doméstica, sendo detectados em maior quantidade em suspensão (Pereira, 2007).

Os alérgenos de gatos são ubiqüitários, resistentes e, por apresentar características aerodinâmicas, têm frequentemente sido encontrados mesmo em ambientes onde não existam gatos e/ou nunca houve contato com o animal, como prédios, escolas, escritórios, trens, ônibus, hospitais, bares, cinema, consultórios médicos e creches (Arbes et al., 2004; Bienboire-Frosini et al., 2012; Portnoy et al., 2012; Zahradnik e Raulf, 2014).

As partículas de alérgenos produzidas pelos gatos variam de 1 a 20 µm. Aproximadamente 60% das partículas de Fel d 1 permanecem por dois dias suspensas e as partículas menores podem permanecer no ar ambiente por até 14 dias ou mais.

Os níveis de Fel d 1 no ar podem ser detectados em todas as casas com gatos e aumentam de acordo com o aumento no número de gatos na casa (Pereira, 2007). A presença de um gato, mesmo que por apenas 30 minutos, aumenta a concentração de Fel d 1 no ambiente (Portnoy et al., 2012).

Fatores que contribuem para aumento da concentração de Fel d 1 no ambiente incluem pouca taxa de ventilação e a presença de mobiliário e estofados. As concentrações mais elevadas de Fel d 1 foram encontradas na sala de estar, em comparação com a poeira coletada de banheiros, cozinha e quartos, embora as camas possam conter as concentrações mais elevadas (Liccardi et al., 2000).

Outros reservatórios de alérgenos de gatos incluem superfícies dos ambientes em geral como paredes, móveis estofados e roupa de cama, o que dificulta muito sua

remoção total (Arbes et al., 2004). Em ambientes sem animais de estimação, os alérgenos tendem a ser mais uniformemente distribuídos pela casa (Pereira, 2007).

Os carpetes são eficientes reservatórios de Fel d 1 se comparado ao piso polido (Portnoy et al., 2012). Tapetes são o principal reservatório de alérgenos de animais domésticos em casas com animais de estimação, e o tipo de tapeçaria é determinante para a exposição (Pereira, 2007).

Como os alérgenos de gatos possuem um baixo peso molecular, o ato de movimentar a mobília, trocar a roupa de cama, varrer o piso ou passar o aspirador, é a forma mais comum de suspender o alérgeno por longos períodos, o que facilita sua inalação (Liccardi et al., 2000; Montoya e Hildemann, 2005; Woodfolk, 2005). A última aspiração do piso também influencia na concentração de alérgeno no ambiente (Pereira, 2007).

Alérgenos de gatos têm sido encontrados em maior concentração em casas com alta umidade. Por outro lado, níveis de Fel d 1 na poeira doméstica estão inversamente relacionados com umidade em casas sem gato (Portnoy et al., 2012).

A concentração de alérgenos de gatos e cães no ar e na poeira doméstica tendem a variar dentro da mesma casa e em relação a estação do ano, sendo os maiores níveis de alérgenos de gatos encontrados em amostras coletadas de camas na primavera e outono (Pereira, 2007).

Os alérgenos do gato são considerados um fator de risco importante no desenvolvimento da asma e rinite alérgicas (Herre et al., 2013; Patel et al., 2013). Cada alérgeno produz um índice de sensibilização diferente, sendo o Fel d 1 o mais importante.

Em estudo de Schäfer et al. (2009), citam que o aumento de exposição ao alérgeno, aumenta a sensibilização e sintomas de asma em crianças, independente da presença do gato.

4 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AOS ALÉRGENOS DO EPITÉLIO DE GATOS

Devido à urbanização, a impessoalidade dos relacionamentos humanos e aumento da longevidade da população, notados principalmente em grandes centros urbanos, a criação e a exposição aos animais de companhia em ambientes domiciliares têm aumentado nas últimas décadas (Chapman, 2001; Portnoy et al., 2012). Paralelamente, um crescimento da sensibilização e precipitação da rinite, asma e outras doenças alérgicas de caráter agudo ou perene, têm sido observado em crianças e adultos predispostos após a exposição a alérgenos provenientes de cães e gatos (Grönlund et al., 2010; Portnoy et al., 2011).

A asma é uma doença respiratória crônica, considerada de importância mundial, não somente pelo custo de tratamento, mas principalmente pela queda de produtividade e qualidade de vida do indivíduo acometido (Salo et al., 2008). Esta é caracterizada por episódios de inflamação, estreitamento de vias aéreas, sibilo, expectoração e tosse, sendo que concentrações de Fel d 1 menores que 1µg/g de poeira podem causar sensibilização, e superiores a 8 a 10µg/g podem precipitar crises, de acordo com estudo de Arbes et al. (2004).

Dutra (2001) realizou estudo com 773 crianças e adolescentes asmáticos, com idades entre sete e 14 anos, na qual 8,9% e 11,6% das crianças responderam positivamente ao teste de puntura com alérgenos de cão e gato, respectivamente. A frequência dos animais nos domicílios dos pacientes era de 59% de cão e 21% de gato (Dutra, 2001).

Apesar da frequência ambiental e a exposição a altas concentrações de alérgenos de animais ser comum, altos níveis de sensibilização na população exposta não são geralmente observados (Chapman e Wood, 2001). Este fato pode ser explicado pela resposta imunológica aos alérgenos de mamíferos serem diferentes da resposta observada contra insetos, ácaros e pólenes (Platts-mills, 2009).

A resposta a alérgenos de animais é mediada por linfócitos T- auxiliar tipo 2 (Th2) e liberação de IL-4, IL-5 e IL-13, que orquestra a síntese de IgE alérgeno-específica e, eventualmente, inflamação eosinofílica nos órgãos-alvo.

A exposição contínua a endotoxinas e alérgenos presentes na pele de cães e gatos pode modificar o perfil da resposta imunológica, minimizando a produção de IL-4 e de IgE alérgeno específica, aumentando a produção de IL-10 e IgG4 e, conseqüentemente, diminuindo a desgranulação de mastócitos e basófilos, o que conduz à maturidade imunológica e gera tolerância (Hesselmar et al., 2003; Gehring et al., 2004; Gern et al., 2004; Upham e Holt, 2005; Mandhane et al., 2009).

Existem evidências de que a exposição prematura (com menos de três meses de vida) a alérgenos de animais pode exercer efeito protetor em alguns indivíduos, porém as evidências não são fortes o suficiente para se recomendar a exposição a animais como forma de prevenção (Portnoy et al., 2012). Liccardi et al. (2005), avaliando a exposição de adolescentes e adultos aos gatos, mostrou uma menor reação ao teste cutâneo intradérmico quando comparado com indivíduos que não conviviam com os gatos, sendo que todos os indivíduos do estudo apresentavam sintomas respiratórios de resposta alérgica.

5 CONTROLE AMBIENTAL DOS ALÉRGENOS PROVENIENTES DO EPITÉLIO DE GATOS

A identificação das fontes de exposição e a remoção dos mesmos podem ser utilizadas como forma de controle da alergia aos alérgenos de gatos.

Protocolos de tratamento de doenças alérgicas precipitadas ou intensificadas por alérgenos do epitélio de animais envolvem a minimização das concentrações dos alérgenos no ambiente.

Casas com animais de estimação contêm 250 vezes mais alérgenos do que casas sem animais (Custovic et al., 1997) e a remoção do animal do ambiente domiciliar é capaz de reduzir a quantidade de seus alérgenos em até quatro meses, entretanto, esta medida encontra resistência e pouca adesão dos proprietários (Portnoy et al., 2012). Manter animais em ambientes externos é uma resolução parcial, já que o contato da família com este pode tornar as pessoas transportadores passivos de seus alérgenos para o ambiente domiciliar (Erwin et al., 2005).

Alternativas à exclusão do contato com o animal de estimação é a remoção de materiais alergênicos produzidos por estes. Esta orientação constitui uma importante medida preventiva, não apenas para alérgenos de cães e gatos, mas também para alérgenos de ácaros, visto que as escamas dos animais domésticos representam um alimento ideal para estes artrópodes (Liccardi et al., 2000).

Assim, a limpeza ambiental periódica com aspiração do pó, a utilização de filtros de ar e a remoção de reservatórios potenciais como tapetes e estofados devem ser sempre indicadas (Portnoy et al., 2011). Em adição, a escovação da pelagem e banhos frequentes nos animais podem colaborar para minimização das concentrações de alérgenos de animais em ambientes domiciliares (Naydenov, 2008).

Características dos gatos como o comprimento da pelagem, gênero sexual e a castração não estão associadas com as concentrações de Fel d 1 no ambiente. Liccardi et al. (2000) citam que o efeito da castração em fêmeas não altera a concentração de Fel d 1, e que machos, mesmo castrados, continuam produzindo o alérgeno em concentrações capazes de sensibilizar quem entre em contato. Entretanto, outro estudo documentou que gatos esterilizados possuíam menos Fel d 1 do que

gatos inteiros, possivelmente por influência da testosterona, que causa hiperplasia e aumento da produção sebácea em animais púberes. Assim, pela ausência de dados conclusivos, as intervenções relacionadas com esses fatores não tem sido recomendadas (Portnoy et al., 2012).

6 CONCLUSÃO

São conhecidos oito alérgenos provenientes do epitélio de gatos denominados, de acordo com suas características biológicas e imunológicas, de Fel d 1 (secretoglobulina), Fel d 2 (albumina sérica), Fel d 3 (cistatina), Fel d 4 (lipocalina), Fel d 5 (IgA), Fel d 6 (IgM), Fel d 7 (lipocalina) e Fel d 8 (laterina). O Fel d 1 e o Fel d 4 são responsáveis por mais de 90% da sensibilização em pessoas alérgicas a gatos. Estes se disseminam em diversos ambientes, mesmo na ausência destes animais, e se mantêm longos períodos em suspensão, o que faz com que sejam inalados em grandes concentrações e de forma contínua, sendo capazes de precipitar crises alérgicas em indivíduos suscetíveis.

As principais formas de controle de suas concentrações ambientais são por meio de aspiração e limpeza periódica do ambiente e a retirada de prováveis reservatórios para o alérgeno, como por exemplo tapetes e carpetes.

Já o estado reprodutivo, o comprimento da pelagem e gênero sexual têm resultados conflitantes em relação aos efeitos sobre na produção de alérgenos, e mais estudos são requeridos para definição e delineamento de suas reais indicações.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arbes SJ, Cohn RD, Yin M, Muilenberg ML, Friedman W, Zeldin DC. *Journal allergy clin immunology*. 114(1): 111-117; 2004.
- Bienboire-Frosini C, Cozzi A, Lafont-Lecuelle C, Vervloet D, Ronin C, Pageat P. *The Veterinary Journal*. 193: 162-167; 2012.
- Bienboire-Frosini C, Lebrum R, Vervloet D, Pageat P, Ronin C. *Journal Investig Allergol Clin Immunol*. 22(4): 270-279; 2012.
- Chapman MD, Wood RA. The role and remediation of animal allergens in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107 (Suppl.) (3):414- 421.
- Emara M, Royer PJ, Abbas Z, Sewell HF, Mohamed GG, Singh S, Pul S, Fox J, Shakib F, Martinez-Pomares L, Ghaemmaghani AM. *The journal of biological chemistry*. 286:13033-13040; 2011.
- Gehring U, Bischof W, Schlenvoigt G, Richter K, Fahlbusch B, Wichmann HF, Heinrich J. Exposure to house dust endotoxin and allergic sensitization in adults. *Allergy, UK*, v. 59, p. 946-952, 2004.
- Gern JE, Reardon CL, Hoffjan S, Nicolae D, Li Z, Roberg RN, Neaville WA, Carlson-Dakes RN, Adler K, Hamilton R, Anderson E, Gilbertso-White S, Tisler C, Silva D, Anklam K, Mikus LD, Rosenthal LA, Ober C, Gangnon R, Lemanske RF. Effects of dog ownership and genotype on immune development and atopy in infancy. *J Allergy ClinImmunol*, v. 113, p. 307- 314, 2004.
- Grönlund K, Saarne T, Almquist C, Wickman M, Van Hage M. *Pediatr Allergy Immunol*, 21: 277-283; 2010.
- Herre J, Grönlund H, Brooks H, Hopkins L, Waggoner L, Murton B, Gangloff M, Opaleye O, Chilvers ER, Fitzgerald K, Gay N, Monie T, Bryant C. *The journal of immunology*. 191: 1529-1535; 2013.
- Kaiser L, Grönlund H, Sandalova T, Ljunggren HG, Van Haye M, Achour A, Schneidr G. *The journal of biological chemistry*. 278: 37730-37735; 2003.
- Mandhane Pj, Sears MR, Poulton R, Greene JM, Wendy Lou WY, Taylor R, Hancox RJ. Cats and dogs the risk of atopy in childhood and adulthood. *J Allergy ClinImmunol*, v.124, n.4, p.745-750, 2009.

Liccardi G, Cazzola M, D'Amato M, D'Amato G. Respiratory medicine. 94: 1109-1118; 2000.

Lockey RF, Ledford DK. Allergens and Allergen Immunotherapy – Subcutaneous, sublingual and oral. 5th ed. Boca Raton: CRC Press; 2014.

Montoya L, Hildemann LM. Journal of aerosol science. 36: 735-749; 2005.

Murray AB, Ferguson AC, Morrison BJ. The frequency and severity of cat allergy vs. Dog allergy in atopic children. Journal Allergy Clin Immunol. 1983; 72(2):145-9.

Naydenov K, Popov T, Mustakov T, Melikov A, Bornehag CG, Sundell J. The association of pet keeping at home with symptoms in airways, nose and skin among Bulgarian children. Pediatr Allergy Immunol. 2008; 19(8):702-8.

Oliveira APF. Comportamento social de machos e fêmeas castrados do gato doméstico (*Felis catus* L.) em confinamento (Dissertação de Mestrado). Ribeirão Preto, SP: Universidade de São Paulo; 2002.

Patel D, Couroux P, Hickey P, Salapatek AM, Laidler P, Larché M, Hafner RP. Journal allergy clin immunology. 131: 103-109; 2013.

Pereira VAR. Variação sazonal nas concentrações de aeroalérgenos em diferentes níveis de poluição ambiental (Tese de Doutorado). São Paulo, SP: Universidade de São Paulo; 2007.

Portnoy JM, Kennedy K, Subletti JL, Phipatanakul W, Matsui E, Barnes C, Grimes C, Miller JD, Seltzer JM, Williams PB, Bernstein JA, Bernstein DI, Belssing-Moore J, Cox L, Khan DA, Lang DM, Nicklas RA, Oppenheimer J. Ann allergy asthma immunology. 108(4): 223.e1-223.15; 2012.

Salo PM, Arbes, SJ, Crockett PW, Thorne PS, Cohn RD, Zeldin DC. Journal allergy clin immunology. 121(3) 678-684; 2007.

Smith W, O'Neil SE, Hales BJ, Chai TLY, Hazele LA, Tanyaratsrisakul S, Piboonpocanum S, Thomas WR. International Archives os Allergy and Immunology. 156:159-170; 2011.

Upham JW, Holt PG. Environment and development of atopy. CurrOpinImmunol. 2005; 5:167-172.

Woodfolk J. Clinical reviews in allergy and immunology. 28: 43-58; 2005.

Zahradnik E, Raulf M. Frontiers in immunology. 5:76 1-21; 2014.

CAPÍTULO 2

INFLUÊNCIA DO GÊNERO SEXUAL E DA CASTRAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE FEL D 1 NA PELAGEM DE GATOS (*Felis catus domestica*)

RESUMO

Os alérgenos provenientes do epitélio de gatos têm sido identificados como fatores extrínsecos envolvidos na precipitação e exacerbação da rinite e asma alérgicas em crianças e adultos suscetíveis, com índices que variam de 10 a 25%. O principal alérgeno proveniente do epitélio dos gatos é o Fel d 1, responsável por 90% das reações alérgicas a estes. O Fel d 1 é uma secretoglobulina, produzida pelas glândulas anal, sebácea e salivares, e pelas células da camada granulosa da pele. Este é altamente aderente, de peso molecular de 36 kDa e alta capacidade de permanecer em suspensão, o que facilita sua inalação. Um gato é capaz de produzir três a 7µg de Fel d 1 ao dia, independente do seu gênero sexual, raça, idade, peso ou estado reprodutivo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a influência do gênero sexual e do estado reprodutivo nas concentrações de Fel d 1 na pelagem dos gatos. Foram avaliados 66 gatos hígidos, independente de raça, peso, com idade superior a um ano, divididos em 34 machos (22 orquiectomizados e 12 não orquiectomizados) e 32 fêmeas (20 ovariectomizadas e 12 não ovariectomizadas), provenientes de domicílios múltiplos gatos. Todas as amostras coletadas por aspiração e os níveis de Fel d 1 analisadas pelo método de imunoenensaio enzimático (ELISA). Todos os dados foram analisados pelo método de ANOVA e Bonferroni, e a estimativa da diferença entre as médias em relação aos grupos foi estimado pelo Teste T Student, com nível de significância adotado de 5% ($p \leq 0,05$). Os 66 gatos avaliados tinham Fel d 1 na pelagem, sendo sua concentração média de $2,35 \pm 1,29$. O gênero sexual não influenciou nas concentrações de Fel d 1 ($p > 0,05$), porém gatos machos e fêmeas castrados apresentavam maiores concentrações de Fel d 1 em sua pelagem ($p \leq 0,05$). Assim, as concentrações de Fel d 1 possui pouco influência hormonal, e devido sua origem salivar, sua presença estão mais relacionados aos hábitos inerentes dos gatos de se higienizarem frequentemente.

Palavras-chave: Alergia, Asma, Fel d 1, Gatos, Rinite.

INFLUENCE OF SEXUAL GENDER AND CASTRATION ON FEL D 1 CONCENTRATION IN THE FUR OF DOMESTIC CATS (*Felis catus domestica*)

ABSTRACT

The allergens from the epithelium of cats have been identified as extrinsic factors involved in precipitation and exacerbation of allergic rhinitis and asthma in susceptible children and adults, with rates ranging 10-25%. The main allergen derived from the epithelium of the cat Fel d 1 is responsible for 90% of these allergic reactions. The Fel d 1 is a secretoglobulin, produced by the anal sebaceous and salivary glands, and the granulosa cell layer of the skin. This highly adhesive, molecular weight of 36 kDa and high ability to remain in suspension, which facilitates its inhalation. A cat can produce three to 7µg Fel d 1 a day, irrespective of their gender, race, age, weight or reproductive status. The aim of this study was to evaluate the influence of gender and reproductive state on concentrations of Fel d 1 in the fur of cats. 66 healthy cats were evaluated, regardless of race, weight over one year of age, divided into 34 males (22 castrated and non-castrated 12) and 32 females (20 and 12 ovariohisterectomizadas not ovariohisterectomizadas), from multiple cats households. All samples collected by aspiration and the levels of Fel d 1 analyzed by enzyme immunoassay method (ELISA). All data were analyzed by ANOVA and Bonferroni method, and the estimate of the difference between the means in the groups was estimated by Student's t test, with significance level of 5% ($p \leq 0.05$). The 66 cats evaluated had Fel d 1 in the coat, and their mean concentration of 2.35 ± 1.29 . The gender did not influence the concentrations of Fel d 1 ($p > 0,05$), but cats neutered males and females had higher concentrations of Fel d 1 in their coat ($p \leq 0.05$). Thus, concentrations of Fel d 1 has little influence hormone, salivary and because its origin, its presence is related to the inherent habits of cats higienizarem frequentemente.

Key-words: Allergy, Asthma, Cats, Fel d 1, Rhinitis.

1 INTRODUÇÃO

Os alérgenos provenientes do epitélio de gatos têm sido identificados como fatores extrínsecos envolvidos na precipitação e exacerbação da rinite e asma alérgicas em crianças e adultos suscetíveis, com índices que variam de 10 a 25% (Portnoy et al., 2012; Patel et al.; 2013).

O principal alérgeno proveniente do epitélio dos gatos é o Fel d 1, responsável por 90% da sensibilização e reações alérgicas aos gatos. Este alérgeno é uma secretoglobulina, produzida pelas glândulas salivares, sebáceas, anais e lacrimais de gatos, e é depositado na pelagem (Portnoy et al., 2012;).

Liccardi et al. (2000) observaram que a concentração de Fel d 1 pode ser influenciada pela localização anatômica, uma vez que encontraram uma concentração 10 vezes maior na face quando comparado à região cervical.

O Fel d 1 possui baixo peso molecular, em torno de 36Kda, e por isso permanece a maior parte do tempo em suspensão. Além disso, possui alta capacidade adesiva e distribuição ubiqüitária (Zahradnik e Raulf, 2014).

Bienboire-Frosini et al. (2012) demonstraram que o Fel d 1 é encontrado em diversos ambientes, independente da presença de gatos, como escolas, hospitais, creches, consultórios médicos, ônibus, trens, sendo seus principais reservatórios as paredes, móveis estofados, tapetes e carpetes.

Características dos gatos como o comprimento da pelagem, gênero sexual e estado reprodutivo não estão associadas com as concentrações de Fel d 1 no ambiente (Portnoy et al., 2012). A castração em fêmeas não altera a concentração de Fel d 1, e machos castrados continuam produzindo o alérgeno em concentrações capazes de sensibilizar as pessoas que entrarem em contato (Liccardi et al., 2000).

Com relação aos machos castrados, Chapman e Wood (2001) observaram que possuem uma concentração de Fel d 1 inferior, quando comparado com os não castrados, levando em conta a influência da testosterona, que causa hiperplasia e aumento da produção sebácea em animais púberes (Chapman e Wood, 2001). Entretanto, segundo Portnoy et al. (2012), a ausência de dados conclusivos sobre a

influência da castração dos gatos na produção de Fel d 1 faz com que o método não seja recomendado a fim de reduzir a produção do alérgeno.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar a concentração de Fel d 1 na pelagem de gatos provenientes de ambientes com múltiplos animais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se há diferença na concentração de Fel d 1 na pelagem de gatos em relação ao gênero sexual;
- Avaliar se há diferença na concentração de Fel d 1 na pelagem de gatos machos inteiros e orquiectomizados;
- Avaliar se há diferença na concentração de Fel d 1 na pelagem de gatos fêmeas inteiras e ovariectomizadas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo transversal, com amostras de conveniência e não randomizado em gatos machos e fêmeas, inteiros e castrados.

3.2 COMITÊ DE ÉTICA

O estudo respeitou a Resolução Normativa No. 1, de 9 de Julho de 2010, que dispõe sobre as normas de boas práticas clínicas (VICH GL9) na utilização de animais

em protocolos experimentais, e obteve aprovação do Comitê de Ética para Utilização de Animais em Pesquisa da PUCPR, sob protocolo de número 830 (ANEXO 1).

3.3 SELEÇÃO DOS ANIMAIS E GRUPOS DE ESTUDO

3.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos no estudo 66 gatos hígidos, independente do tamanho, peso e raça, oriundo de ambientes com múltiplos gatos.

Os gatos selecionados foram separados nos seguintes grupos de acordo com o gênero sexual e o estado reprodutivo:

Grupo 1: Composto por 22 gatos machos orquiectomizados;

Grupo 2: Composto por 12 gatos machos inteiros;

Grupo 3: Composto por 20 gatos fêmeas ovariectomizadas;

Grupo 4: Composto por 12 gatos fêmeas inteiras.

Todos os animais incluídos não podiam ter ecto ou endoparasitoses, dermatopatias, ou estarem recebendo banhos ou tratamento acaricida de forma regular.

3.3.2 Critérios de exclusão e perda amostral

Foram excluídos do estudo animais com idade inferior a um ano, fêmeas gestantes, e considerado perda amostral e substituídos, gatos que se mostrassem irascíveis durante o manuseio.

3.3.3 Coleta das amostras

Todos os gatos foram avaliados clinicamente e em seguida submetidos à aspiração para coleta da poeira associada à sua pelagem.

As aspirações foram realizadas com aspirador de pó portátil¹, ao qual foi acoplado um adaptador junto ao sifão² (Figura 1A) de sucção. Entre as duas partes do adaptador foi acondicionado um filtro específico³ (Figura 1B) cuja função era reter o material aspirado.

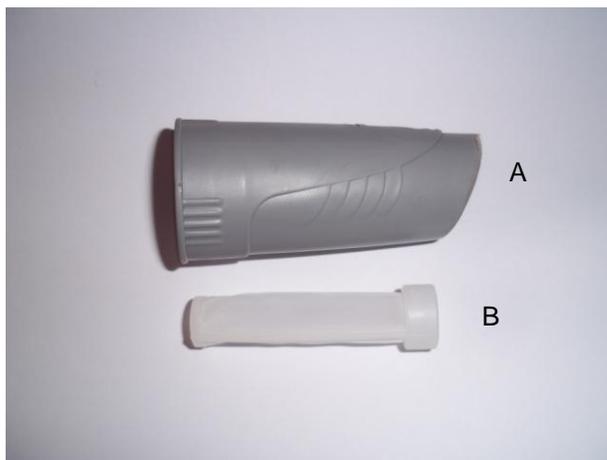


Figura 1- A – Sifão adaptador Dustream collection (Indoor Biothechnologies-Charlottesville USA) utilizados para o encaixe do filtro para coleta das amostras; B – Filtro coletor Dustream filters (Indoor Biothechnologies - Charlottesville USA) utilizado para reter a poeira durante a aspiração dos animais incluídos no projeto.

Fonte: O Autor, 2014.

Para a aspiração os animais foram devidamente contidos e o aspirador passado em toda extensão do corpo, iniciando-se pela região cervical, seguindo-se pelo tronco, abdome, região inguinal, axila, cauda e períneo (Figura 2).

Cada animal foi aspirado por um período de dois minutos. Entre cada aspiração, foi realizado a limpeza do sifão com álcool 70%.

¹ Aspirador portátil Consul 127v 60 Hz.

² Sifão Dustream Collection – Indoor Biothechnologies – Charlotesville USA

³ Filtro Dustream Filters – Indoor Biothechnologies – Charlotesville USA

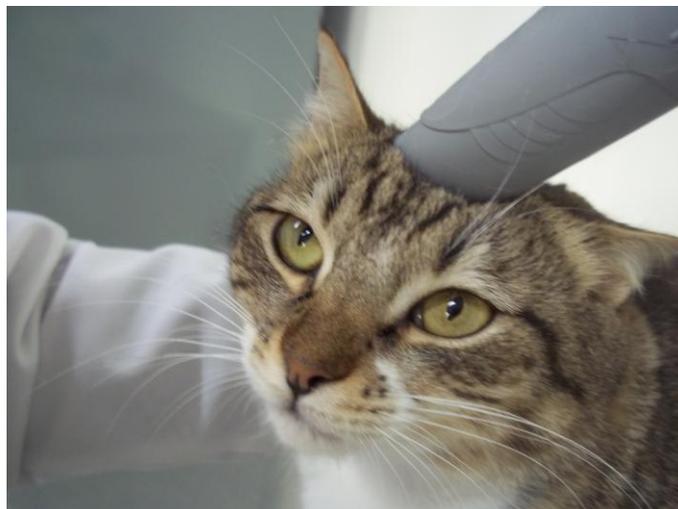


Figura 2 – Gato, mestiço, fêmea, ovariectomizada, no momento da aspiração para coleta da amostra de poeira da pelagem e posterior análise da concentração de Fel d 1. Fonte: O Autor, 2014.

3.3.4 Acondicionamento das amostras

Após a coleta de cada amostra, o filtro contendo a poeira foi acondicionado em envelope plástico e identificado com etiqueta adesiva. Todas as amostras coletadas foram armazenadas e mantidas refrigeradas entre 0 a 4°C, para posterior preparo e realização do imunoenensaio enzimático (ELISA) alérgeno específico.

3.3.5 Avaliação das concentrações de Fel d 1 presente nas amostras

3.3.5.1 Preparo das amostras

Todo o preparo e avaliação das amostras foi realizado no Laboratório de Imunologia e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Campus de Ribeirão Preto. As amostras coletadas a partir da pelagem dos gatos foram retiradas do filtro, friccionadas contra uma malha de 0,3 mm de diâmetro⁴ com uma pá de plástico de pesagem e peneiradas, permanecendo na placa de Petri apenas a poeira fina (Figura 3).

⁴ Peneira Standard Sieve Series A.S.T.M. – EUA.

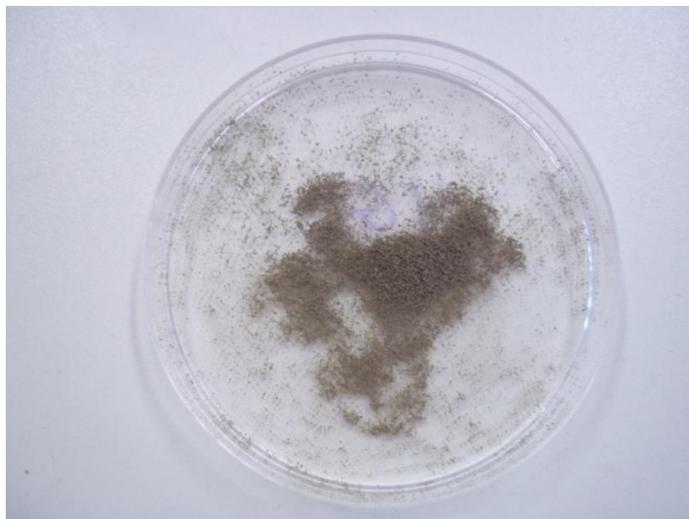


Figura 3 – Peneira com malha de 0,03mm (Standard Sieve Series A.S.T.M- EUA) contendo pelos e placa de Petri devidamente identificada contendo amostra peneirada a partir de um gato. Fonte: O Autor, 2014.

O volume de PBS-T utilizado foi de 1mL para cada amostra, sendo acondicionada em tubos de ensaio vedado para a suspensão em homogeneizador em pernoite, a 4^oC (Figura 4).



Figura 4 – Suspensão das amostras no homogeneizador Biomixer, pelo período de 8 horas em pernoite, para remoção do alérgeno da poeira, ficando concentrado na solução. Fonte: O Autor, 2014.

Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm, a 4^oC por 20 minutos. O sobrenadante (aproximadamente 1,5 ml) é acondicionado em tubo Eppendorf[®] devidamente identificado e armazenado a -20^oC, para realização da leitura.

3.3.5.2 Análise das concentrações do Fel d 1

As concentrações do Fel d 1 foram determinados por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) descrito por Chapman et al. (1988).

Placas de microtitulação foram cobertas com 1 µg/poço do anticorpo monoclonal 6F9 (anti Fel d 1) em tampão carbonato- bicarbonato 50mM, pH 9,6. Em seguida, as placas foram mantidas a 4^oC por 18 horas.

Após três lavagens com PBS-T, as placas foram bloqueadas usando 0,1 mL de 1% de BSA PBS-T por uma hora à temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS-T foram adicionados 0,1 mL do extrato da poeira a ser testado, usando 1% BSA PBS-T como diluente. As amostras foram diluídas 1:20 e as placas foram mantidas por uma hora à temperatura ambiente.

Uma curva controle foi estabelecida a partir de um extrato de referência de Fel d 1 UVA 94/01. Diluições em duplicata do extrato de referência Fel d 1 UVA 94/01 foram utilizadas para fazer a curva controle, com concentrações de 0,04 mU/mL a 20 mU/mL. Novamente as placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente.

Após três lavagens com PBS-T; foram adicionados 0,1 mL do anticorpo monoclonal biotilado 3E4, diluído em 1% de BSA PBS -T por uma hora.

Em seguida, cinco lavagens com PBS-T foram realizadas e foram adicionados 0,1 mL Streptavidina- Peroxidase diluídos em 1% de BSA PBS-T, por 30 minutos. Após cinco lavagens com PBS-T, foi adicionado 0,1 mL de ABTS 1mM em tampão Citrato-Fosfato, pH 4,2 contendo 0,03% de H₂O₂, para desenvolver a reação.

A leitura das placas foi realizada em leitor de microplacas de ELISA quanto à absorvância do topo da curva controle alcançou 2,0 a 2,4 ($\lambda=405\text{nm}$). A preparação de referência UVA 94/01 foi sub-padronizada contra a referência de caspa de gato (“catdander”) CBER E5, que contém 9,7 U/mL de Fel d 1 (1 unidade = 4 μg de proteína).

3.3.6 Análise estatística

Todos os dados foram registrados em média, desvio ou erro padrão da média, e avaliados com o *Software Statistica - Statsoft®* e *Software estatístico GraphPad Prism* versão 3.0 for Windows, San Diego – Califórnia, EUA.

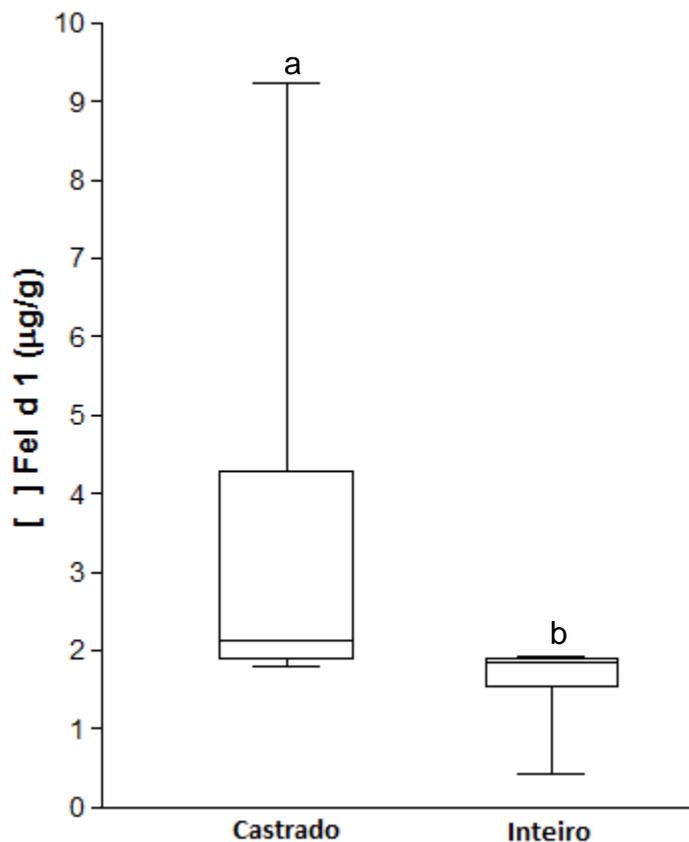
Para a análise estatística das concentrações de alérgenos foi utilizado o teste de ANOVA a um critério, seguido do teste de Bonferroni para comparações entre médias, associado com Teste t-student.

O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

O Fel d 1 foi identificado em todas as amostras coletadas dos 66 gatos avaliados, sendo sua concentração média de $2,35 \pm 1,29 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira.

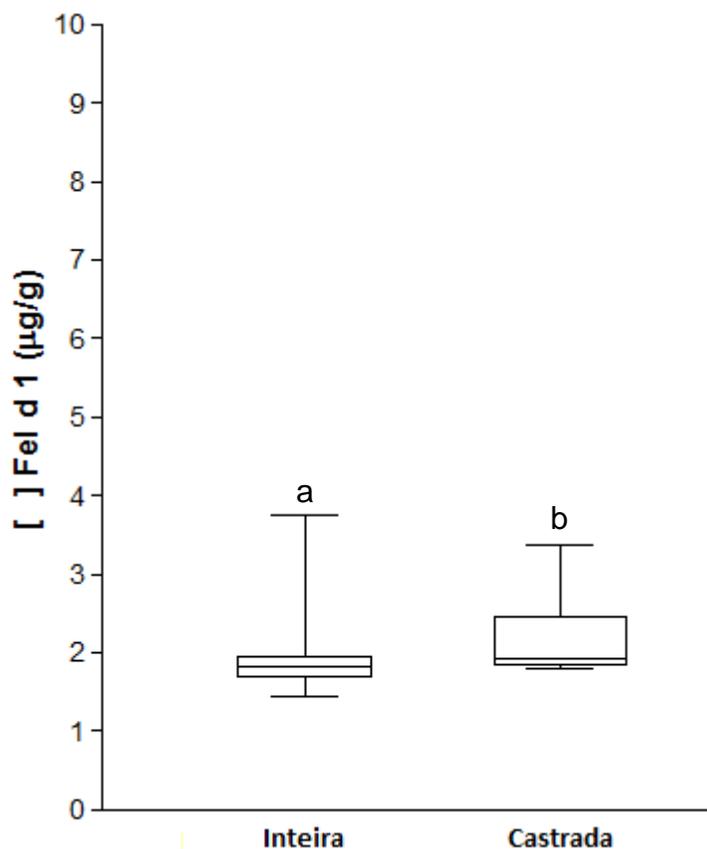
A castração, a concentração média encontrada nos gatos machos orquiectomizados foi de $3,12 \pm 0,40 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira, sendo significativamente superior à encontrada em gatos machos inteiros ($p= 0,01$), nos quais a média foi de $1,57 \pm 0,15 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira (Figura 5).



Letras diferentes significam $p < 0,01$.

Figura 5 – Concentrações médias de Fel d 1 entre gatos machos orquiectomizados e inteiros, mostrando que os gatos castrados possuem uma concentração significativamente maior de alérgeno quando comparado com gatos inteiros ($p= 0,01$).
Fonte: O Autor, 2014.

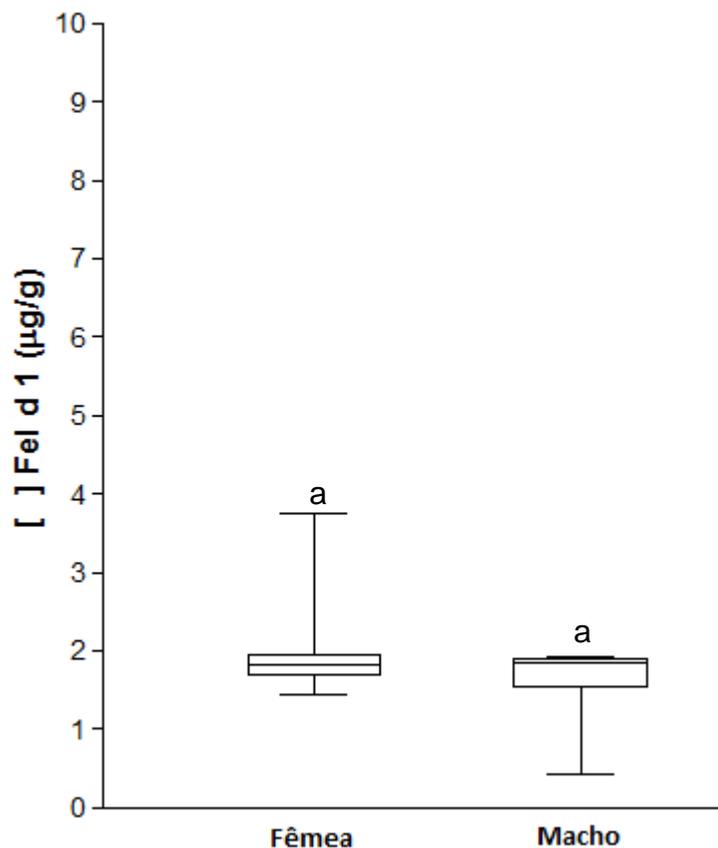
A concentração média do alérgeno Fel d 1 encontrada nos gatos fêmeas ovariectomizadas foi de $2,24 \pm 0,12 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira, e foi significativamente superior a encontrada em gatos fêmeas inteiras, nos quais as concentrações médias foram de $1,93 \pm 0,17 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira ($p=0,003$) (Figura 6).



Letras diferentes significam $p=0,003$.

Figura 6 – Concentrações médias de Fel d 1 entre gatos fêmeas ovariectomizadas e inteiras, mostrando que os gatos castrados possuem uma concentração significativamente maior de alérgeno quando comparado com animais inteiros. Fonte: O Autor, 2014.

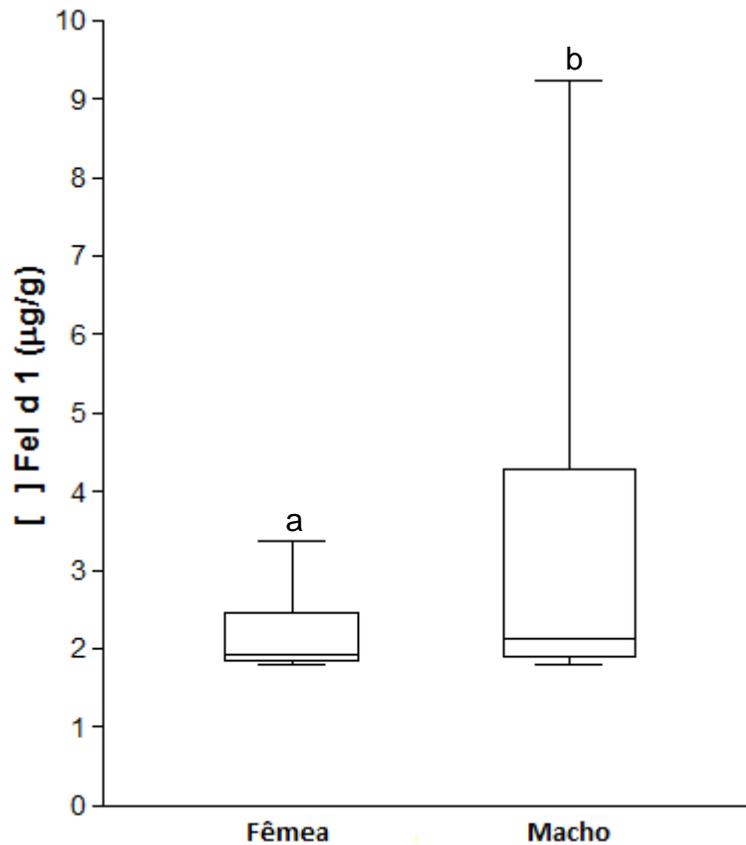
No que se refere ao gênero ao sexual, a concentração de Fel d 1 na pelagem de gatos machos foi de $1,57 \pm 0,15 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira, e foi semelhante a observada em gatos fêmeas, cuja média foi de $1,93 \pm 0,17 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira ($p=0,13$) (Figura 7).



Letras iguais significam $p=0,13$.

Figura 7 - Concentração de Fel d 1 em gatos fêmeas não castradas e machos não castrados, essa diferença não é significativa. Fonte: O Autor, 2014.

Na avaliação da concentração de Fel d 1 entre machos e fêmeas castradas, observa-se que os machos possuem um concentração significativamente maior, quando comparado com as fêmeas, sendo que a concentração média nos machos foi $3,12 \pm 0,40 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira e das fêmeas $2,24 \pm 0,13 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira ($p=0,04$) (Figura 8).



Letras diferentes significam $p=0,04$.

Figura 8 - Concentração de Fel d 1 em gatos machos castrados significativamente superior quando comparado com a concentração de Fel d 1 em fêmeas castradas. Fonte: O Autor, 2014.

5 DISCUSSÃO

O alérgeno mais importante do gato, o Fel d 1, foi encontrado em todas as amostras estudadas, o que é consonante com diversos trabalhos, que demonstraram que este é encontrado em todos os gatos, independente de raça, idade, gênero sexual e estado reprodutivo (Pereira, 2007; Portnoy et al., 2012).

A concentração média encontrada no presente estudo foi de $1,59 \mu\text{g/g}^{-1}$, e embora os animais incluídos no estudo habitassem em ambientes com múltiplos gatos, e não eram escovados ou banhados regularmente, a concentração de Fel d 1 em sua

pelagem foi considerada baixa, e apesar de ser baixa, com essa concentração de alérgeno observada, o indivíduo humano pode ser sensibilizado.

Estudos pregressos demonstraram que os gatos podem produzir Fel d 1 em uma concentração de 3 a 7 μg por grama de poeira ao dia, e conter em sua pelagem concentrações médias de até 67 $\mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira (Pereira, 2007).

Porém, estas análises foram realizadas a partir da água após banho dos animais, o que pode ter superestimado a quantidade de alérgeno presente na pelagem destes, em relação à técnica de aspiração empregada no presente estudo, que mais se assemelha à realidade clínica, onde os contactantes expostos aos gatos inalam seus alérgenos.

Grönlund et al. (2010) observaram que as concentrações de Fel d 1 são superiores na face, em relação ao restante do corpo, e no presente trabalho, a aspiração foi realizada de forma homogênea, o que permitiu uma impressão da quantidade média de alérgeno que os proprietários de gatos estão expostos.

O valor da concentração média de Fel d 1 nos gatos machos foi similar a concentração média encontrada nas fêmeas, o que é justificado pelo fato de o Fel d 1 ter origem predominantemente salivar e há pouca influência hormonal em sua síntese.

Assim sendo, talvez o principal determinante para as concentrações de Fel d 1 da pelagem não esteja relacionado ao gênero sexual, raça ou comprimento da pelagem, e sim, ao hábito inerente aos felinos de se lamberem e se higienizarem constantemente, permitindo a disseminação do alérgeno em sua pelagem.

Quando comparados machos e fêmeas castrados com os animais inteiros, observou-se que as concentrações de Fel d 1, foram significativamente maiores nos gatos castrados. Essa consideração é relevante, uma vez que a grande maioria dos proprietários de gatos prefere mantê-los domiciliados, com menor possibilidade de fuga, e o submete à castração, com o objetivo de anular sua natureza instintiva de comportamento predominantemente noturno, hábitos belicosos, territorialistas, de passeios para caça e cruza (Oliveira, 2002).

Entretanto, os animais castrados e domiciliados tendem ao sedentarismo, a obesidade e não conseguem se limpar por completo, o que pode favorecer a manutenção de Fel d 1 em sua pelagem.

Outro fator importante é que estes animais predominantemente domiciliados desenvolvem comportamentos compulsivos e se lambem mais frequentemente que animais de vida livre, o que favorece a maiores concentrações e disseminação de Fel d 1 em sua pelagem (Pereira, 2007).

Outro fato relevante é que devido também a natureza proteica e fortemente adesiva do Fel d 1, estes tendem a permanecer mais tempo acumulados na pelagem, o que torna estes animais fatores de risco para humanos alérgicos expostos.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir que:

- Gatos, independente de suas características, produzem e distribuem Fel d 1 em sua pelagem.
- Não existe diferença na concentração de Fel d 1 em relação ao gênero sexual, quando os animais não são castrados.
- Gatos machos castrados possuem maior concentração de Fel d 1 em sua pelagem, quando comparado com fêmeas castradas.
- Gatos castrados, independente do gênero sexual, possuem maior concentração de Fel d 1 em sua pelagem, quando comparados aos animais inteiros.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bienboire-Frosini C, Lebrum R, Vervloet D, Pageat P, Ronin C. *Journal Investig Allergol Clin Immunol*. 22(4): 270-279; 2012.
- Bienboire-Frosini C, Cozzi A, Lafont-Lecuelle C, Vervloet D, Ronin C, Pageat P. *The Veterinary Journal*. 193: 162-167; 2012.
- Chapman MD, Wood RA. The role and remediation of animal allergens in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2001; 107 (Suppl.) (3):414- 421.
- Grönlund K, Saarne T, Almquist C, Wickman M, Van Hage M. The major cat allergen, Fel d 1, in diagnosis and therapy. *Pediatr Allergy Immunol*, 21: 277-283; 2010.
- Kaiser L, Grönlund H, Sandalova T, Ljunggren HG, Van Hage M, Achour A, Schneider G. *The journal of biological chemistry*. 278: 37730-37735; 2003.
- Liccardi G, Cazzola M, D'Amato M, D'Amato G. *Respiratory medicine*. 94: 1109-1118; 2000.
- Lockey RF, Ledford DK. *Allergens and Allergen Immunotherapy – Subcutaneous, sublingual and oral*. 5th ed. Boca Raton: CRC Press; 2014.
- Naydenov K, Popov T, Mustakov T, Melikov A, Bornehag CG, Sundell J. The association of pet keeping at home with symptoms in airways, nose and skin among Bulgarian children. *Pediatr Allergy Immunol*. 2008; 19(8):702-8.
- Oliveira APF. *Comportamento social de machos e fêmeas castrados do gato doméstico (Felis catus L.) em confinamento (Dissertação de Mestrado)*. Ribeirão Preto, SP: Universidade de São Paulo; 2002.
- Pereira VAR. *Variação sazonal nas concentrações de aeroalérgenos em diferentes níveis de poluição ambiental (Tese de Doutorado)*. São Paulo, SP: Universidade de São Paulo; 2007.
- Portnoy JM, Kennedy K, Subletti JL, Phipatanakul W, Matsui E, Barnes C, Grimes C, Miller JD, Seltzer JM, Williams PB, Bernstein JA, Bernstein DI, Belssing-Moore J, Cox L, Khan DA, Lang DM, Nicklas RA, Oppenheimer J. *Ann allergy asthma immunology*. 108(4): 223.e1-223.15; 2012.
- Zahradnik E, Raulf M. *Frontiers in immunology*. 5:76 1-21; 2014.

CAPÍTULO 3

EFICÁCIA DE UMA SOLUÇÃO MODULADORA DE ALÉRGENOS NA MINIMIZAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE FEL D 1 NA PELAGEM DE GATOS (*Felis catus domestica*).

O principal alérgeno de gatos, o Fel d 1, é uma secretoglobulina, ubiqüitária, altamente aderente e de peso molecular de 36 kd, o que confere uma alta capacidade de permanecer em suspensão, facilitando assim a inalação. O manejo ambiental e do gato (banhos frequentes, esterilização ou exclusão) para controle da presença do Fel d 1 não tem se mostrado eficaz. Atualmente, o uso de soluções moduladoras de alérgenos tem sido sugerida para reduzir a concentração de alérgenos na pelagem de gatos e cães, entretanto a eficácia da mesma necessita de comprovação científica. O objetivo do presente estudo foi avaliar a eficácia e poder residual da solução moduladora de alérgenos, na minimização da concentração de Fel d 1 na pelagem de gatos. Foram avaliados 65 gatos hípidos, independente de raça, gênero sexual, e estado reprodutivo com idade superior a um ano. Destes, 35 gatos foram submetidos ao uso da solução Free & Clear (Grupo 1) e em 30 animais foi utilizado água (Grupo 2). As amostras da pelagem dos gatos foram coletadas por meio de aspiração, antes (T0), uma hora após (T1) e sete dias depois (T2) do uso da solução moduladora de alérgenos e de água, nos Grupos 1 e 2, respectivamente. Os níveis de Fel d 1 de cada amostra foram avaliadas pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando anti-Fel d 1. Todos os dados foram analisados pelo método de ANOVA e Bonferroni, e a estimativa da diferença entre as médias em relação aos grupos foi estimado pelo Teste t Student, com nível de significância adotado de 5% ($p < 0,05$). Nos 65 gatos avaliados, não observou-se alteração da concentração média de Fel d 1 na pelagem em uma hora ($p = 0,61$) e após uma semana ($p = 0,28$) do uso da solução em comparação ao uso da água. A solução moduladora de alérgenos utilizada não apresentou eficácia imediata e ou tardia em minimizar as concentrações de Fel d 1 na pelagem dos gatos.

Palavras-chave: Alergia, Asma, Rinite.

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF A MODULATORY SOLUTION OF ALLERGENS ON MINIMIZATION OF FEL D 1 CONCENTRATION IN THE FUR OF CATS (*Felis catus domestica*)

The major cat allergen, Fel d 1 is a secretoglobulina, ubiquitous, highly adherent and molecular weight of 36 kd, which gives a high ability to remain in suspension, thus facilitating inhalation. The cat and environmental management (frequent bathing, sterilizing or exclusion) to control the presence of Fel d 1 has not been proven effective. Currently, the use of modulating allergen solutions have been suggested to reduce the concentration of allergens in the fur of cats and dogs, however the effectiveness of the same needs to be scientifically proven. The aim of this study was to evaluate the efficacy and residual power of a modulating allergen solution, minimizing the concentration of Fel d 1 in cat fur. 65 healthy cats, regardless of race, gender, and reproductive status over the age of one year were evaluated. Of these, 35 cats were subjected to the use of modulating allergen solution (Group 1) and water used was 30 animals (Group 2). The samples from the fur of cats were collected by suction before (T0), one hour (T1) and seven days after (T2) the use of solution and water, in groups 1 and 2, respectively. Levels of Fel d 1 of each sample were evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using anti-Fel d 1 method. All data were analyzed by ANOVA and Bonferroni method, and the estimate of the difference between the means in the groups was estimated by Student t test, with significance level of 5% ($p < 0.05$). In 65 cats evaluated, there was no change in the average concentration of Fel d 1 in the coat in an hour ($p=0,61$) and after a week ($p=0,28$) the use of the solution compared to water use . The solution modulating allergen used showed no immediate or late in efficiency and minimize the concentrations of Fel d 1 in the fur of cats.

Key-words: Allergy, Rhinitis, Asthma.

1 INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos houve um aumento da prevalência e da morbidade das doenças alérgicas, e as doenças respiratórias crônicas são as mais comuns no mundo industrializado, acometendo cerca de 10 a 25% da população (Portnoy et al., 2012).

A precipitação e exacerbação da rinite e da asma estão relacionadas a exposição aos irritantes primários das vias aéreas, e à sensibilização e resposta inflamatória crônica à inúmeros alérgenos ambientais e microbianos, além de fatores de ordem psicogênica e metabólica (Arbes et al., 2004; Grönlund et al., 2010).

O alérgeno Fel d 1 é originário das secreções das glândulas sebácea e perianal, e da urina e saliva de gatos (Chapman e Wood, 2001; Eggleston e Bush, 2001) e são encontrados em pequenas partículas, que permanecem suspensas no ar por longos períodos, o que favorece a sua ampla disseminação ambiental e inalação (Plattsmills, 2009; Portnoy et al. 2011). Devido também a sua capacidade adesiva, estes alérgenos são amplamente carregados pelas pessoas nas roupas, sapatos, automóveis e vários outros fômites (Platts-mills, 2009; Portnoy et al., 2011).

Inúmeras medidas para minimizar a exposição de indivíduos alérgicos ao epitélio de gatos têm sido recomendadas, como aspiração do ambiente, retirada do animal da residência, limpeza domiciliar frequente, utilização de filtros de ar, exclusão de carpetes, tapetes e outros forros têxteis e sintéticos (Liccardi et al., 2000).

A higienização e a escovação periódica de gatos devem também ser indicadas, no intuito de minimizar a exposição a seus alérgenos, e outros que sua pelagem possa albergar (Portnoy et al., 2012).

Recentemente, soluções tópicas destinadas à redução na concentração de alérgenos provenientes do epitélio de cães e gatos têm sido estudadas, no intuito de diminuir de forma efetiva sua presença no ambiente, e minimizar a precipitação e intensidade das crises alérgicas respiratórias nas pessoas sensibilizadas a estes. Entretanto, até o momento, trabalhos que avaliem de forma criteriosa a eficácia e segurança destas soluções não foram desenvolvidos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia de uma solução moduladora de alérgenos em reduzir a concentração de Fel d 1 na pelagem de gatos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a concentração média de Fel d 1 na pelagem de gatos proveniente de ambientes com múltiplos gatos;
- Avaliar a segurança da solução moduladora da concentração de alérgenos na pele e pelagem de gatos;
- Avaliar se há eficácia tardia ou poder residual da solução moduladora de alérgenos na minimização das concentrações de Fel d 1 na pelagem de gatos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

A avaliação da eficácia da solução moduladora de foi realizado a partir de um estudo longitudinal, randomizado, com amostra de conveniência.

3.2 COMITÊ DE ÉTICA

O estudo respeitou as normas de boas práticas clínicas na utilização de animais em protocolos experimentais, e obteve aprovação do Comitê de Ética para Utilização de Animais em Pesquisa da PUCPR, sob protocolo de número 830 (ANEXO 1).

3.3 SELEÇÃO DOS ANIMAIS E GRUPOS DE ESTUDO

3.3.1 Critérios de inclusão e grupos experimentais

Foram incluídos no estudo 65 gatos hígidos, adultos, independente do tamanho da pelagem, peso, raça, gênero sexual e ser castrado ou não, provenientes de domicílios com múltiplos gatos.

Os animais foram alocados em dois grupos:

GRUPO 1- composto por 35 gatos, de ambos os gêneros sexuais, os quais foram tratados com a solução moduladora de alérgenos (Figura 9) e acompanhados por uma semana.

GRUPO 2- composto por 30 gatos, de ambos os gêneros sexuais, os quais eram tratados apenas com água.

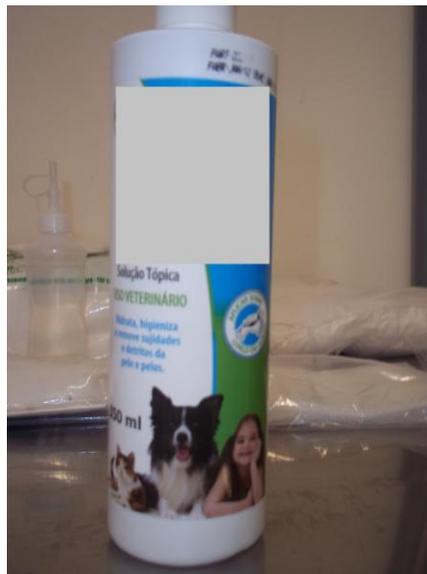


Figura 9 – Solução tópica moduladora de alérgeno, composta por colágeno hidrolizado, alantoína, pantenol e gel de aloe vera, utilizada nos gatos do grupo 1, após a aspiração do T0. Fonte: O Autor, 2013.

3.3.2 Critérios de exclusão e perda amostral

Foram excluídos no estudo gatos com ectoparasitas, com qualquer dermatopatia ou que estivessem recebendo banhos ou tratamento acaricida de forma regular. Também foram excluídos animais com idade inferior a um ano, fêmeas gestantes e gatos indóceis.

Foi considerado perda amostral e substituído no estudo, animais que desenvolvessem reações farmacodérmicas secundárias ao uso da solução e animais que tomassem banhos ao longo do período de observação.

3.3.3 Coleta das amostras

As amostras foram coletadas por aspiração com um aspirador de pó portátil (Consul 127V – 60Hz), ao qual foi acoplado um adaptador junto ao sifão de sucção² (Figura 10). Entre as duas partes do adaptador, foi acondicionado um filtro específico³ (Figura 11), para reter o material aspirado. A cada intervalo de aspiração, o sifão e a ponta do tubo de aspiração era limpos com álcool 70%.

Durante a aspiração, todos os animais eram devidamente contidos, e o aspirador passado em toda extensão do corpo (região cervical, tronco, abdome, inguinal, axila, cauda e períneo), por um período de dois minutos (Figura 12).

² Sifão adaptador Dustream collection – Indoor Biothechnologies – Charlottesville – EUA.

³ Filtro Dustream filters – Indoor Biothechnologies – Charlottesville – EUA.



Figura 10 – Sifão adaptador (Dustream collection²) utilizado na aspiração das amostras, para retenção dos pelos e poeira da pelagem dos gatos. Fonte: O Autor, 2013.



Figura 11 - Filtro (Dustream filters³) utilizado para reter o material aspirado a partir animais incluídos em ambos grupos experimentais. Fonte: O Autor, 2013.

As coletas foram divididas em três momentos:

Tempo 0 (T0)- todos os gatos foram avaliados clinicamente, escovados para remoção do excesso de pelos, e em seguida foram aspirados.

³ Filtro Dustream filters – Indoor Biothechnologies – Charlottesville – EUA.



Figura 12 – Momento da aspiração inicial ($T=0$) em um gato, utilizando aspirador portátil Consul 60Hz. Fonte: O Autor, 2013.

Tempo 1 (T1)- em seguida a primeira aspiração, era aplicado a solução teste (Figura 13), com movimentos a favor e contra os sentidos dos pelos, com auxílio de uma toalha de algodão individual, a qual era esterilizada em processo de autoclavagem. O produto era aplicado na região abdominal, membros, cauda, cabeça pescoço e dorso, de todos os animais. Em seguida, os animais eram mantidos em gaiolas individuais, até secagem natural, sem enxágue. Após uma hora da aplicação da solução moduladora de alérgenos, os gatos eram re-aspirados.

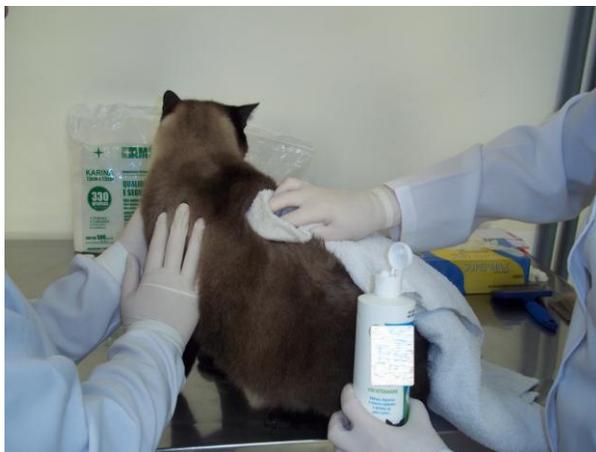


Figura 13 – Aplicação da solução moduladora de alérgenos em toda extensão da linha média dorsal, no momento T1, em um gato macho, orquiectomizado, adulto, incluído no projeto. Fonte: O Autor, 2013.

No intervalo entre as coletas, o animal não podia tomar banhos ou ser tratado com qualquer produto tópico.

Tempo 2 (T2)- após sete dias, os animais eram reavaliados, devidamente contidos, e realizada a terceira coleta (T2), de forma similar ao executado nos momentos T0 e T1.

Em relação aos gatos incluídos no Grupo 2, todos os animais eram avaliados, contidos, e imediatamente aspirados (T0). Em seguida a aspiração do T0, era aplicado água, com o auxílio de toalha de algodão devidamente esterilizada em autoclave. A água foi aplicada primeiramente no sentido dos pelos e em seguida no sentido contrário aos pelos, nas mesmas regiões dos gatos do Grupo 1 (região abdominal, cauda, membros, cabeça, pescoço e dorso).

Em seguida, os animais eram mantidos em gaiolas individuais, até secagem natural, sem enxágue. Após uma hora da aplicação da água, todos os gatos do Grupo 2 foram reaspirados, pelo período de dois minutos cada (T2).

O processo de aspiração utilizados nos tempos T0 e T1 foram repetidos para a terceira coleta, no T2, que foi realizada após sete dias da aplicação da água. Em

nenhum dos gatos foi permitido o banho e/ou tratamento tópico de algum tipo no período de intervalo entre as aspirações.

3.3.4 Acondicionamento das amostras

Após a coleta de cada amostra, o filtro contendo a poeira era acondicionado, de forma individual, em um envelope plástico e identificado com fita adesiva. Todas as amostras coletadas foram armazenadas e refrigeradas de 0°C a 4°C, para posterior avaliação.

3.3.5 Avaliação das concentrações de Fel d 1 presentes nas amostras

O preparo e as análises das amostras foram realizadas no Laboratório de Imunologia e Alergia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – USP – Campus Ribeirão Preto.

3.3.5.1 Preparo das amostras

Todas as amostras coletadas a partir da pelagem dos gatos foram retiradas do filtro, acondicionadas e friccionadas contra uma malha de 0,3 mm de diâmetro⁴, se utilizando uma pá de plástico de pesagem (Figura 14). A partir da peneiragem havia retenção das partículas maiores, permanecendo na placa de Petri apenas a poeira fina (Figura 15).

⁴ Peneira Standard Sieve Series A.S.T.M. – EUA.

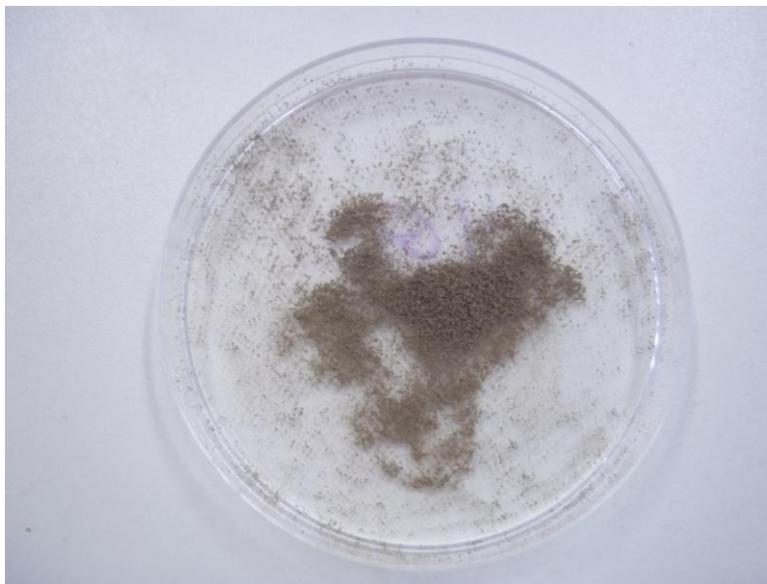


Figura 14 – Placa de Petri contendo a poeira fina, do material coletado por meio de aspiração. Fonte: O Autor, 2014.

Para preparação dos extratos, a poeira fina foi colocada em tubo de ensaio, onde adicionou-se 1mL de PBS-T (Solução Salina Tamponada com Fosfato, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20). Posteriormente, as amostras foram suspendidas, e os tubos foram colocados em homogeneizador pernoite a 4^oC.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm, a 4^oC por 20 minutos (Figura 16). O sobrenadante (aproximadamente 1,5 ml) foi removido com auxílio de pipeta Pasteur e acondicionado em tubo Eppendorf^{®5} devidamente identificado e armazenado a -20^oC, para realização da leitura.

⁵ Tubo Eppendorf Lobind



Figura 15 – Centrifugação de 36 amostras, em 2500 rpm durante 20 minutos, na temperatura de 4°C, em uma centrífuga Eppendorf modelo 5810f. Fonte: O Autor, 2014.

3.3.5.2 Análise das concentrações de Fel d 1 na pelagem de gatos

As concentrações de Fel d 1, foram determinados por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA) descrito por Chapman *et al* (1988).

Placas de microtitulação (Immulon II Dynatech, USA) foram cobertas com 1µg/poço do anticorpo monoclonal 6F9 anti Fel d 1, em tampão carbonato- bicarbonato 50mM, pH 9,6. Em seguida, as placas foram mantidas a 4°C por 18 horas.

Após três lavagens com PBS-T, as placas foram bloqueadas usando 0,1 mL de 1% de BSA PBS-T por uma hora à temperatura ambiente. Após duas lavagens com PBS-T foram adicionados 0,1 mL do extrato da poeira a ser testado, usando 1% BSA PBS-T como diluente. As amostras foram diluídas 1:20 e as placas foram mantidas por uma hora à temperatura ambiente.

Diluições em duplicata do extrato de referência Fel d 1 UVA 94/01 foram utilizadas para fazer a curva controle, com concentrações de 0,04 mU/mL a 20 mU/mL. Novamente as placas foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente.

Após três lavagens com PBS-T; foram adicionados 0,1 mL do anticorpo monoclonal biotilado 3E4, diluído em 1% de BSA PBS -T por uma hora à temperatura ambiente.

Em seguida, cinco lavagens com PBS-T foram realizadas, adicionadas a 0,1 mL Streptavidina - Peroxidase diluídos em 1% de BSA PBS-T, por 30 minutos à

temperatura ambiente.

Após cinco lavagens com PBS-T foi adicionado 0,1 mL de ABTS 1mM em tampão Citrato-Fosfato, com pH 4,2 contendo 0,03% de H₂O₂, para desenvolver a reação (Figura 17).

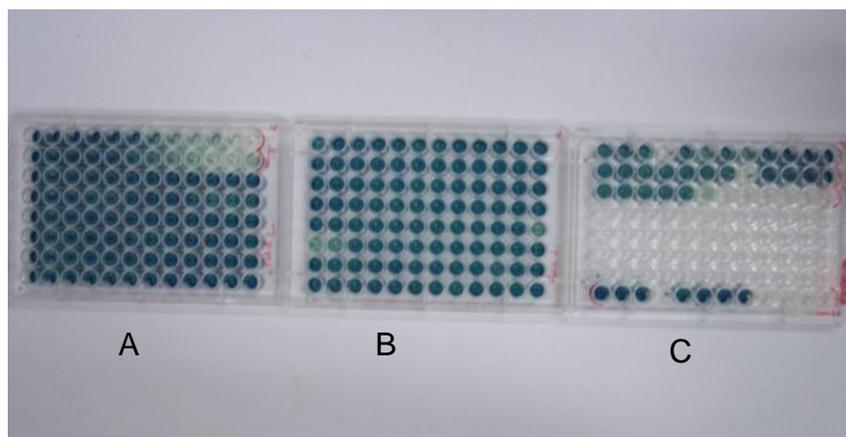


Figura 16 – Placas com 96 poços utilizadas para o exame de ELISA. Os 24 primeiros poços da placa A são da curva utilizada, os demais poços mostram forte reação para Fel d 1, na maioria das amostras incluídas no projeto. Fonte: O Autor, 2014.

A leitura das placas foi realizada em leitor de microplacas de ELISA quanto a absorvância do topo da curva controle alcançou 2,0 a 2,4 ($\lambda=405\text{nm}$). A preparação de referência UVA 94/01 foi sub-padronizada contra a referência de caspa de gato (“catdander”) CBER E5, que contém 9,7 U/mL de Fel d 1 (1 unidade = 4 μg de proteína).

3.3.6 Avaliação da segurança da solução moduladora de alérgenos

Após a aplicação da solução moduladora de alérgenos foi avaliado se havia a produção de eritema, prurido, queda na pelagem, dor, lesão de pele de caráter descamativo, xerose ou erosões, ou seja, reação farmacodérmica à solução moduladora de alérgenos. Essas avaliações ocorreram logo após a aplicação, uma hora após, antes da segunda aspiração e sete dias após, previamente a terceira aspiração.

3.3.7 Análise estatística

Todos os dados obtidos foram analisados com o *Software Statistica - Statsoft®* e *Software* estatístico *GraphPadPrism* version 3.00 for Windows, San Diego – Califórnia, EUA.

Os dados foram demonstrados em média e erro padrão da média.

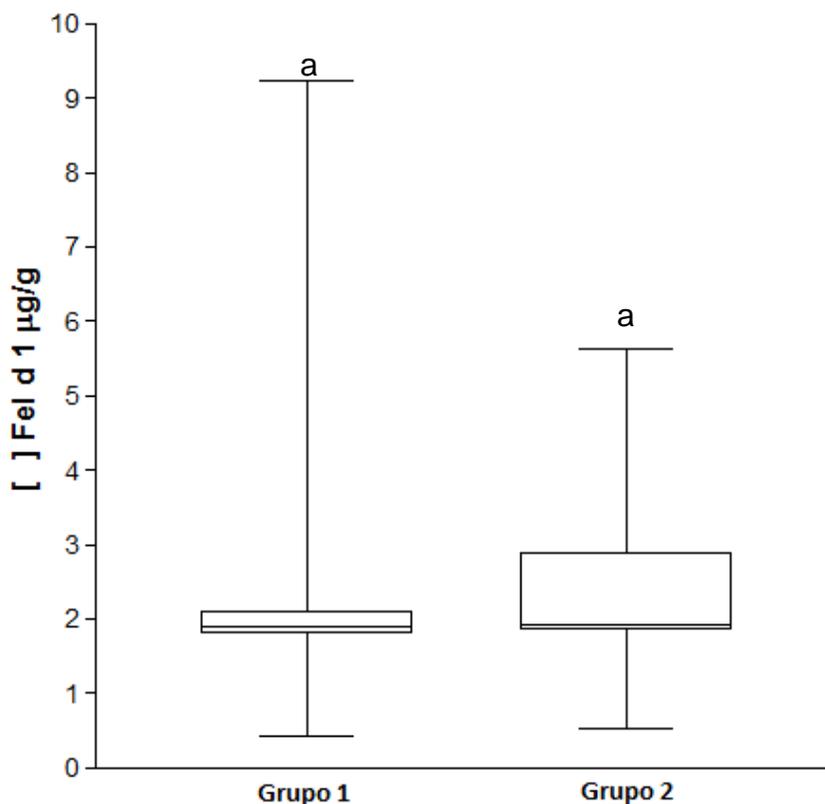
A estimativa da diferença entre médias em relação aos vários momentos, nos grupos de estudo foi realizada utilizando ANOVA e Bonferroni. A estimativa da diferença entre as médias em relação aos grupos foi estimado pelo Teste t student.

O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

Na pelagem de todos os 65 gatos avaliados foi identificado a presença de Fel d 1, em concentrações que variaram de $0,52 \mu\text{g/g}^{-1}$ a $5,63 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira, com média de $1,26 \pm 0,025 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira.

Na comparação das concentrações médias de Fel d 1 na pelagem dos gatos incluídos no grupo tratado com solução tópica moduladora da concentração de alérgenos e o grupo controle, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observado entre os dois grupos (Figura 18).

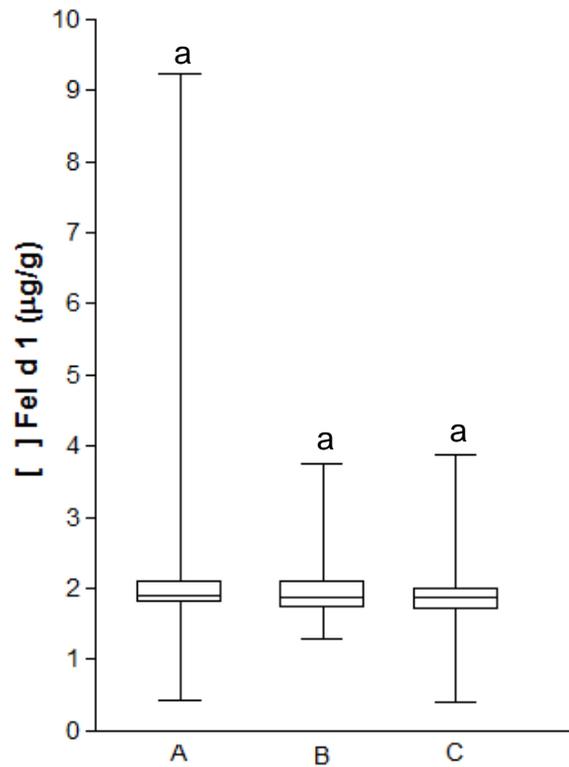


Letras iguais indicam $p > 0,05$.

Figura 17 - Demonstração das concentrações gerais de Fel d 1 entre os dois grupos (tratado e controle) no T0. Fonte: o autor, 2014.

No Grupo 1, a concentração média no T0 foi de $2,55 \pm 1,17 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira. Uma hora após a utilização da solução moduladora da concentração de alérgenos (T1) na pelagem dos gatos, a concentração média de Fel d 1 foi de $2,27 \pm 0,92 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira. Nova avaliação foi realizada em todos animais após sete dias (T2), e a concentração média foi de $2,55 \pm 1,21 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira.

Quando comparados os três momentos dos animais tratados com a solução moduladora de alérgenos, não foi observado diferenças significativas nas concentrações de Fel d 1 ($p \geq 0,05$) (Figura 19).

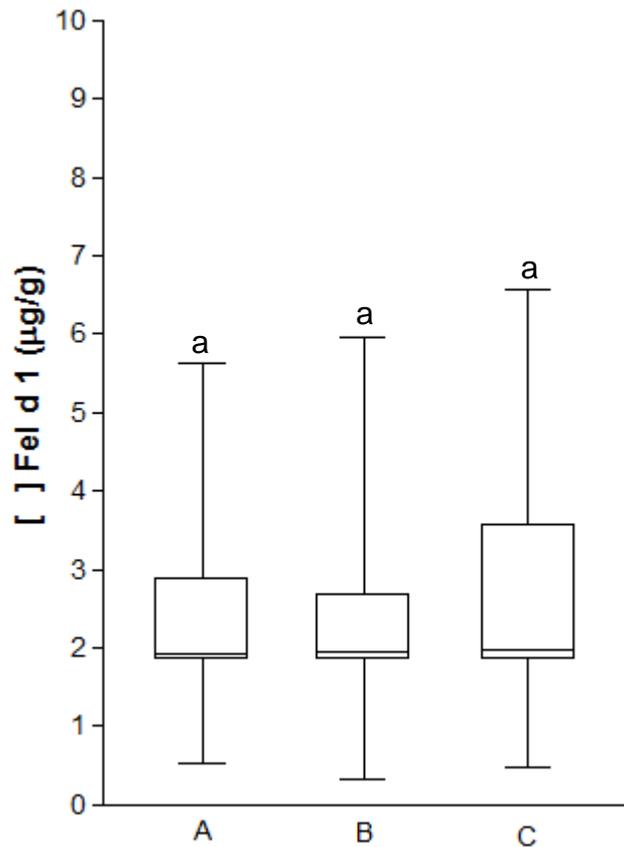


Letras iguais equivalem a $p = 0,28$.

FIGURA 18 - Concentração média de Fel d 1 em cada um dos tempos com o tratamento com a solução moduladora de alérgenos. Fonte: O Autor, 2014.

No Grupo 2, a concentração média no T0 foi de $2,45 \pm 1,17 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira. Uma hora após a utilização de água (T1) na pelagem dos gatos, a concentração média de Fel d 1 foi de $2,27 \pm 0,93 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira. Nova avaliação foi realizada em todos animais após sete dias (T2), e a concentração média foi de $2,55 \pm 1,23 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira.

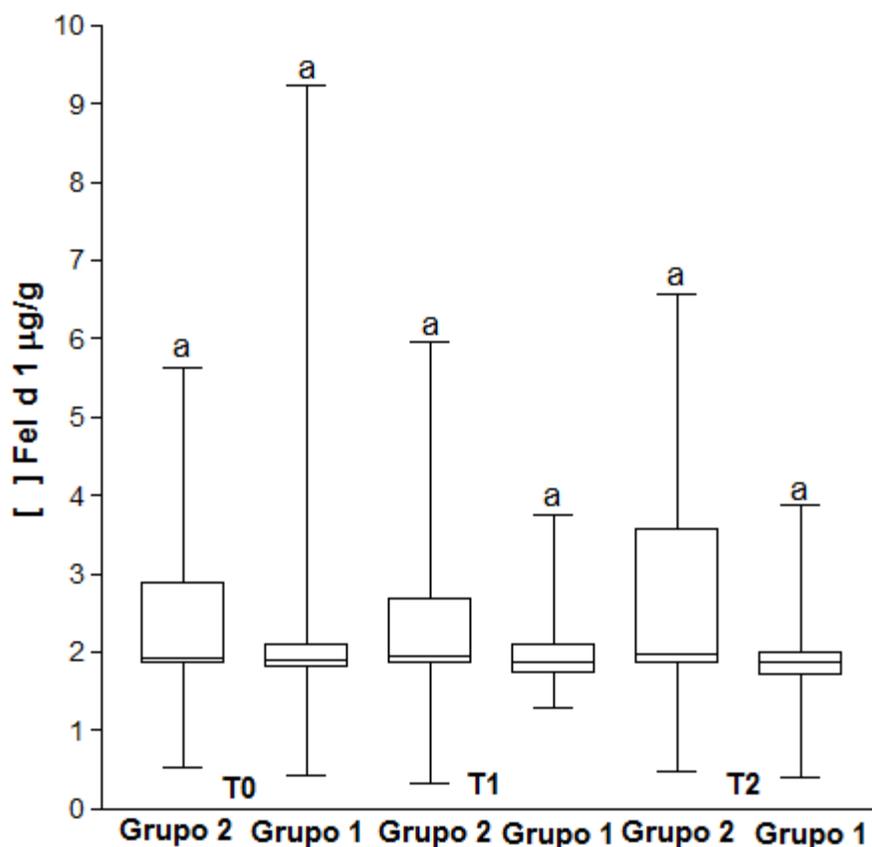
Quando comparados os três momentos dos animais tratados apenas com água, não foi observado diferenças significativas nas concentrações de Fel d 1 ($p \geq 0,05$) (Figura 20).



Letras iguais equivalem a $p = 0,61$.

FIGURA 19 - Concentração média de Fel d 1 em cada um dos três tempos com o uso de água (A=T0, B=T1 e C=T2). Fonte: o autor, 2014.

Quando se comparou as concentrações médias de Fel d 1 na pelagem dos gatos incluídos no Grupo 1, tratado com solução tópica moduladora da concentração de alérgenos, e do Grupo 2 (Grupo controle), nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observado entre os dois grupos nos momentos 1 (uma hora após o tratamento) e 2 (uma semana após o tratamento) ($p > 0,05$) (Figura 21).



Letras iguais correspondem a $p=0,10$.

Figura 20 – Comparação das concentrações de Fel d 1 entre os dois grupos (tratado e controle) nos diferentes tempos de aspiração (T0 = primeira aspiração; T1 = uma hora após o uso do produto ou água; T2 = sete dias após o uso produto ou água). Fonte: o autor, 2014.

5 DISCUSSÃO

O Fel d 1 é considerado o alérgeno maior dos felinos domésticos, e 90% dos indivíduos alérgicos ao epitélio dos gatos são sensíveis a ele (Pereira, 2007).

Todos os gatos avaliados no presente trabalho apresentavam Fel d 1 em sua pelagem, com uma concentração média de $1,26 \pm 0,025 \mu\text{g/g}^{-1}$ de poeira, o que demonstra que todo gato, independente da raça, idade, comprimento de pelagem e gênero sexual produzem e contêm Fel d 1 em sua pelagem. Isso se deve ao fato do Fel d 1 ter origem principalmente nas glândulas salivares, e como os gatos se lambem

constantemente, devido a seus hábitos de higiene, ocorre a disseminação do alérgeno ao longo do pelo e pele destes animais.

Apesar das concentrações encontradas nos gatos do presente estudo não serem altas, esta representa um risco, pois a concentração de Fel d 1 de 1µg/g de poeira já é suficiente para causar sensibilização em indivíduos predispostos.

Em outro estudo, a limpeza dos pelos dos gatos por três minutos, com água de torneira e xampu, em imersão, pode remover 200 µg de Fel d 1 por grama de pelo, com efeito residual curto, de 24 horas (Portnoy *et al*, 2012). Porém este método pode superestimar a concentração de Fel d 1, visto que teoricamente remove grande quantidade de alérgeno aderido a pelagem, e não permite uma real estimativa do que realmente pode ser inalado pelos contactantes.

A coleta das amostras por aspiração, mimetiza a inalação do alérgeno pelo ser humano, tendo assim, um melhor significado clínico. Considerando a característica felina de se manter limpo, com o ato de se lambar, isso faz com que a produção de Fel d 1 ocorra na proporção de 3 a 7µg de alérgeno por animal ao dia, o que torna muito difícil seu controle efetivo.

O uso da solução moduladora da concentração de alérgenos na pelagem dos gatos, não minimizou significativamente a concentração de Fel d 1 nos animais avaliados logo após seu uso, o que demonstra que esta é ineficaz, e sua ação pode ser comparada ao grupo controle na qual foi utilizada apenas água. Também a solução testada não mostrou efeito tardio ou eficácia residual, quando avaliada após sete dias do seu uso inicial.

Para se obter uma minimização de alérgenos eficaz, Portnoy et al. (2012) relata que a solução precisa ter efeito desnaturante proteico (enzimático), o que não é observado na solução testada.

O colágeno possui característica restauradora (Yamamoto et al., 2006). A alantoína atua como hidratante (Saito, 2005). O pantenol tem sido descrito com agente umectante para a pele, cabelos e unhas, e pode também apresentar propriedades cicatrizantes e antiinflamatórias (Paola et al., 1998; Ebner, 2002). A Aloe vera é

utilizado principalmente como emoliente (Patrocínio, 2010). Como nenhum dos princípios ativos citados têm função de desnaturação protéica, justifica-se sua ineficácia.

Assim, a solução moduladora de alérgeno, como não apresenta eficácia imediata e tardia, seu uso contínuo, em protocolos semanais, como indica o fabricante, não terá eficácia no controle do alérgeno Fel d 1 na pelagem de gatos.

O fabricante também descreve que a solução tem o potencial de aumentar o peso molecular do alérgeno, diminuir o seu tempo de suspensão, e reduzir a possibilidade de inalação por indivíduos alérgicos ao Fel d 1. Entretanto, mais estudos são necessários a fim de avaliar se o aumento do peso molecular dos alérgenos é capaz de reduzir e/ou impedir o desenvolvimento de rinite ou asma em indivíduos sensibilizados a gatos.

Além do mais, como os gatos em ambiente domiciliar ocupam os mesmos nichos que os seres humanos, sua presença leva a um aumento nos níveis de Fel d 1 em superfícies, já que este alérgeno tem o caráter adesivo e se fixa em camas, sofás, paredes, tapetes e carpetes, o que favorece sua constante inalação.

Em relação a sua inocuidade, a solução estudada não apresentou ação irritante, possivelmente por sua formulação ser composta predominantemente por substâncias com propriedades hidratantes e emolientes, podendo inclusive ter efeito restaurador e protetor na pele de cães e gatos.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir que:

- Independente da raça, gênero sexual e idade, todos os gatos produziram Fel d 1, e apresentaram concentrações detectáveis em sua pelagem;
- A solução moduladora de alérgenos não reduz de forma imediata as concentrações de Fel d 1 na pelagem de gatos;
- A solução moduladora de alérgenos não tem eficácia tardia em diminuir as concentrações de Fel d 1 na pelagem de gatos;
- A solução moduladora de alérgenos é inócua e o uso não desencadeou qualquer reação farmacodérmica nos gatos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bienboire-Frosini C, Lebrum R, Vervloet D, Pageat P, Ronin C. Journal Investig Allergol Clin Immunol. 22(4): 270-279; 2012.
- Bienboire-Frosini C, Cozzi A, Lafont-Lecuelle C, Vervloet D, Ronin C, Pageat P. The Veterinary Journal. 193: 162-167; 2012.
- Chapman MD, Wood RA. The role and remediation of animal allergens in allergic diseases. J Allergy Clin Immunol. 2001; 107 (Suppl.) (3):414- 421.
- Grönlund K, Saarne T, Almquist C, Wickman M, Van Hage M. Pediatr Allergy Immunol, 21: 277-283; 2010.
- Kaiser L, Grönlund H, Sandalova T, Ljunggren HG, Van Hage M, Achour A, Schneidr G. The journal of biological chemistry. 278: 37730-37735; 2003.
- Liccardi G, Cazzola M, D'Amato M, D'Amato G. Respiratory medicine. 94: 1109-1118; 2000.
- Lockey RF, Ledford DK. Allergens and Allergen Immunotherapy – Subcutaneous, sublingual and oral. 5th ed. Boca Raton: CRC Press; 2014.
- Naydenov K, Popov T, Mustakov T, Melikov A, Bornehag CG, Sundell J. The association of pet keeping at home with symptoms in airways, nose and skin among Bulgarian children. Pediatr Allergy Immunol. 2008; 19(8):702-8.
- Oliveira APF. Comportamento social de machos e fêmeas castrados do gato doméstico (*Felis catus* L.) em confinamento (Dissertação de Mestrado). Ribeirão Preto, SP: Universidade de São Paulo; 2002.
- Pereira VAR. Variação sazonal nas concentrações de aeroalérgenos em diferentes níveis de poluição ambiental (Tese de Doutorado). São Paulo, SP: Universidade de São Paulo; 2007.
- Portnoy JM, Kennedy K, Subletti JL, Phipatanakul W, Matsui E, Barnes C, Grimes C, Miller JD, Seltzer JM, Williams PB, Bernstein JA, Bernstein DI, Belssing-Moore J, Cox L, Khan DA, Lang DM, Nicklas RA, Oppenheimer J. Ann allergy asthma immunology. 108(4): 223.e1-223.15; 2012.
- Zahradnik E, Raulf M. Frontiers in immunology. 5:76 1-21; 2014.

CAPÍTULO 4

CONCLUSÃO GERAL

Com base nos resultados dos estudos, observamos que independente do sexo e ser castrado ou não, todos os gatos produzem o Fel d 1, em níveis capazes de sensibilizar o humano, porém, observou-se ainda que gatos machos castrados possuem maior concentração do alérgeno, quando comparado com os não castrados e com fêmeas, mostrando ainda que a castração influencia de forma negativa no controle do alérgeno Fel d 1. E com relação ao controle de alérgenos, não há um controle eficaz de Fel d 1 comparando o uso de água ou a solução moduladora de alérgenos de forma tópica, ou seja, o alérgeno permanece no gato, de forma a ser carregado para onde o animal for.

ANEXO 1



Pontifícia Universidade Católica do Paraná

Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 21 de novembro de 2013.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 803 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação da eficácia da solução de colágeno hidrolisado alantoína, pantenol e gel de aloe vera (Free & Clear) na minimização da concentração de fel D 1 na pelagem de gatos (*Felis catus* doméstica)

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marconi Rodrigues de Farias

EQUIPE DE PESQUISA: Marconi Rodrigues de Farias, Luciane Wancura Marcuz, Maria Elisa Cavinato, Julia Lopes, Junior.

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária / Medicina Veterinária

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
<i>Felis catus</i>	Fêmeas	Indeterminado	BiMediata	40

O colegiado do CEUA em reunião no dia 21/11/2013, 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. **Martá Luciana Fischer**
Coordenadora

Comitê de Ética no Uso de Animais.

