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

MAICON ROBERTO PAULO

ALÉRGENOS PROVENIENTES DO EPITÉLIO DE CÃES (*Canis lupus familiaris*)

(Allergens found the epithelial dogs (*Canis lupus familiaris)*

SÃO JOSÉ DOS PINHAIS
2014

MAICON ROBERTO PAULO

ALÉRGENOS PROVENIENTES DO EPITÉLIO DE CÃES (*Canis lupus familiaris*)

(Allergens found the epithelial dogs (*Canis lupus familiaris)*

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

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....vi
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....vii
RESUMO GERAL.....viii
ABSTRACT.....ix
LISTA DE ABREVIATURAS.....x
LISTA DE TABELAS.....xi
LISTA DE FIGURAS.....xii
CAPITULO 1
1 INTRODUÇÃO 1
2 REVISÃO DE LITERATURA 3
2.1 ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS ALÉRGENOS ENCONTRADOS NO EPITÉLIO DOS CÃES..... 3
2.2 ORIGEM AMBIENTAL DOS ALÉRGENOS DE CÃES 6
2.3 ÍNDICES DE SENSIBILIDADE EM PESSOAS COM RINITE E ASMA A ALÉRGENOS DO EPITÉLIO DE CÃES 8
2.4 RESPOSTA IMUNOALÉRGICA AOS ALÉRGENOS DE CÃES 9
2.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE A MANUTENÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS E O DESENVOLVIMENTO DE ASMA E RINITE ALÉRGICA 10
2.6 CONTROLE AMBIENTAL DOS ALÉRGENOS DE CÃES..... 12
CAPITULO 2 15
RESUMO..... 15
ABSTRACT 16
1 INTRODUÇÃO 17
2 OBJETIVOS 19
2.1 OBJETIVO GERAL.....19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 19
3 MATERIAL E MÉTODOS 20
3.1 TIPO DE ESTUDO..... 20

3.2 AVALIAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA..... 20
3.3 SELEÇÃO DOS ANIMAIS..... 20
3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO..... 20
3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO.....21
3.6 PERDA AMOSTRAL..... 21
3.7 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO..... 21
3.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL..... 22
3.8.1 Coleta das Amostras..... 22
3.8.2 Acondicionamento das Amostras 24
3.9 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ALÉRGENOS PRESENTES NAS AMOSTRAS..... 24
3.9.1 Preparo das Amostras 24
3.9.2 Análise das Concentrações do Alérgeno Can f 1..... 26
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 28
4.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ALÉRGENO CAN F 1 NA PELAGEM DOS CÃES.....30
5 DISCUSSÃO 34
6.CONCLUSÃO..... 37
CAPITULO 3 38
RESUMO..... 38
ABSTRACT 39
1 INTRODUÇÃO.....40
2. OBJETIVOS 42
2.1 OBJETIVO GERAL..... 42
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 42
3 MATERIAL E MÉTODOS..... 43
3.1 TIPO DE ESTUDO..... 43

3.2 AVALIAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA..... 43

3.3 SELEÇÃO DOS ANIMAIS..... 43

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO..... 43

3.6 PERDA AMOSTRAL..... 44

3.7 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO..... 44

3.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL..... 44

3.8.1 Utilização da solução higienizante, hidratante e moduladora da concentração de alérgenos e coleta das amostras no Grupo A. 45

3.8.2 Protocolo experimental e coleta das amostras no Grupo B..... 47

3.8.3 Acondicionamento das amostras 47

3.9 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ALÉRGENOS PRESENTES NAS AMOSTRAS..... 48

3.9.1 Preparo das Amostras 48

3.9.2 Análise das Concentrações do Alérgeno Can f 1..... 50

3.10 AVALIAÇÃO DAS COLATERALIDADES DA SOLUÇÃO HIDRATANTE-HIGIENIZANTE NA PELE..... 52

3.11 Análise estatística..... 52

4 RESULTADOS 53

5 DISCUSSÃO 58

6 CONCLUSÃO..... 61

7.REFERÊNCIAS..... 62

AGRADECIMENTOS

Inicio meus agradecimentos a DEUS, já que ele colocou pessoas tão especiais ao meu lado.

A meus pais, Valdir Paulo e Iraci Spézia Paulo, meu infinito agradecimento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias, por acreditar no futuro deste projeto e contribuir para o meu crescimento profissional e por ser também um exemplo a ser seguido. Sua participação foi fundamental para a realização deste trabalho.

Agradeço a minha querida esposa, Bianca Stevanin Gressele por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado, me pondo para cima e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. À minha filha Maria Eduarda Stevanin Paulo meu maior tesouro.

Aos meus irmãos, Odinei Marcos Paulo e Valdinei Paulo por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis.

Agradeço também a meus amigos Marcos Solles Antunes e Thiago de Mello Silveira pela amizade sincera.

Agradeço a toda equipe do laboratório de Alergia e Imunologia clínica da Universidade de São Paulo-USP Ribeirão Preto em especial à Profa. Dra. Luisa Karla de Paula Arruda por possibilitar e viabilizar a realização de parte desta dissertação, também a Dra. Michelle Christiane Rodrigues Barbosa pela orientação e colaboração na execução deste projeto e principalmente, pela amizade, sincera e espontânea.

A todos meus colegas de mestrado em ciência animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), do Campus de São José dos Pinhais, em especial a Luciana Wancura , Dévaki . pelo carinho, compreensão e amizade.

A Fundação Araucária pelo apoio e pela contribuição financeira desse estudo.

Agradeço também o estagiário Fábio Nogueira pela ajuda nas coletas e tabulação dos dados obtidos neste trabalho.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO

A presente dissertação é composta por 4 capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral e uma revisão dos alérgenos provenientes do epitélio de cães e sua relação com rinite e asma alérgicas em pessoas.

O capitulo 2 avalia a influência do gênero sexual e do estado reprodutivo na concentração de Can f 1 na pelagem de cães (*Canis lupus familiaris*).

O capítulo 3 tem como principal finalidade fazer avaliação de uma solução higienizante e hidratante a base de colágeno, alantoína, pantenol e gel de *Aloe vera* na minimização da concentração de Can f 1 na pelagem de cães.

O capítulo 4 finaliza esta dissertação com conclusões gerais deste trabalho e com sugestões para estudos futuros.

RESUMO GERAL

Os animais domésticos, especialmente os cães, são potenciais sensibilizantes em indivíduos alérgicos, tendo como principal fonte alérgica o Can f 1, este tem sido associado a sensibilização e precipitação de rinite, asma e conjuntivite alérgica. Esta lipocalina originária de secreções das glândulas sebáceas e perianais, urina e saliva destes animais, possuem natureza adesiva e são encontrados em pequenas partículas que permanecem suspensas no ar por longos períodos, o que favorece a sua ampla disseminação ambiental, sua inalação e para que sejam carreados e encontrados até mesmo em ambientes sem animais. O número de residências com animais de companhia tem aumentado a cada ano, e a excessiva exposição de proprietários a cães, tem colaborado para precipitação ou exacerbação de crises alérgicas. Este estudo revisa o principal alérgeno proveniente de cães, seus índices de sensibilização, sua relação com a rinite e a asma alérgica em humanos, além de avaliar se houve influência do gênero sexual e do estado reprodutivo nas concentrações de Can f 1 na pelagem de cães, e avaliou também eficácia da solução tópica moduladora de alérgenos a base de colágeno, alantoína, pantenol e gel de *Aloe vera*, na minimização das concentrações de Can f 1 na pelagem de cães. Todos os cães avaliados apresentaram Can f 1 em sua pelagem, e sua concentração média foi de 1.261±0,67µg/g. Não foi observado diferença significativa na concentração de Can f 1 na pelagem de cães machos e fêmeas ($p > 0,05$), e não houve diferença entre animais castrados 1,28±0,73 µg/g e não castrados 1,22±0,61µg/g ($p > 0,05$). Não houve diferença significativa na concentração do alérgeno maior Can f 1 em relação ao gênero sexual, e o estado reprodutivo não influência em suas concentrações. Não houve redução significativa na concentração média de Can f 1 na pelagem dos cães em uma hora 1,14µg/g ($p \geq 0,05$) e após sete dias 1,24µg/g ($p \geq 0,05$) do uso da solução. Conclui-se assim que a solução higienizante e hidratante a base de colágeno, alantoína, pantenol e gel de *Aloe vera* utilizada, não apresentou eficácia imediata e tardia na redução das concentrações de Can f 1 na pelagem dos cães.

Palavras chave: cão, rinite, asma.

GENERAL ABSTRACT

Domestic animals, especially dogs, are potential sensitizers in allergic individuals, the main source allergic Can f 1, this awareness and precipitation of rhinitis, asthma and allergic conjunctivitis has been associated. Lipocalin is native secretions of the sebaceous glands and perianal, urine and saliva of these animals have adhesive nature, and are found in small particles remain airborne for long periods, leading to their wide spread environment, inhalation and which are adduced and found even in environments without animals. The number of households with pets has increased every year, and overexposure to the owners of dogs, has contributed to precipitation or exacerbation of allergy symptoms. This study reviews the major allergen from dogs, their rates of awareness, its relation to allergic rhinitis and asthma in humans, and to evaluate whether there was influence of gender and reproductive state on concentrations of Can f 1 in the coat of dogs , and also assessed the effectiveness of topical solution modulating allergen-based collagen, allantoin, panthenol and aloe vera gel to minimize the concentrations of Can f 1 in the coat of dogs. All dogs evaluated had Can f 1 in its coat, and its average concentration was 1.261 ± 0.67µg.g-1. No significant difference was observed in the concentration of Can f 1 in dog coats with regard to males and females (p >0,05), and no difference between castrated animals 1.28 ± 0.73µg.g-1 uncastrated 1.22 ± 0.61µg.g-1 (p >0.05). There was no significant difference in the concentration of major allergen Can f 1 in relation to gender, and reproductive status did not influence their concentrations. When it comes to the mechanical reduction of the allergen was observed that there was no significant decrease in the mean concentration of Can f 1 in the coat of the dogs at a time 1,14µg.g-1 (p > 0.05) and after seven days 1,24µg.g-1 (p >0,05) use of the solution. It follows therefore that the sanitizing and moisturizing based solution of collagen, allantoin, panthenol and aloe vera gel used has no immediate and delayed effectiveness in reducing the concentration of Can f 1 in the coat of the dogs.

Keywords: dog, rhinitis, asthma

LISTA DE ABREVIATURAS

Can f 1- Subgrupo de alérgeno com origem na lipocalina sebácea proveniente do epitélio de cães
Can f 2- Subgrupo de alérgeno com origem na lipocalina de origem epitelial canina
Can f 3- Subgrupo de alérgeno com origem na albumina proveniente do epitélio de cães
Can f 4- Subgrupo de alérgeno com origem na proteína queratina proveniente do epitélio de cães
Can f 5- Subgrupo de alérgeno com origem na enzima arginina esterase proveniente do epitélio de cães
Can f 6- Subgrupo de alérgeno com origem na lipocalina sebácea proveniente do epitélio de cães
Equ c 1- Subgrupo de alérgeno com origem na lipocalina sebácea proveniente do epitélio de cavalos
Fel d 4- Subgrupo de alérgeno com origem na lipocalina salivar proveniente do epitélio de gatos
Rat n 1- Subgrupo de alérgeno com origem na urina de roedores
Th2 - Linfócitos T auxiliador do tipo 2
IgE - Imunoglobulina E
IL- Interleucinas
ºC - Graus Celsius
PSA- Antígeno específico prostático.
DPK- Calicreína prostática canina.
µg/g Micrograma por grama
ISAAC - International Study on Asthma and Allergies in Childhood

LISTA DE TABELAS

CAPITULO 1 **Página**

Tabela 1. Principais alérgenos, sua origem, principal fonte, índices de sensibilização dos principais alérgenos provenientes do epitélio de cães..... 6

CAPITULO 2

Tabela 1. Dados epidemiológicos dos 80 cães avaliados relacionados ao gênero sexual, idade, raça, comprimento da pelagem, habitat, frequência de banhos e tipo de piso..... 29
Tabela 2. As concentrações médias e medianas em (µg/g) do alérgeno Can f 1 em relação ao gênero sexual..... 30

CAPITULO 3

Tabela 1. Dados epidemiológicos dos 80 cães avaliados relacionados ao gênero sexual, idade, raça, comprimento da pelagem, habitat, frequência de banhos e tipo de piso..... 53

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO 1 **página**

Figura 1. Dinâmica do Can f 1 em ambientes domiciliados..... 4

CAPITULO 2

Figura 1. Cães contidos e submetidos à aspiração de sua pelagem para obtenção da poeira e posterior avaliação dos níveis de alérgenos Can f 1..... 23

Figura 2. 2(A), adaptador mais sifão 2(B) filtro , 2(C) sifão mais filtro utilizados para a coleta das amostras de alérgenos Can f 1 dos cães..... 23

Figura 3. 3(A) as amostras em caixa térmica imediatamente após a aspiração, 3(B) as amostras armazenadas sob congelamento para posterior análise da concentração de Can f 1..... 24

Figura 4. 4(A) Pelo e poeira antes da peneiragem, retirada do filtro e acondicionada em malha com 0,3mm de diâmetro; 4(B) pá de plástico utilizada para friccionar a poeira contra a malha; 4(C) poeira fina acondicionada em placa de petri e 4(d) em detalhe a amostra de poeira utilizada para avaliação dos níveis de alérgenos..... 25

Figura 5. Sobrenadante das amostras devidamente identificado e acondicionado em tubos de *eppfendor* e mantidos a -20ºC para análise..... 26

Figura 6. Lavador de microplacas automático modelo ELX 50 AUTO STRIP WASHER..... 27

Figura 7. 7(A) leitor de ELISA 7(B) micro-placa de ELISA com reatividade positiva para Can f 1 a partir da amostra da poeira obtida dos cães aspirados..... 28

Figura 8. Comparação das concentrações de Can f 1, entre o gênero sexual dos 80 animais estudados..... 31
Figura 9. Médias gerais e a dispersão da concentração do alérgeno Can f 1 entre os grupos de cães castrados..... 31
Figura 10. Concentrações média do alérgeno Can f 1, entre os grupos de cães inteiros..... 31
Figura 11. Concentração média do alérgeno Can f 1, entre os grupos de cães machos..... 32
Figura 12. Concentração média do alérgeno Can f 1, entre os grupos de cães fêmeas..... 33

CAPITULO 3

Figura 1. Cães contidos e submetidos à aspiração de sua pelagem para obtenção da poeira e posterior avaliação dos níveis de alérgenos Can f 1..... 46
Figura.2. 2(A), adaptador mais sifão 2(B) filtro , 2(C) sifão mais filtro utilizados para a coleta das amostras de alérgenos Can f 1 dos cães..... 46
Figura 3. 3(A) as amostras em caixa térmica imediatamente após a aspiração, 3(B) as amostras armazenadas sob congelamento para posterior análise da concentração de Can f 1..... 47
Figura.4. 4(A) Pelo e poeira antes da peneiragem, retirada do filtro e acondicionada em malha com 0,3mm de diâmetro; 4(B) pá de plástico utilizada para friccionar a poeira contra a malha; 4(C) poeira fina acondicionada em placa de petri e 4(D) em detalhe a amostra de poeira utilizada para avaliação dos níveis de alérgenos..... 48
Figura.5. Sobrenadante das amostras devidamente identificado e acondicionado em tubos de *eppendorf* e mantidos a -20ºC para análise..... 49

Figura 6. Lavador de microplacas automático modelo ELX 50 AUTO STRIP WASHER..... 50

Figura 7. 7(A) leitor de ELISA 7(B) micro-placa de ELISA com reatividade positiva para Can f 1 a partir da amostra da poeira obtida dos cães aspirados..... 51
Figura 8. Concentrações geral de Can f 1 entre os dois grupos (tratado e controle), independente dos tempos de aspiração (T0,T1,T2)..... 54
Figura 9. Concentrações Can f 1 no grupo controle nos diferentes tempos de aspiração (T0= primeira aspiração;T1 uma hora após uso produto;T2= sete dias após uso produto)..... 55
Figura 10. Concentrações de Can f 1 no grupo tratado nos diferentes tempos de aspiração (T0= primeira aspiração;T1 uma hora após uso produto;T2= sete dias após uso produto)..... 56
Figura 11. Concentrações de Can f 1 entre os dois grupos (tratado e controle) nos diferentes tempos de aspiração (T0= primeira aspiração;T1 uma hora após uso produto;T2= sete dias após uso produto)..... 57

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Maior prevalência e morbidade das doenças alérgicas têm sido observadas, e as doenças respiratórias crônicas são as mais comuns no mundo industrializado, acometendo cerca de 10 a 25% da população mundial (Zavadniak, 2000).

O Brasil está no grupo de países que apresentam as maiores taxas de prevalência de asma e de rinite alérgica no mundo (Asher et al., 2006). A realização do ISAAC no Brasil mostrou que a prevalência média de sintomas relacionados à rinite e asma alérgicas foi 29,6% e 19%, respectivamente (Solé et al., 2006).

Houve incremento da asma entre crianças e adolescentes no período de 1998 e 2008. A prevalência de asma entre crianças teve um incremento anual de 1%, JÁ Entre o grupo de adolescentes, a prevalência de asma teve aumento de 2,2% ao ano (Wehrmeister et al., 2012).

Em Londrina no Paraná, estima-se que a asma e a rinite apresente prevalência de 22% e 27,3% respectivamente, entre crianças de seis e sete anos de idade (Kuromoto et al., 2010).

A asma é um relevante problema de saúde pública e aparece entre as doenças mais frequentemente relacionadas com atendimentos em emergências e hospitalizações na faixa etária pediátrica (Angnes et al., 2012). A rinite e a asma têm imputado grandes perdas na qualidade de vida social e econômica nos indivíduos afetados, tanto pelos custos médicos diretos, como pela perda de produtividade, causada pelo absentismo em atividades escolares e no trabalho (Zavadniak, 2000).

Como apresentam o mesmo espectro patofisiológico 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 que 78% dos pacientes com asma tenham rinite (Casale e Dykewics, 2004).

Pinto et al (2008) realizaram um estudo sobre o impacto da genética na asma infantil e constatou que existe entre 48 a 79% de contribuição dos fatores genéticos para a asma. Os 21% restantes se deveram a influências ambientais.

A exposição aos alérgenos de ácaros da poeira doméstica é considerada por muitos a principal causa de doenças alérgicas em pessoas (Chapman, 2001; Eggleston, 2001; Platts-mills, 2009; Portnoy et al., 2011). No entanto, tem aumentado o número de relatos de precipitação ou exacerbação de crises alérgicas decorrentes da exposição aos alérgenos provenientes do epitélio de cães e gatos de estimação (Simpson et al., 2003; Pastorino, 2008). Somado a isto tem sido observado aumento no número de residências com animais de companhia e aumento do número de animais por domicílio, (Portnoy et al., 2011).

O principal alérgeno proveniente do epitélio dos cães é o Can f 1, responsável por 52% das reações de sensibilidade a estes. O Can f 1 é uma lipocalina com propriedades aderentes, oriunda das glândulas salivares e sebáceas, e encontrada na pelagem, escamas e saliva do cão (Chapman e Wood, 2001; Saarelainen et al., 2004; Portnoy et al., 2011). Devido também a sua capacidade adesiva, estes alérgenos são amplamente carreados pelas pessoas nas roupas, sapatos, automóveis e inúmeros fômites (Zavadniak, 2000; Chapman e Wood, 2001 ; Platts-mills, 2009; Portnoy *et al*., 2011).

Em adição, Gross et al., (2000) demonstraram que a presença de um cão na casa foi associada ao aumento de duas a três vezes nas concentrações de alérgenos provenientes de ácaros na poeira doméstica.

O objetivo do presente estudo e foi revisar os principais alérgenos provenientes do epitélio do cão, seus mecanismos de disseminação e controle ambiental, e sua importância na precipitação da rinite e asma alérgicas em pessoas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ORIGEM E DISTRIBUIÇÃO DOS PRINCIPAIS ALÉRGENOS ENCONTRADOS NO EPITÉLIO DOS CÃES

Os alérgenos provenientes de cães e gatos geralmente têm origem na urina, albumina, na saliva e secreções sebáceas. Suas concentrações tendem a variar amplamente dentro do mesmo domicílio e entre lares, e atingem picos no outono, em casas com maior umidade, pobre ventilação e com carpetes Portnoy et al., 2011).

O Can f 1 é uma lipocalina produzida principalmente nas glândulas salivares dos cães e também secretada pela glândula sebácea, achada nos pelos, escamas e saliva, e responsável por 52% da sensibilização ao epitélio de cão (Chapman, 2001; Saarelainen et al., 2004; Portnoy et al., 2011).

No ambiente, 45% do Can f 1 estão associados a partículas superiores a 9µm, e 20% estão em partículas inferiores a 5µm (Platts-mills, 2009; Portnoy et al., 2011). Estas podem permanecer suspensas por longos períodos, por vezes anos, e podem ser inaladas e atingir as vias aéreas inferiores (Platts-mills, 2009).

A natureza lipoprotéica, origem sebácea e salivar do Can f 1 lhes conferem alta capacidade adesiva e distribuição ubiquitária (Chapman, 2001; Platts-mills, 2009; Portnoy et al., 2011), e faz com que este alérgeno seja transportado em roupas e objetos pessoais, o que facilita sua dispersão para diferentes ambientes, inclusive escolas, creches e veículos de transporte, e justifica o desencadeamento de alergia a estes, mesmo quando não há exposição direta a cães (Eggleston, 2001; Chapman e Wood 2001).

Assim, o Can f 1 é encontrado em quase todos os domicílios com cães e em 15 a 33% dos domicílios sem cães, geralmente na parede e no piso, sendo os tapetes e carpetes seus principais reservatórios Portnoy et al., 2011. (Figura 1).

A produção de Can f 1 em uma pele seborreica é mais elevada, do que em um cão não seborreico, pois permite maior acúmulo de Can f 1 no pelo (Ramadour et al., 2005).

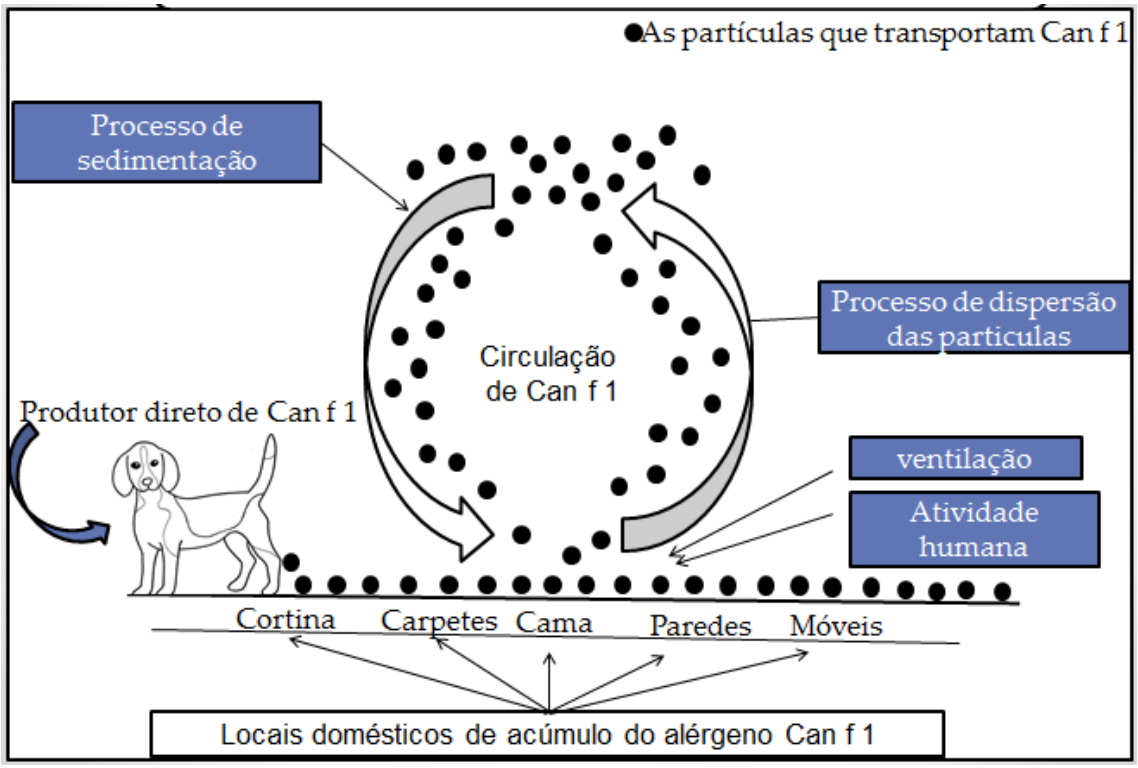

Figura 1- Desenho esquemático demostrando a dinâmica do alérgeno can f1 em ambientes intradomociliados (Figura adaptada de Liccardi, et al., 2012).

Estudos indicam que a concentração de 1µg de Can f 1 por grama de poeira seja capaz de causar sensibilização em indivíduos predispostos, e a concentração de 10µg/g, é capaz de precipitar sintomas de rinite e asma alérgicas (Leung e Lai, 1997).

Outro alérgeno proveniente de cães é o Can f 2, lipocalina de origem epitelial que faz forte reação cruzada com alérgenos provenientes de gatos, cavalos, bois, baratas e ratos como o Equ c 1, Bos d 2, Bos d 5, Bla g 4, Rat n 1 e Fel d 4 (Chapman e Wood 2001 , Smith et al ., 2004).

Estudo realizado por Groot et al. (1991) mostrou que o Can f 1 é mais alergênico do que Can f 2, pois dos 70% dos pacientes que apresentaram sintomas alérgicos precipitados pelo Can f 1, apenas 20% reagiram ao Can f 2.

Em relação à parte estrutural destes alérgenos, o Can f 1 é composto por 148 aminoácidos, e o Can f 2 por 161 (Konieczny et al., 1997; Kamata et al., 2007). A sequência de aminoácidos de Can f 1 mostrou homologia de 24,5% com o Can f 2 (Kamata et al., 2007).

O Can f 3 corresponde a albumina do soro de cão. Este é uma proteína de 69 kDa, encontrado na escama, epitélios, saliva e soro (Kamata et al., 2007). Também foi encontrado nas glândulas salivares (parótidas e submandibulares) e no fígado (Spitzauer et al., 1997).

Spitzauer et al., (1994) demonstraram que os anticorpos IgE dirigidos contra albumina canina reagem de forma cruzada com as albuminas de gato e rato. Em paralelo, a liberação de histamina a partir de basófilos foi derivadas de pacientes alérgicos a albumina de cão, em incubação com albuminas de rato e galinha, o que indica que as albuminas de espécies diferentes apresentam reações cruzadas funcionais (Spitzauer et al., 1994).

A sequência de aminoácidos da albumina sérica canina mostrou ser altamente homóloga às sequências de albuminas de outros animais e de seres humanos, o que explica a grande reatividade cruzada percebida entre as albuminas, pela demonstração da presença de epítopos semelhantes no cão, gato, albumina equina e no homem (Kamata et al., 2007).

O Can f 4, uma proteína purificada a partir dos extratos de escamas de cães, é responsável por 35% da sensibilização e formação de IgE em pessoas alérgicas ao epitélio de cães (Leung e Lai, 1997).

A importância de Can f 4 como alérgeno em pelos de cães foi vista no estudo realizado por Mattsson et al. (2010), no qual demonstraram que 49% da população estudada apresentaram anticorpos IgE para Can f 1, 22% para Can f 2, 16% em Can f 3, 35% a Can f 4 e 70% para Can f 5.

O Can f 5, denominado como calicreína prostática canina (DPK), foi identificado como um componente protéico encontrado na urina de cão que exibe uma forte ligação a anticorpos IgE (Mattsson et al., 2010). Este estudo demonstrou que esta molécula, pode ser encontrada na pelagem de cães e se ligou a anticorpos IgE em 26 (70%) de 37 soros de indivíduos com alergia ao cão.

Como esta proteína é regulada por andrógenos expresso na próstata, sugere-se que sua ocorrência é restrita a animais machos inteiros (Mattsson et al., 2010).

Em adição, Mattsson et al., (2010) demostraram intensa reatividade cruzada entre DPK e PSA em três de quatro soros identificados.

Weidinger et al., (2006), em estudo realizados em pessoas demostraram que a hipersensibilidade vaginal ao sêmen foi associada a sensibilização ao PSA humano, que está presente em plasma seminal.

Como existe semelhança estrutural entre DPK e o PSA humano (55 a 60% de identidade de sequência), é possível que a sensibilização a DPK confere aumento no risco de desenvolvimento de doenças alérgicas ao fluido seminal humano.

O Can f 6 é a mais recente lipocalina adicionada à lista de alérgenos do epitélio de cães (Hilger et al., 2012), e sugere-se que essa proteína recombinante tenha origem na glândula salivar. Este novo alérgeno tem elevada homologia com o Fel d 4 (67%) e com o Equ c 1 (57%). Em um grupo de pacientes selecionados pela sua sensibilização para gatos e cães, 61% tinham os anticorpos IgE para Can f 6 e reatividade cruzada com o Fel d 4.

Tabela 1- Principais alérgenos, sua origem, principal fontes e índices de sensibilização dos principais alérgenos provenientes do epitélio de cães.

ALÉRGENO	ORIGEM	PRINCIPAL FONTE	SENSIBILIZAÇÃO
Can f 1	Lipocalina Salivar	Saliva	52-75%
Can f 2	Lipocalina Salivar, pelo	Saliva	22-30%
Can f 3	Albumina	Saliva/pelo/soro	35%
Can f 4	Queratina canina	Escamas	35%
Can f 5	Calicreina prostática	Urina	70%
Can f 6	Lipocalina	Escamas	67 %

2.2 ORIGEM AMBIENTAL DOS ALÉRGENOS DE CÃES

Manter animais de estimação dentro de casa tornou-se mais comum nas últimas décadas, especialmente na Europa, onde foi avaliado que 34% das crianças em idade escolar possuem um cão e/ou gato em casa (Aberg, 1995).

Já nos EUA, estima-se que haja 77,5 milhões de proprietários de cães, e 67% destes têm um, 25% têm dois e 9% têm três ou mais cães em ambiente domiciliar (Pastorino, 2008).

Em lares nos EUA, o Can f 1 foi encontrado em 93,8% das camas, 95,6% dos pisos dos quartos, 94,9% dos pisos de sala de estar, e 98% dos sofás de salas de estar. Das 818 casas com cães, 817 (99,9%) tinham níveis detectáveis de Can f 1 (Samuel et al., 2004).

Em um estudo desenvolvido em Curitiba-PR por Rosário et al., (2000), o Can f 1 foi encontrado em 35,1% das amostras estudadas em concentração que variou de 0,1µg/g a 108,8µg/g de poeira. Casas com cães tinham maiores concentrações de alérgenos de cães do que domicílios que não tinham; casas com cães mantidos em ambiente extra-domiciliar tinham mais alérgenos do que domicílios sem cães, e o chão de ambientes com cães tinham mais alérgenos do que casas onde o cão foi excluído (Nicholas et al., 2010).

Farias (2012) ao avaliar a concentração de alérgenos ambientais na pelagem de cães e na poeira a partir de domicílios de crianças com rinite e ou asma alérgicas em bairros periféricos de Curitiba- PR, encontraram 96,9% de positividade para Can f 1 nas amostras provenientes da pelagem de cães, 90,6% na poeira proveniente de roupas de cama e de colchões, e 81,20% no piso.

O Can f 1 é encontrado em quase todos os domicílios com cães e em 15 a 33% dos domicílios sem cães, geralmente na parede e no chão, sendo tapetes e carpetes seus principais reservatórios (Portnoy et al., 2011).

Devido seu caráter adesivo, os alérgenos de cães são onipresentes no meio ambiente. Eles podem ser encontrados em paredes, pisos lisos, bancos de automóveis e transporte público, em cadeiras estofadas de hospitais, na poeira coletada de escolas, em concentrações muito acima dos limites mínimos, tanto para a sensibilização quanto para precipitação dos sintomas alérgicos (Arlian et al., 2001; Smedje, 2001; Neal et al., 2002).

2.3 ÍNDICES DE SENSIBILIZAÇÃO EM PESSOAS COM RINITE E ASMA A ALÉRGENOS DO EPITÉLIO DE CÃES

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., 2011).

Paralelamente, o crescimento da sensibilização e precipitação da rinite, asma e outras doenças alérgicas de caráter agudo ou perene, têm sido observados em crianças e adultos predispostos após a exposição aos alérgenos provenientes de cães e gatos (Chapman, 2001; Simpson e Custovic, 2003; Portnoy et al., 2011).

Cães e gatos representam a principal fonte de alérgenos de animais domésticos em muitos países industrializados (Woodfolk et al.,1992; Morris, 2010). Em algumas áreas do mundo, 50 a 70% das crianças com asma brônquica são sensibilizados aos animais domésticos (Croner e Kjellman, 1992).

A sensibilização aos cães tem ocorrido em índices que variaram de 9,5 a 20% dos adolescentes asmáticos (Pastorino, 2008; Sarinho, 2009), e maiores índices de sensibilização a alérgenos do epitélio de cães têm sido observados em zonas rurais, e em populações de menor poder aquisitivo e condição sócio-econômica (Sarinho, 2009).

Em estudo feito com 773 crianças e adolescentes asmáticos com idades entre sete e 14 anos, houve positividade no teste cutâneo por puntura em 8,9% ao epitélio de cão, e 11,6% ao epitélio de gato. A frequência dos animais nos domicílios dos pacientes era de 59% de cão e 21% de gato (Dutra, 2001).

Apesar dos cães representarem importante origem de alérgenos para o ambiente, a sensibilização a seus alérgenos tem sido descrita em menor proporção do que a observada aos alérgenos de gatos, talvez pelo fato dos cães serem mantidos mais frequentemente em ambientes externos, terem menos acesso a camas ou serem lavados com maior periodicidade (Platts-mills, 2009; Nicholas, 2010; Portnoy et al., 2011).

Custovic et al. (2003) sugeriram que a exposição concomitante a vários alérgenos pode afetar o padrão de sensibilização, e que a relação dose-resposta entre a exposição e sensibilização parece ser diferente para animais domésticos em comparação aos alérgenos de ácaro (Platts-mills, 2009).

A implicação disso para os médicos é que todo paciente alérgico tem alguma exposição no lar aos alérgenos de cães. Mesmo em pacientes que não possuem cães mas vivem em comunidades com alta prevalência de animais, sua exposição a esses alérgenos em domicílio vai provavelmente ser superior aos limites de sensibilização alérgica, e pode induzir sintomas alérgicos (Samuel et al., 2004).

2.4 RESPOSTA IMUNOALÉRGICA AOS ALÉRGENOS DE CÃES

Apesar da frequência ambiental e a exposição a altas concentrações de alérgenos de animais serem comuns, altos níveis de sensibilização na população exposta não são geralmente observados (Chapman e Wood, 2001; Simpson et al., 2003).

Este fato pode ser explicado pela resposta imunológica aos alérgenos de mamíferos serem diferentes da resposta observada contra insetos, ácaros e pólens (Platts-mills, 2009). Pela natureza não enzimática do alérgeno ou excesso de glicosilação, frequência e quantidade de exposição, presença de endotoxinas, além de menor distância evolutiva entre as espécies, a resposta Th2 à alérgenos de mamíferos deriva para a formação de IL-10 e de IgG e IgG4 ao invés de IL4 e IgE alérgenos específico, gerando uma espécie de tolerância clínica, onde os sintomas não são aparentes ou a criança se mantenha oligossintomática (Chapman e Wood, 2001; Hesselmar et al.,2003 Mandhane et al.,2009; Platts-Mills, 2009; Simpson e Custovic 2003). Isto explica porque muitas crianças e adultos com histórico de rinite e asma em casas com cães e gatos não desenvolvem alergia a estes (Chapman e Wood, 2001; Hesselmar et al.,2003 Mandhane et al.,2009; Platts-Mills, 2009).

Lipocalinas são caracterizadas por um resposta imune celular fraca, já os alérgenos de ácaros, por terem natureza proteica e enzimática, em baixa quantidade já podem induzir altos títulos de anticorpos IgE (Epton et al., 2002).

A resposta aos alérgenos de animais é mediada por linfócitos T-auxiliares do tipo 2 (Th2), liberação de IL-4 e IL-13, que conduzem à síntese de IgE alérgeno-específica, e de IL5, que conduz à inflamação eosinofílica nos órgãos-alvo (Paul e Zhu, 2010).

Suvi et al. (2010) comparou a resposta proliferativa de células T CD4 do sangue periférico de 15 indivíduos com alergia ao Can f 1, e 11 proprietários não alérgicos a cão. As respostas proliferativas nas culturas de células T CD4 de indivíduos com alergia eram fracas quando estimuladas com Can f 1, mas estatisticamente mais forte do que em culturas não estimuladas.

Em estudo realizado por James et al. (2004) sugeriram que a exposição frequente aos animais de estimação na infância, pode reduzir a incidência de alergia pelo aumento da produção de IL-10 e indução de tolerância, ou por estímulo de resposta Th2 modificada.

Assim, muitas crianças e adultos, embora alérgicos, podem não desenvolver sensibilização e rinite e asma relacionadas ao epitélio de animais, ou, quando sensibilizadas, podem se tornar tolerantes com a exposição contínua (Hesselmar et al., 2003; Platts-mills, 2009; Mandhane et al., 2009).

2.5 ASSOCIAÇÃO ENTRE A MANUTENÇÃO DE ANIMAIS DOMÉSTICOS E O DESENVOLVIMENTO DE ASMA E RINITE ALÉRGICA

Meta-análise realizada por Takouche et al., (2008), concluiu que exposição a cães aumenta ligeiramente o risco de asma enquanto que a exposição a gatos tem um discreto papel protetor. A hipótese de que exposição a altas concentrações ao alérgeno de gato pode induzir tolerância nos indivíduos mais rapidamente.

Estudo feito por Zheng et al. (2002) na China apontou que a manutenção simultânea de um gato e um cachorro aumentou o risco de asma em crianças com idade entre seis a 10 anos. Efeito semelhante não foi observado em famílias que tinham apenas um cão ou um gato.

Na Noruega, o monitoramento das crianças do nascimento até quatro anos de idade mostrou que a inclusão de qualquer animal na fase neonatal, reduziu o risco de rinite alérgica com idade de quatro anos e dermatite atópica nos primeiros seis meses de vida (Nafstad et al., 2001).

Na Suécia foi observado que manter animais de estimação desde o nascimento da criança está associado a menor incidência de rinite alérgica com a idade de sete e oito anos, e menor freqüência de asma em crianças na faixa etária de 12 a 13 anos (Hesselmar et al., 1999).

Na Alemanha, crianças em idade escolar com contato contínuo com cães, mas não com gatos, durante o primeiro ano de vida, foi associado com redução na incidência de rinite alérgica precipitada por alérgeno de cão (Hölscher et al., 2002).

Assim, deduz-se que exposição precoce aos animais de estimação está diretamente associada a uma menor precipitação de doenças alérgicas (Fretzayas et al., 2013).

A hipótese é de que exposição a altas concentrações de alérgeno de cães e gatos pode induzir tolerância imunológica e reduzir o risco de maior produção de IgE a uma próxima exposição (Eder et al., 2005).

Platts-Mills et al., (2001) forneceram evidências que a exposição crônica a altos níveis de antígeno gato pode induzir uma resposta Th2 modificada que resulta na regulação negativa de IgE específica de gato e aumentar IgG específico de gato, em particular a IgG4.

Entretanto, este assunto é controverso, pois alguns autores defendem a idéia de que, a exposição a estes animais na primeira infância, parece influenciar a resposta imunológica para desenvolvimento de doenças alérgicas na infância, e esses efeitos podem persistir até a idade adulta (Bufford e Gern, 2007).

2.6 CONTROLE AMBIENTAL DOS ALÉRGENOS DE CÃES

Comentar que é difícil controlar alérgenos de animais por que eles são adesivos, de fácil aerosolubilização, podem ser transportados por proprietários de animais e inúmeras fômites, é ubiquitário, e amplamente encontrado em ambientes com e sem animais.

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 (Portnoy et al., 2011).

No entanto, os proprietários de cães e gatos, na maioria das vezes se recusam a se desfazer de seus animais de estimação, como mecanismos de controle de suas doenças alérgicas (Phipatanakul 2001).

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).

A remoção de materiais alergênicos produzidos por animais domésticos constitui uma importante medida preventiva para alérgenos de cães, gatos e de ácaros, visto que as escamas dos animais domésticos representam alimento ideal para suas populações (Liccardi et al., 2000).

A esterilização tem sido sugerida como alternativas à retirada do cão do contato familiar, entretanto esta tem sido associada a menores índices de Can f 1 no ar ambiente e na pelagem, mas não na poeira doméstica (Vredegoor et al., 2012).

A higienização e escovação periódica de cães e gatos tem sido indicada no intuito de minimizar a concentração de alérgenos em sua pelagem (Sarinho et al., 2009; Portnoy et al., 2011).

Resultados do estudo realizado por Hodson et al., (1999) mostraram que lavando os cães com água morna (40°C) e xampu, houve uma redução 38,5% na concentração Can f 1 em sua pelagem. No entanto, para que ocorresse a diminuição de Can f 1, a lavagem tinha que ser realizada no mínimo duas vezes por semana.

Hodson et al., (1999) mostraram que o aumento na frequência de banhos, não está relacionado com concentrações mais baixas de alérgenos,

tanto no pelo do cão, como no ambiente que ele vive. Assim, na tentativa de minimizar a quantidade de alérgenos presentes na pelagem de cães e gatos, soluções moduladoras de alérgenos de uso tópico têm sido produzidas e indicadas, entretanto, sua real eficácia ainda necessita de documentação científica adequada (Portnoy et al., 2011).

Resultados conflitantes a respeito da variação da concentração de Can f 1 entre tipos diferentes de pelagem e raça têm sido observados (Vredegoor et al., 2012). Algumas raças de cães, onde o Can f 1 foi analisado, houve importante variação de suas concentrações médias, sendo que em cães da raça Labrador a concentração foi de 1,99µg/g, em cães Yorkshire Terrier, a concentração foi de, 16,72µg/g, e em Poodles, 17,04µg/g (Ramadour et al., 2005).

A manipulação genética das raças também tem sido tentada, entretanto as pesquisas a respeito indicam não haver raças hipoalergênicas de cães (Vredegoor et al., 2012).

Outras alternativas para diminuir a concentração ambiental dos alérgenos de cães seriam a limpeza ambiental e aspiração de pó no mínimo duas vezes por semana, utilização de filtros de ar, exclusão de reservatórios de alérgenos como carpetes, tapetes e outros forros têxteis e sintéticos (Sarinho et al., 2009; Portnoy et al., 2011).

Assim, medidas de controle ambiental devem ser o tratamento de primeira linha na prevenção e no controle médico da doença, já que os alérgenos animais são potentes gatilhos para precipitação das doenças alérgicas (Phipatanakul, 2001).

3.CONCLUSÃO

Os alérgenos provenientes de cães têm sido implicados como causa de sensibilização e precipitação de rinite e asma clínica em crianças e adultos suscetíveis.

Estes são encontrados em pequenas partículas que permanecem suspensas no ar por longos períodos, o que favorece a sua ampla disseminação ambiental e sua inalação. Em virtude de sua capacidade adesiva, são amplamente carreados pelas pessoas nas roupas, sapatos, automóveis e diversos fômites, o que os torna ubiquitários e presentes, mesmo em ambientes sem animais.

No Brasil, o número de residências com animais de companhia tem aumentado a cada ano e, embora muitos destes animais sejam mantidos em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, o impacto do cão como reservatório e veiculadores de alérgenos para o ambiente e proprietários expostos, não tem sido criticamente avaliado.

CAPITULO 2

INFLUÊNCIA DO GÊNERO SEXUAL E DA CASTRAÇÃO NA CONCENTRAÇÃO DE CAN F 1 NA PELAGEM DE CÃES (*Canis lupus familiaris*).

Influence of gender sexual and castration in concentration Can f 1 in dogs coat (*Canis lupus familiaris*).

RESUMO

Os alérgenos provenientes de cães e gatos têm sido implicados como fatores extrínsecos envolvidos na sensibilização, precipitação e exacerbação da rinite e asma alérgicas em crianças e adultos suscetíveis, em índices que variam de 10 a 25%. O principal alérgeno proveniente do epitélio dos cães é o Can f 1, responsável pela maioria das reações de sensibilidade a estes. O Can f 1 é uma lipocalina, o que lhe confere propriedades aderentes, oriunda das glândulas sebáceas e salivares e encontrada na pelagem, escamas e saliva dos cães. Este estudo teve como objetivo avaliar a frequência e a concentração média de Can f 1 na pelagem de cães, e se há influência do comprimento da pelagem, gênero sexual e do estado reprodutivo nas concentrações deste alérgeno. Foram selecionados 80 cães hígidos, 40 machos (20 machos castrados e 20 não castrados), e 40 fêmeas (20 fêmeas castradas e 20 não castradas), com idade superior a um ano, independente do tamanho, peso ou raça, livres de ectoparasitos, intradomiciliados e higienizados regularmente. Os cães foram aspirados e as amostras coletadas utilizadas para determinar os níveis de Can f 1 através de ensaio imunoenzimático (ELISA). Todos os dados foram analisados pelo método ANOVA e Bonferroni, e a estimativa da diferença entre médias em relação aos grupos foi avaliado pelo Test t student, com nível de significância adotado de 5% ($p < 0,05$). Todos os cães avaliados apresentaram Can f 1 em sua pelagem, e sua concentração média foi de 1.2612±0,67 µg/g. Não foi observado diferença significativa na concentração de Can f 1 na pelagem de cães em relação ao gênero sexual ($p > 0,05$), estado reprodutivo ($p > 0,05$). Assim, não há diferença significativa na concentração do alérgeno Can f 1 em relação ao gênero sexual e estado reprodutivo não influenciam suas concentrações.

Palavras-chave: lipocalina, Alergia, alérgeno.

INFLUENCE OF GENDER SEXUAL AND CASTRATION IN CONCENTRATION CAN F 1 IN DOGS COAT (*Canis lupus familiaris*).

ABSTRACT

Allergens from cats and dogs have been implicated as extrinsic factors involved in sensitization, precipitation and exacerbation of allergic rhinitis and asthma in susceptible children and adults, at rates ranging 10-25%. The major allergen from the epithelium of dogs is Can f 1, responsible for the majority of sensitivity reactions. Can f 1 is a lipocalin, which confers adhesive properties, deriving from salivary glands and sebaceous glands and the coat found, scales and saliva of dogs. This study aimed to evaluate frequency and the average concentration of Can f 1 in the coat of dogs, and if there is influence of coat length, gender and reproductive state on concentrations of this allergen. 80 healthy dogs, 40 males (20 castrated males and 20 non-neutered) and 40 females (20 spayed females and 20 non-castrated), older than one year, regardless of size, weight or race, free of ectoparasites, were selected intradomiciliados and sanitized regularly. All dogs were aspirated and samples used to determine levels of Can f 1 by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). All data were analyzed by ANOVA and Bonferroni method, estimate the difference between means in the groups by Student's t test, with significance level of 5% ($p < 0.05$). All dogs evaluated had Can f 1 in its coat, and its average concentration was 1.2612±0.67µg/g. No significant difference was observed in the concentration of Can f 1 in the coat of dogs in relation to gender ($p > 0.05$), reproductive status and length of hair ($p > 0.05$). Thus, there is no significant difference in the concentration Can f 1 in relation to sexual gender and reproductive status not influence their concentrations.

Keywords: lipocalin, allergy, allergen

1 INTRODUÇÃO

Devido à urbanização, à 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 domicílios têm aumentado nas últimas décadas (Chapman, 2001; Portnoy et al., 2011).

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 à alérgenos provenientes de cães e gatos (Portnoy et al., 2011).

O principal alérgeno proveniente do epitélio de cães é o Can f 1, encontrado na pelagem de cães em concentração média de 6,29 a 13,19µg/g (Hodson et al.,1999), e responsável por 52% das reações de sensibilidade a estes (Chapman e Wood 2001; Saarelainen et al., 2004; Portnoy et al., 2011).

O Can f 1 é uma lipocalina, oriunda das glândulas salivares e sebáceas, o que lhe confere propriedades aderentes, e é encontrado na pelagem, escamas e saliva de cães (Chapman e Wood, 2001; Saarelainen et al., 2004; Portnoy et al., 2011).

No ambiente, quase metade do Can f 1 é encontrado em associação a moléculas com mais de 9µm, e cerca de 20% associa-se a partículas com menos de 5µm (Portnoy et al., 2011). Isso explica porque esse alérgeno fica em suspensão no ar por até 14 dias (Zavadniak, 2000; Platts-Mills, 2009), e ser inalado em quantidades muito maiores que alérgenos de ácaros e insetos (Karlsson et al., 2004; Trander, 2005; Platts-Mills, 2009; Portnoy *et al*., 2011;).

O Can f 1 é encontrado em quase todos os domicílios com cães e em 15 a 33% dos domicílios sem cães, geralmente na parede e no chão, sendo tapetes e carpetes seus principais reservatórios (Portnoy et al., 2011). Este também é encontrado em 93,8% das camas, 94,9% dos pisos sala de estar, 95,6% dos pisos dos quartos, e em 98,0% no sofá da sala de estar em lares americanos (Samuel et al., 2004).

Em outro estudo de 818 casas com cães, 817 (99,9%) tinha níveis detectáveis de Can f 1, em pelo menos um cômodo , e o sofá teve o maior nível médio de Can f 1 (Samuel et al., 2004).

Para minimizar a concentração ambiental de Can f 1 e o impacto dos alérgenos provenientes de cães como fatores extrínsecos de quadros alérgicos, várias alternativas têm sido estudadas, como a castração, aumento na frequência de banhos (Vredegoor et al., 2012), manipulação genética das raças e modificações de manejo ambiental, entretanto os resultados parecem conflitantes (Portnoy et al ., 2011; Vredegoor et al., 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo determinar a concentração de Can f 1 na pelagem de cães provenientes de ambiente domiciliares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a- Avaliar se há diferença na concentração de Can f 1 na pelagem de cães em relação ao gênero sexual;
b- Avaliar se há diferença na concentração de Can f 1 na pelagem de cães machos orquiectomizados e não orquiectomizados;
c- Avaliar se há diferença na concentração de Can f 1 na pelagem de cães fêmeas ovariohisterectomizadas e não ovariohisterectomizadas;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

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

3.2 AVALIAÇÃO PELO 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 830B (ANEXO 1).

Os proprietários foram devidamente orientados e esclarecidos sobre a pesquisa e assinaram termo de consentimento. (ANEXO 2).

3.3 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram selecionados para participar do estudo 80 cães, hígidos, intra e semidomiciliados, oriundos da rotina de atendimento do Hospital Veterinário São Bernardo, Curitiba-PR.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo cães hígidos, independente do tamanho, peso ou raça, com idade superior a um ano, sendo 40 cães machos (20 orquiectomizados e 20 não orquiectomizados), e 40 cães fêmeas (20 ovariohisterectomizadas e 20 não ovariohisterectomizadas).

Nenhum dos animais incluídos no estudo apresentavam ectoparasitas, dermatopatias, e todos recebiam banhos ou tratamento acaricida de forma regular.

As visitas para a realização da aspiração da pelagem dos cães foram agendadas e realizadas conforme a disponibilidade de horários dos responsáveis pelo animal.

Para realização da aspiração os cães deveriam estar no mínimo sete dias sem receber banhos.

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo animais com idade inferior a um ano, fêmeas prenhes e cães indóceis, e cães que usaram medicação pulicida e ou acaricida até 20 dias antes do estudo.

3.6 PERDA AMOSTRAL

Foi considerado perda amostral e substituídos, animais que ao exame clínico apresentassem dermatopatias, doenças sistêmicas

3.7 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Os animais incluídos no estudo foram aleatoriamente subdivididos nos 04 grupos abaixo.

GRUPO A: 20 cães machos castrados
GRUPO B: 20 cães machos não castrados
GRUPO C: 20 cães fêmeas castradas
GRUPO D: 20 cães fêmeas não castradas

3.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.8.1 Coleta das Amostras

A coleta das amostras foi realizada entre os meses de março a outubro do ano de 2013.

Todos os cães selecionados para participar do estudo foram aspirados pela equipe de pesquisadores acompanhado pelo responsável do animal.

Na extremidade do aspirador foi acoplado um adaptador junto ao sifão de sucção[1] (Figura 1A)**.** Entre as duas partes do adaptador foi acondicionado um filtro específico[2] (Figura 1B e C), cuja função foi a de reter o material aspirado.

Para a realização da coleta, com as mãos enluvadas, todos animais foram devidamente contidos e o aspirador[3] passado em toda extensão de seu corpo (região cervical, dorsal, abdominal, inguinal, cauda e perineal) (Figura 2) durante um período de dois minutos.

Foi utilizado o mesmo aspirador, e entre as coletas foi realizada a higienização do sifão com álcool, para evitar possíveis contaminações entre coletas.

[1] Dustream collection- Indoor Biothecnologies- Charlottesville,US

[2] Dustream filters- Indoor Biothecnologies- Charlottesville,USA

[3] Aspirador MODELO ELECTROLUX 1300 w

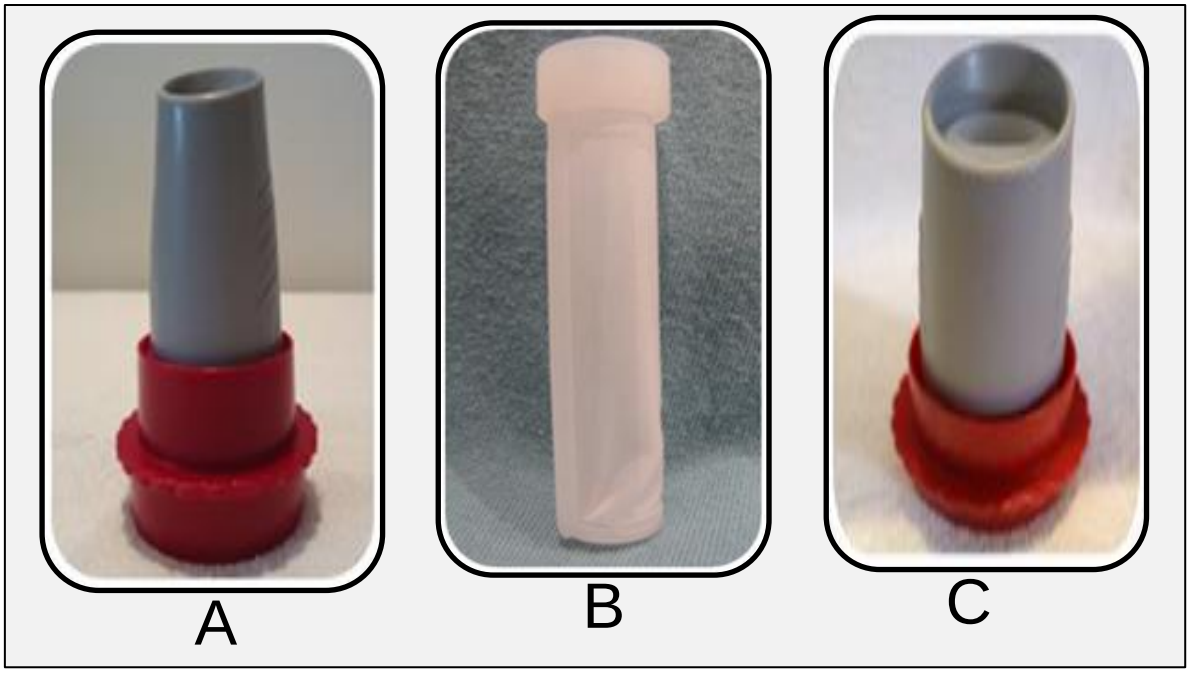

Figura 1 – Figura 1(A), adaptador mais sifão 1(B) filtro , 1(C) sifão mais filtro utilizados para a coleta das amostras de alérgenos Can f 1 dos cães. Fonte: O autor (2013).

Figura 2- Cão contido e submetido à aspiração de sua pelagem para obtenção da poeira e posterior avaliação dos níveis de alérgenos Can f 1 Fonte: o autor (2013)

3.8.2 Acondicionamento das Amostras

Após a coleta de cada amostra, o filtro contendo a poeira foi acondicionado em envelope plástico e identificado com fita adesiva. Todas as amostras coletadas foram armazenadas sob congelamento (Figura 3 A e B) até avaliação das concentrações do alérgeno Can f 1.

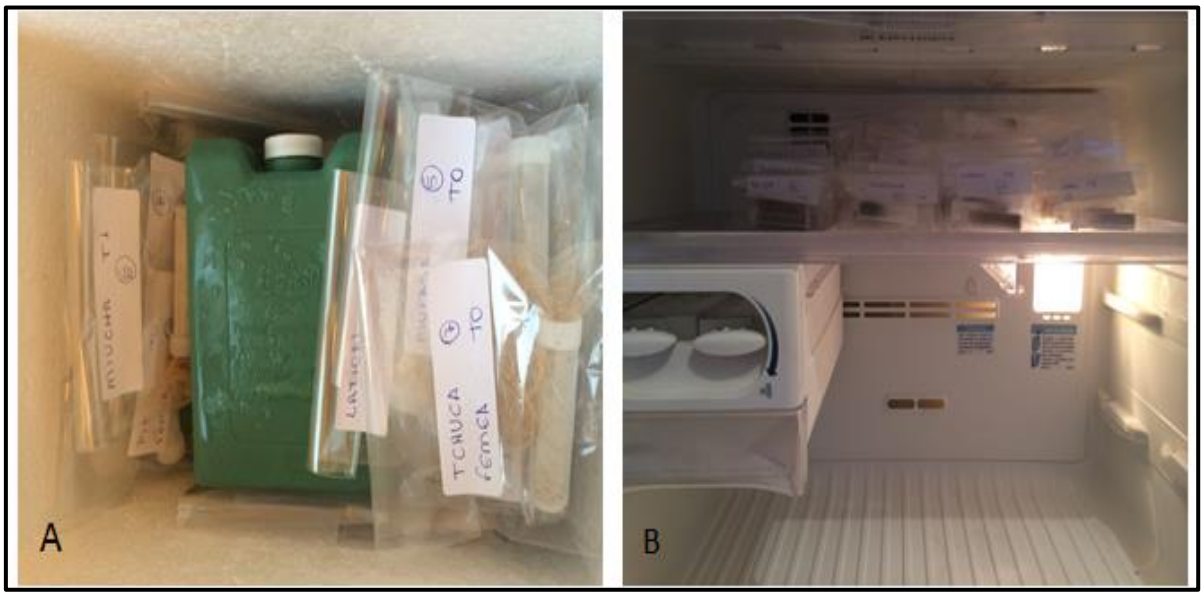

Figura 3- 3(A) as amostras em caixa térmica imediatamente após a aspiração, 3(B) as amostras armazenadas sob congelamento em freezer para posterior análise da concentração de Can f 1.

3.9 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ALÉRGENOS PRESENTES NAS AMOSTRAS

3.9.1 Preparo das Amostras

Todas as amostras coletadas a partir da pelagem dos cães foram retiradas do filtro, acondicionadas e friccionadas com uma pá de plástico de pesagem, contra uma malha de 0,3 mm de diâmetro[4], o que permitia a retenção de partículas maiores e a precipitação em placa de Petri apenas a poeira fina (Figura 4A, 4B, 4C e 4D).

[4] Malha de 0,3mm de diâmetro (STANDARD SIEVE SERIES A.S.T.M- EUA).

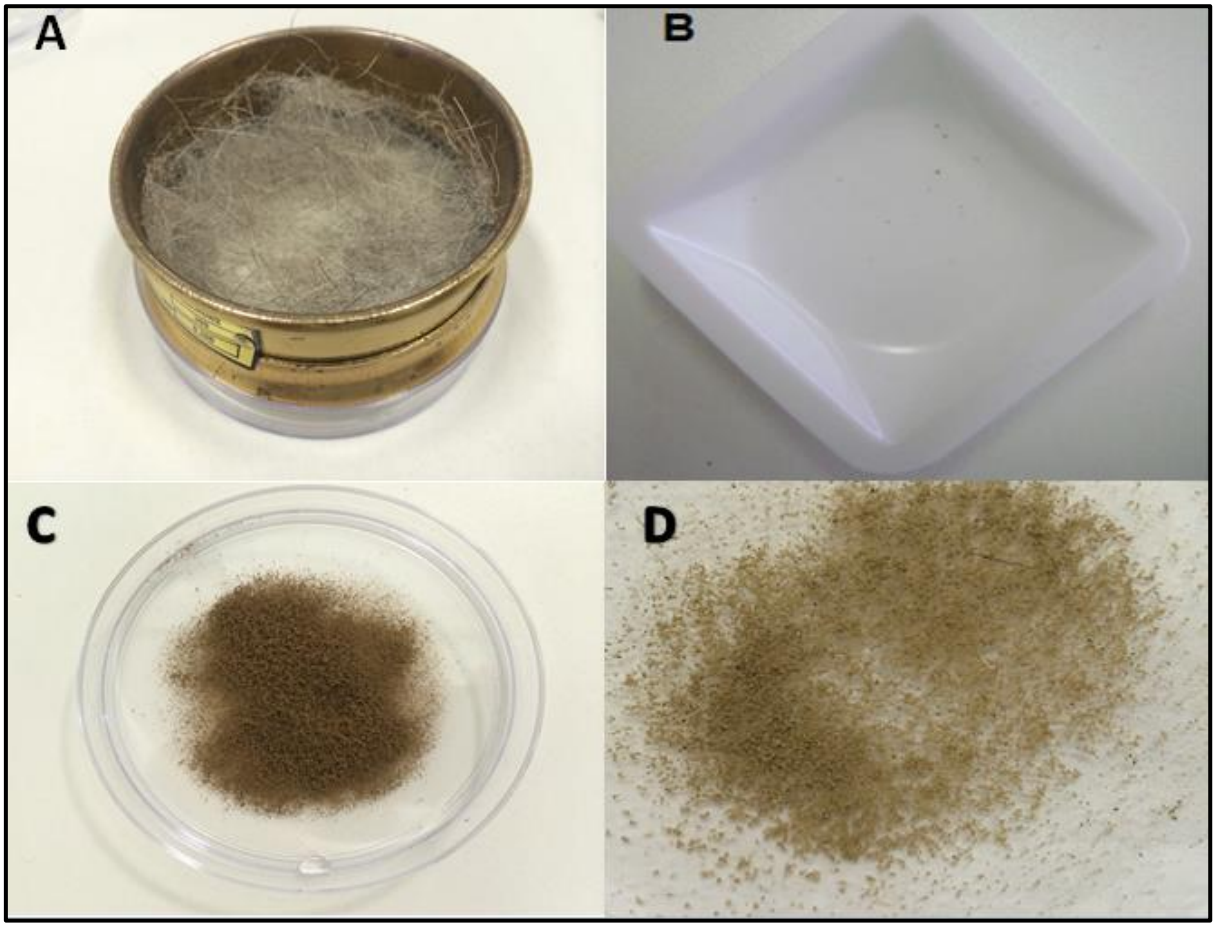

Figura 4– 4(A) Pelo e poeira antes da peneiragem, retirada do filtro e acondicionada em malha com 0,3mm de diâmetro; 4(B) pá de plástico utilizada para friccionar a poeira contra a malha; 4(C) poeira fina acondicionada em placa de petri e 4(D) em detalhe a amostra de poeira utilizada para avaliação dos níveis de alérgenos. Fonte: o autor (2013).

Para preparação dos extratos, 100mg de poeira fina foram colocadas em tubo de ensaio, onde foi adicionado a 2 mL de PBS-T (Solução salina tamponada com fosfato, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20).

Para amostras abaixo de 50 mg foi adicionado 1 mL, e para amostras entre 50 e 100 mg foi adicionada quantidade proporcional de PBS-T. Posteriormente, as amostras foram re-suspendidas com a utilização de um agitador Vortex [5] e os tubos foram colocados em rotador orbital por 24 horas, a 4^0C.

[5] Agitador tipo DAIGGER VORTEX- GENIE 2

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm, a 4^0C por 20 minutos. O sobrenadante (aproximadamente 1,5 mL) foi removido com auxílio de pipeta de Pasteur e acondicionado a -20^0C, em tubos de Eppendorf[6], devidamente identificado, para posterior análise (Figura 5).

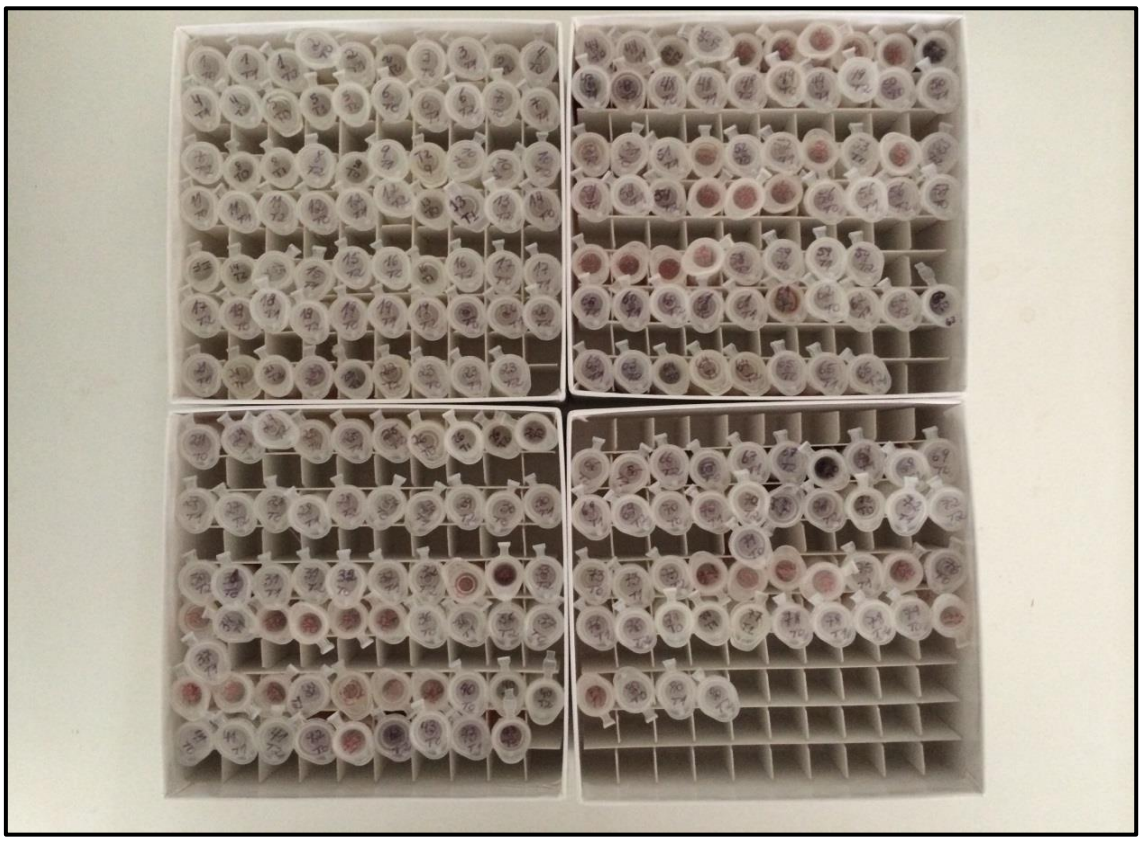

Figura 5- Sobrenadante das amostras devidamente identificado e acondicionados em tubos de eppendorf e mantidos a -20 ºC para análise Fonte o autor (2013)

3.9.2 Análise das Concentrações do Alérgeno Can f 1

As concentrações de alérgeno Can f 1 foram determinados por intermédio de ensaio imunoenzimático (ELISA), como descrito por Schou et al.,(1992).

Para tanto, placas de microtitulação foram cobertas com 1µg/poço do anticorpo monoclonal 6E9 (anti Can f 1) em tampão carbonato-bicarbonato

[6] Tubos Eppendorf Lobind

50mM, pH 9,6, e as placas foram mantidas a 4^0C por 18 horas. Após três lavagens com PBS-T, as placas foram bloqueadas usando 0,1 mL de 1% BSA PBS-T por 30 minutos 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 1:5, e as placas foram mantidas por uma hora à temperatura ambiente.

Uma curva controle foi construída a partir de um extrato de referência de escamas de cão, fazendo diluições seriadas de 1.000 UI/mL a 2 UI/mL em duplicata. As placas foram mantidas por uma hora à temperatura ambiente.

Após cinco lavagens[7] com PBS-T, foram adicionados 0,1 mL de anticorpo policlonal de coelho anti Can f 1, diluído 1:1000 em 1% BSA PBS-T. As placas foram mantidas por uma hora à temperatura ambiente(Figura 6).

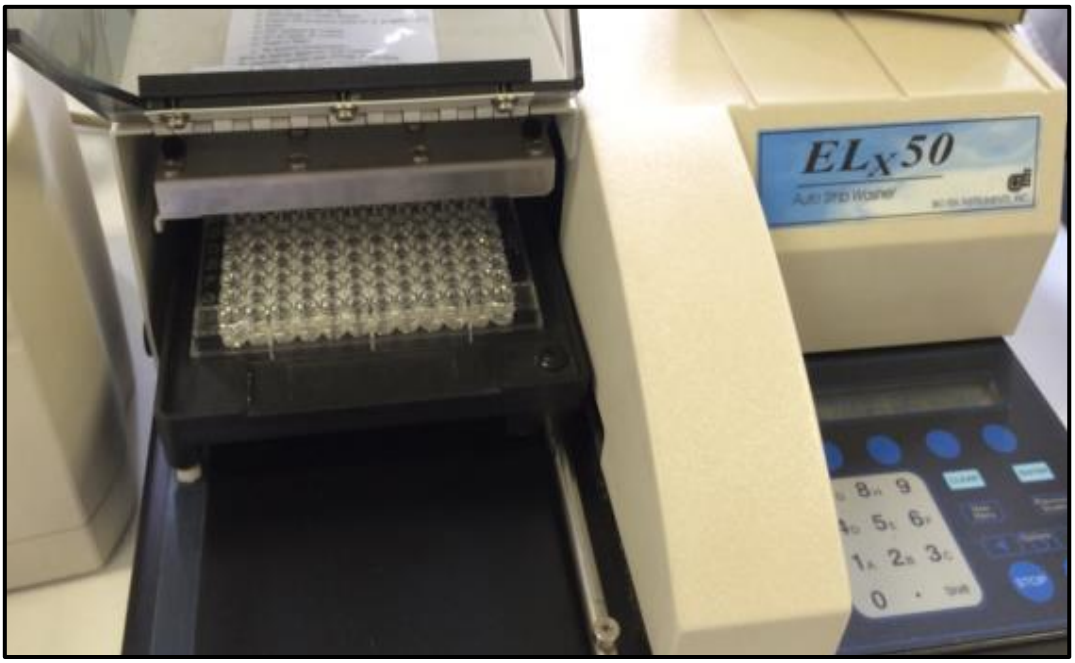

Figura 6- Lavador de microplacas automático modelo ELX 50 AUTO STRIP WASHER. Fonte: o autor (2013).

Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T, e adicionados 0,1 mL de IgG de cabra anti-coelho, diluído 1:1000 em 1% BSA PBS-T. As placas novamente foram mantidas por uma hora à temperatura ambiente.

Após cinco lavagens com PBS-T, foram adicionados 0,1 mL de ABTS 1

[7] Lavador de microplacas automático MODELO ELX 50 AUTO STRIP WASHER.

mM em tampão Citrato-Fosfato, pH 4,2 contendo 0,03% de H_2O_2, para desenvolver a reação.

A leitura das placas foi realizada em leitor[8] de microplacas de ELISA[9] (Figura 7A e B) quando a absorvância do topo da curva controle (λ=405 nm) alcançou 2,0 a 2,4. Cada Unidade Internacional (IU) equivaleu aproximadamente a 1µg de proteína Can f 1.

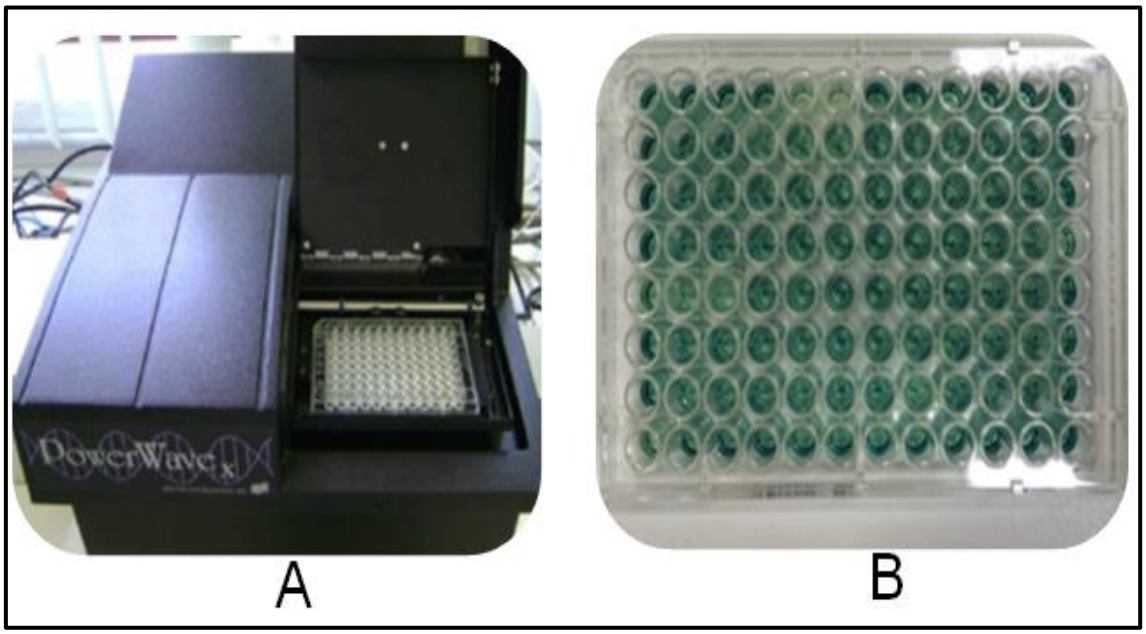

Figura 7- 7(A) leitor de ELISA 7(B) micro-placa de ELISA com reatividade positiva para Can f 1 a partir da amostra da poeira obtida dos cães aspirados. fonte: o autor (2013).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram registrados em planilha eletrônica (Microsoft *Excel®),* conferidos e exportados para análise estatística com o *Software Statgraphics Centurion* XVII.

A estimativa da diferença entre médias em relação aos grupos de estudo foi realizada pelo método de ANOVA, seguido do teste de Bonferroni para comparação entre médias, associado ao teste t-Student.

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

[8] Leitor de elisa POWER WAVE X
[9] Placas de microtitulação Immunolon II Dynatech, USA

4 RESULTADOS

As amostras constituídas neste estudo foram coletadas de 80 cães de características físicas variadas (Tabela 1), provenientes de Curitiba-PR e região metropolitana.

Tabela 1- Dados epidemiológicos dos 80 cães avaliados, relacionados ao gênero sexual, idade, raça, comprimento da pelagem, habitat, frequência de banhos e tipo de piso o qual estavam expostos.

Variáveis		**Percentual (%)**
GENERO SEXUAL	Macho	40 (50,0)
	Fêmea	40 (50,0)
IDADE	1-6	65 (62,5)
Anos	7-14	25 (37,5)
RAÇAS	Beagle	1(1,25)
	Bulldog francês	1(1,25)
	Bulldog inglês	1(1,25)
	Dálmata	2(2,50)
	Daschund	1(1,25)
	Labrador	1(1,25)
	Lhasa apso	6(7,50)
	Pastor alemão	1(1,25)
	Pit bull	3(3,75)
	York shire	1(1,25)
	Sem Raça Definida	62(77,5)
COMPRIMENTO DA PELAGEM	**Curta**	**62 (77,5)**
	Machos	34 (54,8)
	Fêmeas	28(45,1)
	Longa	**18(22,5)**
	Machos	6(33,3)
	Fêmeas	12(66,6)

HABITAT	domiciliados	60(75,0)
	Semidomiciliados	20(25,0)
FREQUÊNCIA DE BANHOS		
	Semanal	48(60,0)
	Quinzenal	12(15,0)
	Mensal	08(10,0)
	Trimestral	12(15,0)
TIPOS DE PISO	Cerâmica	14(58,3)
	Carpete	02(8,3)
	Madeira	02(8,3)
	Laminado	06(25,0)

Fonte: O autor, 2013.

4.1 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ALÉRGENO CAN f 1 NA PELAGEM DOS CÃES.

O Can f 1 foi encontrado em 100% das amostras dos animais avaliados (80 cães), com média de 1,261±0,67 µg/g.

A tabela 2 mostra as concentrações médias e medianas em (µg/g) do alérgeno Can f 1 em relação ao gênero sexual.

Tabela 2- Médias e medidas de dispersão da concentração (µg/g) de Can f 1, encontrados na pelagem de cães de acordo com gênero sexual.

Grupos	Número de cães	Média	Erro padrão	Concentração mínima	Concentração máxima
FÊMEAS	40	1,377	0,111	1,128	1,567
MACHOS	40	1,150	0,111	0,931	1,369

Fonte: O Autor 2014.

Quando se comparou a frequência de positividade de Can f 1 na pelagem de cães machos e fêmeas, não se observou diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$) (Figura 8).

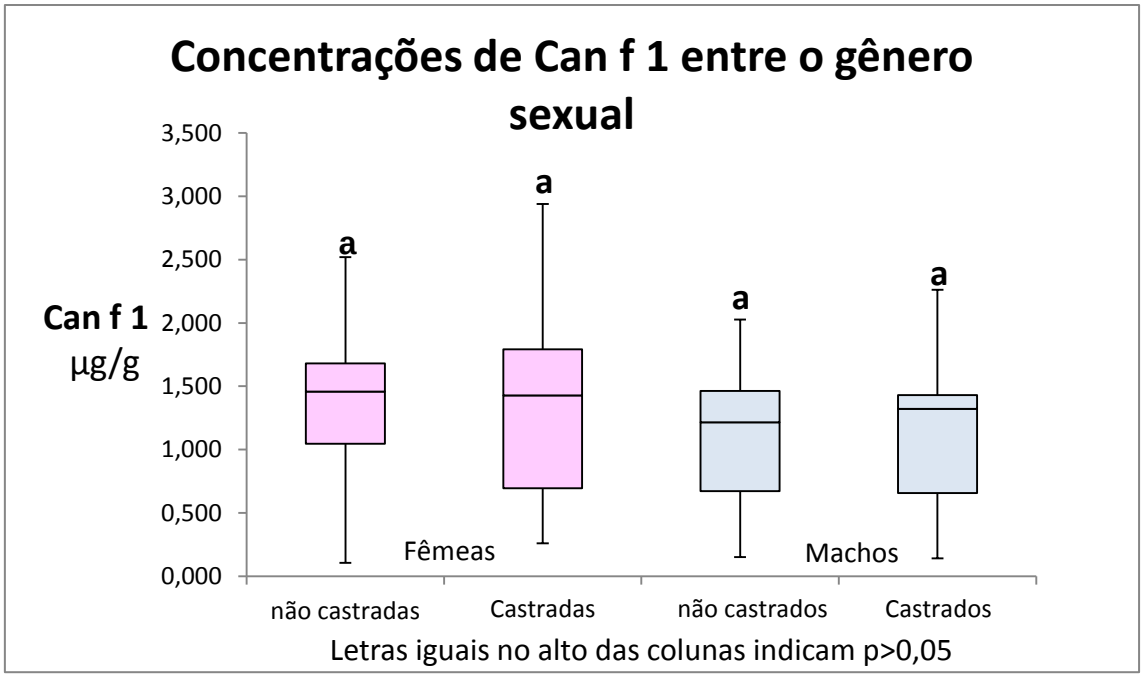

Figura 8- Comparação das concentrações de Can f 1, entre o gênero sexual dos 80 animais estudados.

As concentrações médias de Can f 1 entre os cães machos e fêmeas, castrados (Figura 9) e inteiros (Figura 10) ($p > 0,05$).

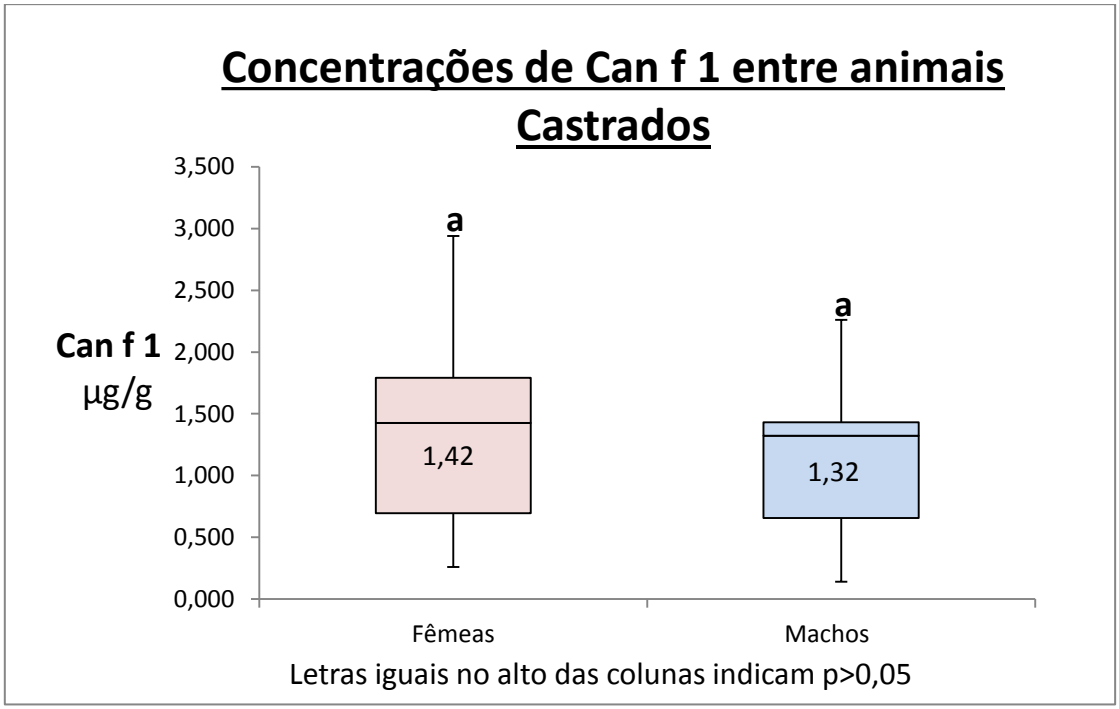

Figura 9- Médias gerais e a dispersão da concentração do alérgeno Can f 1 entre os grupos de cães castrados Fonte: O autor, 2014.

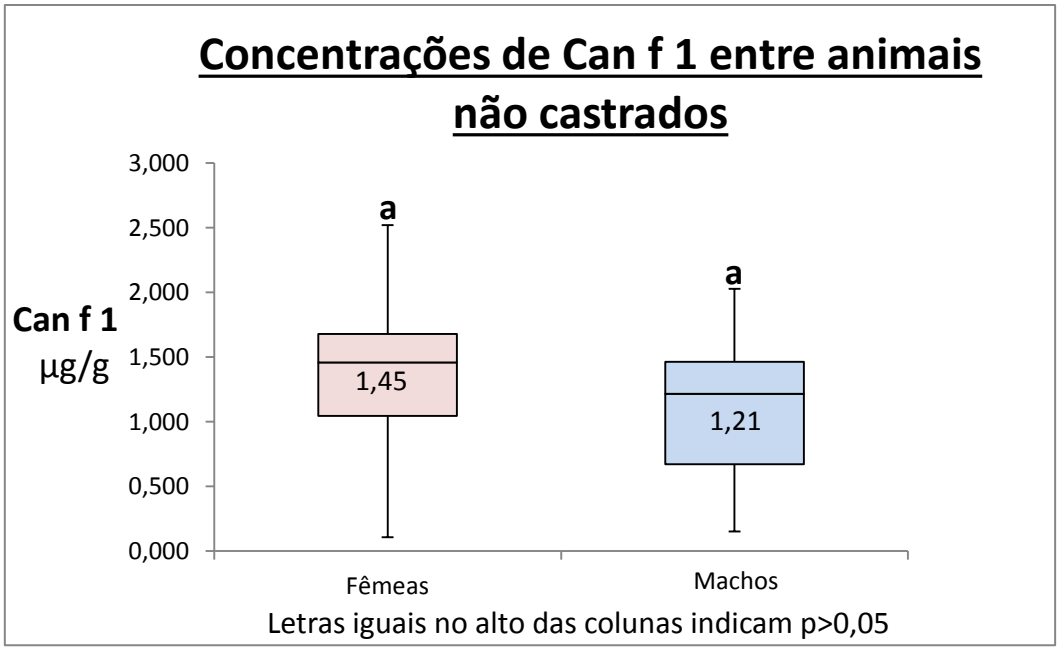

Figura 10- Concentrações média do alérgeno Can f 1, entre os grupos de cães não castrados.Fonte: O autor, 2014.

Quando se comparou as concentrações médias de Can f 1 entre machos não castrados e castrados (Figura 11) e fêmeas não castradas e castradas(Figura 12), também não se observou diferença estatística significativa entre os grupos (p > 0,05).

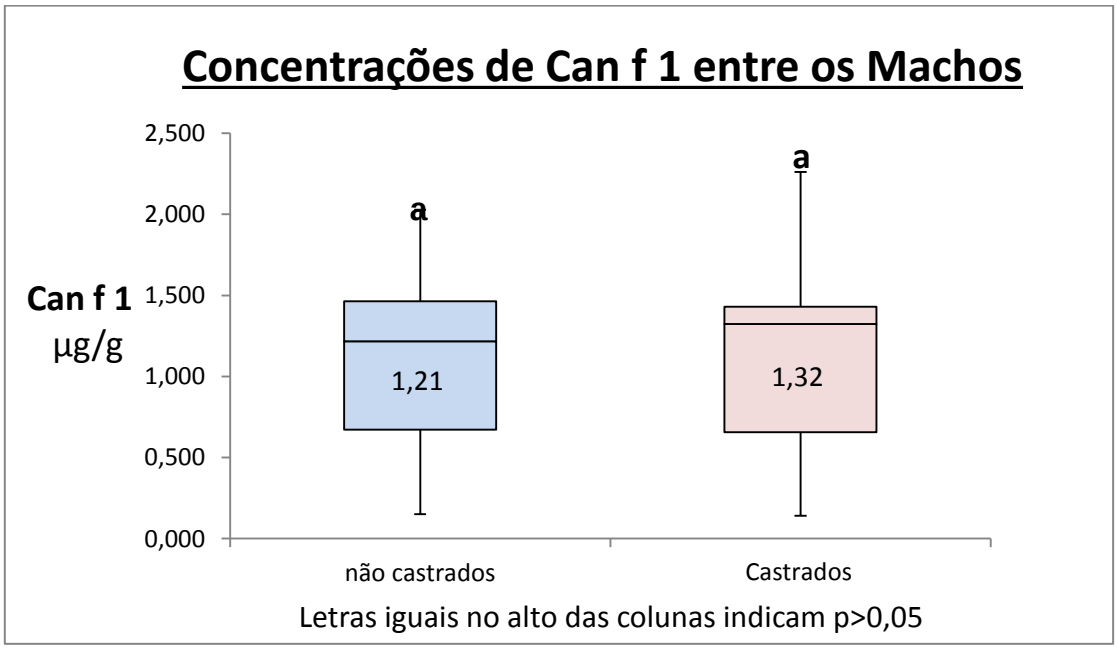

Figura 11- Concentrações média do alérgeno Can f 1, entre os grupos de cães machos Fonte: O autor, 2014.

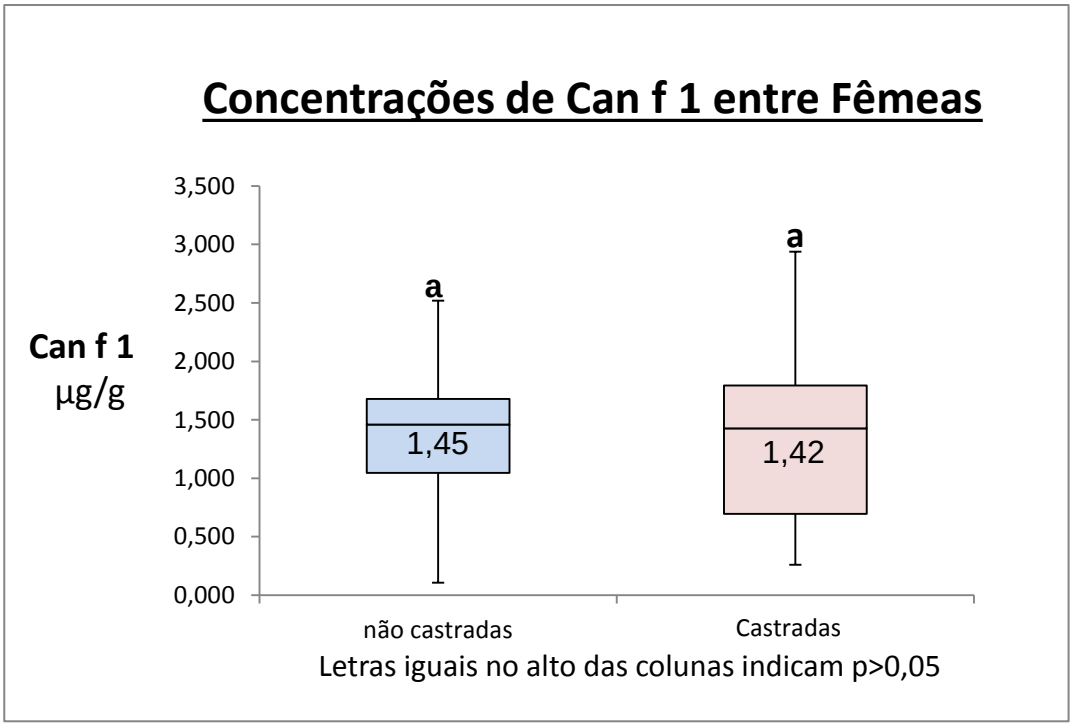

Figura 12- Concentrações média do alérgeno Can f 1, entre os grupos de cães fêmeas. Fonte: o autor 2014.

5 DISCUSSÃO

O Can f 1 é o mais importante alérgeno proveniente do epitélio do cão (Portnoy et al., 2011). Este permanece suspenso por longos períodos no ambiente, pode ser prontamente inalado e atingir as vias aéreas superiores e inferiores dos humanos, desencadeando sintomas clínicos de rinite e asma alérgicas, além de ser associado à rinoconjuntivites (Farias e Rosário, 2012).

A concentração média de Can f 1 na pelagem encontrada no presente estudo foi de 1,26 µg/g, concentração esta inferior ao encontrado por Farias e Rosário (2012), que ao avaliar a pelagem dos cães, verificaram Can f 1 em 96,9% das amostras, em uma concentração média de 3,3 µg/g.

Esta diferença provavelmente é devido ao fato que os cães avaliados por Farias e Rosário (2012) foram, em sua maioria, animais mantidos em quintais, não higienizados, escovados ou tosados regularmente, o que pode ter favorecido a retenção de queratina, debris celulares e material sebáceo em sua pelagem, elementos estes ricos em Can f 1 conforme descreve Ramadour et al. (2005).

As concentrações observadas no presente estudo também são inferiores ao encontrado por Hodson et al. (1999) que documentaram concentrações médias que variaram de 6,29 a 13,19µg/g e por Ramadour et al., (2005).

No entanto é importante ressaltar que as técnicas utilizadas para obtenção das amostras foram diferentes, já que Ramadour et al., (2005), obteve suas amostras a partir de 100 mg de pelo coletados de várias partes do corpo do animal e incubado durante 24 h a 4 º C com uma solução tampão, já no estudo realizado por Hodson et al., (1999) e em nosso estudo utililizamos a aspiração da pelagem dos cães para obtenção da amostra, porém o tempo de aspiração utilizado pelo autor foi o dobro ao utilizado em nosso estudo.

A maioria das coletas foi realizada em Curitiba-PR, totalizando 72 cães provenientes de área urbana e apenas oito cães foram de zona rural, sendo que destes cães, a maioria obedecia a padrão higiênico sanitário bom, ou seja, eram submetidos a banhos e escovações regulares. Esse fato pode justificar as baixas concentrações de alérgeno Can f 1 encontrado na pelagem nos cães do presente estudo.

Desta forma, o fator socioeconômico pode ter influenciado na baixa concentração do alérgeno Can f 1 nos cães avaliados, pois estes, em sua maioria, eram domiciliados e costumavam ser higienizados regularmente.

Apesar das baixas concentrações, Leung e Lai, (1997), indicaram que a concentração de 1µg de Can f 1 por grama de poeira já é capaz de causar sensibilização em indivíduos predispostos, o que denota um potencial de risco dos cães avaliados no presente estudo.

Vredegoor et al. (2012) afirmaram não existir raças “hipoalergênicas”, e que todos os cães produzem e podem ter Can f 1 em sua pelagem. Estes resultados são semelhantes aos observados no presente estudo, no qual Can f 1 foi encontrado em 100% das amostras dos cães estudados, a razão pelo qual este alérgeno é amplamente encontrado na pelagem dos cães pode estar relacionado a origem biológica , visto que o Can f 1 tem como principal origem as glândulas salivares (Polovic et al., 2013).

A concentração deste alérgeno no epitélio de cães pode variar e os fatores desencadeantes desta variação ainda são muito discutidos. Ramadour et al. (2005) relataram que a concentração de Can f 1 produzido pode variar conforme as características da raça, gênero sexual, e a presença de disqueratose na pele destes.

Em algumas raças de cães, onde o Can f 1 foi analisado, houve importante variação de suas concentrações médias, sendo que em cães da raça Labrador a concentração foi de 1,99 µg/g, em cães Yorkshire terrier, a concentração foi de 16,72 µg/g, e em Poodles, 17,04 µg/g (Ramadour et al., 2005).

Como a concentração de 10µg/g de Can f 1 é capaz de produzir sintomas de rinite e asma (Leung e Lai, 1997), cães da raça Poodle e York shire terrier, por apresentarem índices superiores a 10 µg/g, provavelmente não são indicados para o convívio com pessoas alérgicas. Entretanto, isto pode ser variável, de acordo com os hábitos de higiene e convívio entre os proprietários e seus cães, bem como variações de Can f 1 podem também ocorrer em indivíduos da mesma raça (Ramadour et al., (2005).

Nesse estudo foi observado que todos os cães, independente do gênero sexual e do estado reprodutivo, possuíam Can f 1 em sua pelagem, e suas concentrações não apresentaram diferença estatísticamente significativa.

Isto pode ser explicado pelo fato que o Can f 1 ser uma lipocalina produzida principalmente nas glândulas salivares dos cães e, por este motivo, suas concentrações não sofrem influência hormonal, o que corrobora os achados Ramadour et al. (2005), que também não encontrou diferença entre animais castrados e não castrados em seu estudo, no entanto contraria Reininger et al., (2007) pois afirmam que a influência hormonal favorece uma maior produção de sebo pelas glândulas sebáceas, adanais hepatóides e supracaudais, e maior concentração de alérgenos na sua pelagem.

Dessa forma, as concentrações de Can f 1 podem estar mais relacionadas ao ato do cão de lamber, bem como a sua disseminação pela pelagem.

6- CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir que:

a- Todos os cães do estudo tiveram Can f 1 em sua pelagem;
b- Não há diferença na concentração de Can f 1 em relação ao gênero sexual.
c- Não há diferença na concentração de Can f 1 em relação ao estado reprodutivo.

CAPITULO 3

AVALIAÇÃO DE UMA SOLUÇÃO HIGIENIZANTE E HIDRATANTE NO CONTROLE DA CONCENTRAÇÃO DE CAN F 1 NA PELAGEM DE CÃES.

Evaluation of a solution sanitizing and moisturizer in control of concentration Can f 1 in coat of dogs.

RESUMO

O Can f 1 é o principal alérgeno do epitélio de cães. Este é uma lipocalina de natureza adesiva, ubiquitária, que pode permanecer em suspensão por longos períodos e ser prontamente inalada. Limpeza ambiental periódica, exclusão do cão, sua esterilização e banhos frequentes têm sido recomendados para reduzir as concentrações ambientais de Can f 1, porém, sem resultados concretos. Recentemente, soluções tópicas moduladoras da concentração de alérgenos têm sido indicadas para diminuir a quantidade destes na pelagem de cães e gatos, entretanto, sua real eficácia necessita de documentação científica. O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia da solução higienizante e hidratante a base de colágeno, alantoína, pantenol e gel de *Aloe vera* na minimização das concentrações de Can f 1 na pelagem de cães. Foram selecionados 80 cães hígidos, com idade superior a um ano, independente do tamanho, peso e raça. Destes, 40 foram submetidos ao uso da solução (Grupo 1) e 40 foram lavados apenas com água (Grupo 2). A amostra da poeira presente na pelagem de cada cão de ambos os grupos foi coletada antes (T0), uma hora após (T1) e uma semana depois do uso da solução. Os níveis de Can f 1 de cada amostra foi analisado através de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando anti Can f 1 (Indoor Biothecnologies-Chartottesville USA.). Todos os dados foram analisados pelo método ANOVA e Bonferroni, e a estimativa da diferença entre médias em relação aos grupos foi avaliado pelo Test t student, com nível de significância adotado de 5% ($p < 0,05$). Não houve redução significativa na concentração média de Can f 1 na pelagem dos cães em uma hora 1,14 µg/g ($p > 0,05$) e após sete dias 1,24 µg/g ($p > 0,05$) do uso da solução higienizante e hidratante a base de colágeno, alantoína, pantenol e gel de *Aloe vera.* Conclui-se assim que a solução utilizada, não apresenta eficácia imediata e tardia na redução das concentrações de Can f 1 na pelagem dos cães.

Palavra chave: Alergia, Rinite, Asma.

EVALUATION OF A SOLUTION SANITIZING AND MOISTURIZER IN CONTROL OF CONCENTRATION CAN F 1 IN COAT OF DOGS.

ABSTRACT

Can f 1 is the major allergen from dog epithelium. This is a adhesive lipocalin nature ubiquitously, which can remain in suspension for long periods and be readily inhaled. Periodic environmental cleanup, dog exclusion, sterilization and frequent baths have been recommended to reduce the environmental concentrations of Can f 1, but without concrete results. Recently, topical solutions modulating the concentration of allergens have been shown to decrease the amount of these in the fur of cats and dogs, however, their actual effectiveness requires scientific documentation. The present study aimed to evaluate the effectiveness of the sanitizer and moisturizer based solution of collagen, allantoin, panthenol and aloe vera gel to minimize the concentrations of Can f 1 in the coat of dogs. 80 healthy dogs older than one year, regardless of size, weight and race were selected. Of these, 40 were subjected to the use of the solution (Group 1) and 40 were washed with water only (Group 2). Dust sample present in the coat of each dog in both groups was collected before (T0), one hour after (T1) and one week after application of the solution. The levels of Can f 1 of each sample was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using anti-Can f 1 (Indoor Biothecnologies-Chartottesville USA.). All data were analyzed by ANOVA and Bonferroni method, and the estimate of the difference between means in the groups was evaluated by Student's t test, with significance level of 5% ($p \leq 0.05$). There was no significant reduction in the average concentration of Can f 1 in the coat of dogs in an hour 1.14 µg/g ($p \geq 0.05$) and after seven days 1.24µg/g ($p \geq 0,05$) use of sanitizing and moisturizing base of collagen, allantoin, panthenol and aloe vera gel solution. We conclude that the solution used, not present immediate and delayed effectiveness in reducing concentrations of Can f 1 in the coat of the dogs.

Keyword: Allergy, Rhinitis, Asthma.

1 INTRODUÇÃO

A prevalência das doenças alérgicas respiratórias asma e rinite têm aumentado muito nos últimos anos e representam um grande problema, tanto no nível de saúde pública quanto para os indivíduos acometidos, comprometendo o bem-estar e a qualidade de vida (Rizzo e Cruz, 2007).

O desenvolvimento dos sintomas clínicos de rinite, asma e conjuntivite alérgicas têm sido precipitados ou exacerbados após a exposição a uma pletora de alérgenos ambientais presentes no domicílio, geralmente eliminados por ácaros da poeira doméstica, cães, gatos, fungos, baratas e plantas (Eggleston e Bush, 2001; Hesselmar et al., 2003; Ownby e Johnson, 2003; Camara et al., 2004; Wright, 2004; Upham e Holt, 2005).

O número de residências com animais de companhia tem aumentado a cada ano, e a excessiva exposição de proprietários aos cães e gatos tem colaborado para precipitação ou exacerbação de crises alérgicas, visto que muitos destes animais são mantidos em condições insatisfatórias de manejo nutricional, higiênico-sanitário e em espaços físicos inapropriados, o que aumenta a chance de agirem como reservatório e veiculadores de alérgenos para o ambiente de proprietários expostos.

Os alérgenos provenientes de cães, principalmente o Can f 1, Can f 2 e albumina canina (Can f 3), e de gatos, como o Fel d 1, têm sido relacionados a sensibilização e o desenvolvimento de rinite e asma alérgicas em 22 a 67% dos casos em crianças e adultos (Ownby e Johnson, 2003).

Estes alérgenos são originários da saliva, urina e das secreções das glândulas sebáceas destes animais (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 (Platts- mills, 2009; Portnoy et al.; 2011).

Devido a sua adesividade, estes alérgenos são amplamente carreados pelas pessoas nas roupas, sapatos, automóveis e inúmeros fômites (Platts-Mills, 2009; Portnoy et al,. 2011), e desta forma, são encontrados em ambientes com e sem animais domésticos.

Para o controle de alérgenos provenientes do epitélio de animais, a remoção destes do ambiente domiciliar é capaz de reduzir a quantidade de

seus alérgenos em até quatro meses (Portnoy et al., 2011), entretanto, proprietários de animais de companhia, na maioria das vezes, se recusam a se desfazer de seus animais de estimação (Phipatanakul, 2001).

Manter animais em ambientes externos é uma resolução parcial, já que seu contato com a família pode tornar as pessoas transportadores passivos de seus alérgenos para o ambiente domiciliar (Erwin et al., 2005).

A remoção de materiais alergênicos produzidos por animais domésticos por meio da limpeza ambiental, aspiração de pó, utilização de filtros de ar, exclusão de carpetes, tapetes e outros forros têxteis e sintéticos constitui uma importante medida preventiva (Liccardi et al., 2000).

A minimização do contato, a higienização e escovação periódica de cães também têm sido indicadas no intuito de minimizar a exposição a alérgenos destes e outros que sua pelagem possa albergar (Portnoy et al., 2011).

Hodson et al., (1999) mostraram que o aumento na frequência de banhos, não está relacionado com concentrações mais baixas de alérgenos, tanto no pelo do cão, como no ambiente que ele vive.

Assim, na tentativa de minimizar a quantidade de alérgenos presentes na pelagem de cães e gatos, soluções moduladoras de alérgenos de uso tópico têm sido produzidas e indicadas, entretanto, sua real eficácia ainda necessita de documentação científica adequada (Portnoy et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar a eficácia de uma solução higienizante e hidratante [10] na minimização da concentração de Can f 1 na pelagem de cães.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

a- Avaliar se há eficácia imediata e após uma semana da utilização da solução;
b- Avaliar se há desenvolvimento de dermatite de contato irritante e manifestações farmacodérmicas relacionada ao uso da solução;

[10] Solução tópica Free & Clear ® Bayer.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Foi realizado um estudo longitudinal, com amostras de conveniência, e não randomizado em cães independente do seu estado reprodutivo e gênero sexual.

3.2 AVALIAÇÃO PELO 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 830B (ANEXO 1).

Todos os proprietários foram devidamente orientados e esclarecidos sobre a pesquisa e assinaram termo de consentimento (ANEXO 2).

3.3 SELEÇÃO DOS ANIMAIS

Foram selecionados para participar do estudo 80 cães, hígidos, domiciliados e semidomiciliados, oriundos da rotina de atendimento do Hospital Veterinário São Bernardo, Curitiba-PR.

3.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos no estudo cães hígidos, independente do tamanho, peso ou raça, com idade superior a um ano.

Nenhum dos animais incluídos no estudo apresentava ectoparasitas, dermatopatias, e todos recebiam banhos ou tratamento acaricida de forma regular.

Os responsáveis foram orientados previamente quanto à manutenção do animal sem banho, por pelo menos sete dias, e que não fosse aplicado qualquer produto pulicida e acaricida na pelagem dos cães, durante o período do experimento.

3.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo animais com idade inferior a um ano, fêmeas prenhes e cães indóceis.

3.6 PERDA AMOSTRAL

No presente estudo, foram considerados perda amostral e substituídos:

a- Animais que tomaram banhos e usaram medicação pulicida e acaricida logo antes e após a utilização da solução teste;
b- Proprietários que não retornassem na data agendada para reavaliação e aspiração;
c- Animais que apresentassem alguma dermatite de contato irritante após a utilização da solução.

3.7 FORMAÇÃO DOS GRUPOS DE ESTUDO

Os animais incluídos no estudo foram separados nos 02 grupos, descritos abaixo:

(GRUPO A)- Tratado: Composto por 40 cães, independente da raça, tamanho e gênero sexual.

(GRUPO B)- Controle: Composto por 40 cães, independente da raça, tamanho e gênero sexual.

3.8 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

3.8.1 Utilização da solução higienizante, hidratante e moduladora da concentração de alérgenos e coleta das amostras no Grupo A.

Os animais pertencentes ao Grupo A foram devidamente contidos e submetidos à escovação superficial para remoção dos pelos soltos.

Para a coleta das amostras, era usado um aspirador[11] , no qual, em sua extremidade era acoplado um adaptador junto ao sifão de sucção[12] (Figura 1A)**.** Entre as duas partes do adaptador foi acondicionado um filtro específico[13] (Figura 1B e C), cuja função era a de reter o material aspirado.

O aspirador era passado em toda a extensão do corpo do animal, nas regiões cervical, dorsal, abdominal, inguinal, axilar, da cauda e períneal (Figura 2), durante um período de dois minutos (T0). Entre cada aspiração o sifão foi submetido a higienização com álcool para evitar possíveis contaminações em cães.

Em seguida, com as mãos enluvadas, uma toalha esterilizada, e individual, era umedecida abundantemente com a solução teste (Figura 3) e friccionada, primeiramente no sentido dos pelos, para distribuir a solução e, logo após, no sentido inverso, para distribuí-lo na raiz.

Após o uso do produto, o animal era deixado para secar naturalmente, e não foi submetido ao enxague.

Após uma hora, o animal foi contido novamente e realizado uma segunda aspiração (T1) por toda a extensão do corpo do animal (Figura 1), durante período de dois minutos.

Após a segunda aspiração, o proprietário era orientado para não dar banhos, ou usar qualquer produto tópico no cão até a próxima aspiração.

Após sete dias, o animal era contido com auxilio do proprietário, e a terceira aspiração (T2) era realizada, seguindo os mesmos procedimentos das aspirações pregressas.

[11] Aspirador MODELO ELECTROLUX 1300 w
[12] Dustream collection- Indoor Biothecnologies- Charlottesville,US
[13] Dustream filters- Indoor Biothecnologies- Charlottesville,USA

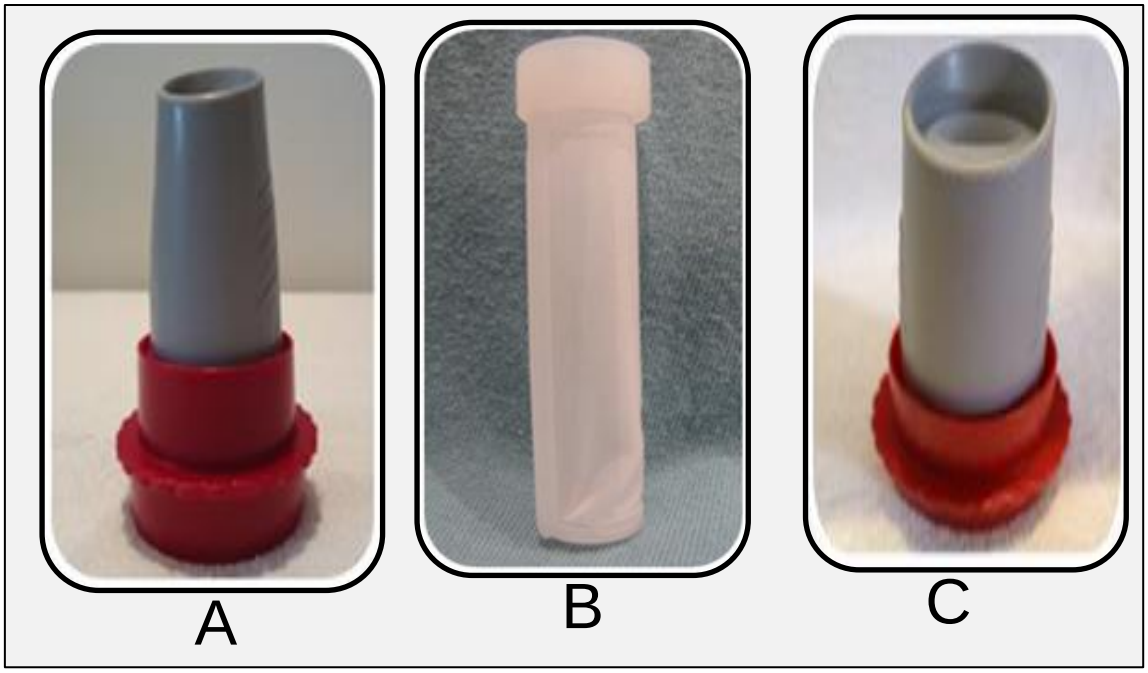

Figura 1 – Figura 1(A), adaptador mais sifão; 1(B) filtro; 1(C) sifão mais filtro utilizados para a coleta das amostras de alérgenos Can f 1 dos cães. Fonte: o autor (2013).

Figura 2- Cão contido e submetido à aspiração de sua pelagem para obtenção da poeira e posterior avaliação dos níveis do alérgeno Can f 1. Fonte: o autor (2013).

3.8.2 Protocolo experimental e coleta das amostras no Grupo B.

Os animais pertencentes ao Grupo B foram contidos e submetidos à escovação para remoção dos pelos soltos.

O protocolo experimental utilizado no grupo B era semelhante ao do grupo A, porém era utilizado, ao invés da solução teste, uma toalha individual e esterilizada, umedecida apenas com água da rede pública de abastecimento.

3.8.3 Acondicionamento das amostras

Após a coleta de cada amostra, o filtro contendo a poeira era individualmente acondicionado em envelope plástico e identificado com fita adesiva. Todas as amostras coletadas eram armazenadas sob refrigeração de 0ºC a 4ºC imediatamente após a coleta e posteriormente congeladas, (Figura 3A e B) até avaliação das concentrações do alérgeno Can f 1.

Figura 3- 3(A) as amostras em caixa térmica imediatamente após a aspiração, 3(B) as amostras armazenadas sob congelamento no freezer para posterior análise da concentração de Can f 1.

3.9 AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE ALÉRGENOS PRESENTES NAS AMOSTRAS

3.9.1 Preparo das Amostras

As análises das concentrações de Can f 1 foram realizadas no Laboratório de Alergia e Imunologia Clínica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo (USP).

Todas as amostras coletadas a partir da pelagem dos cães foram retiradas do filtro, acondicionadas e peneiradas, utilizando uma pá de plástico de pesagem para friccionar a amostra contra uma malha de 0,3 mm de diâmetro[14], o que permitia a retenção de partículas maiores, e a retenção na placa de Petri apenas a poeira fina (Figura 4A, 4B, 4C, 4D).

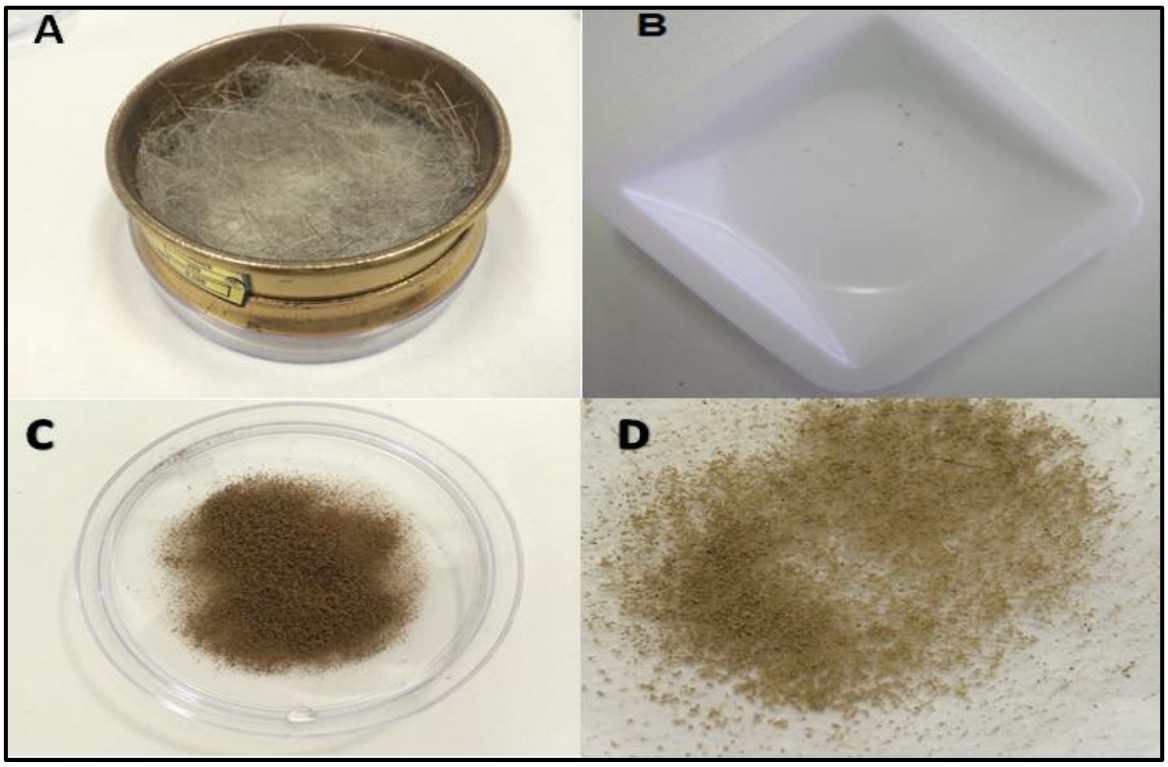

Figura 4– Figura 4(A) pelo e poeira antes da peneiragem, retirada do filtro e acondicionada em malha com 0,3mm de diâmetro; 4(B) pá de plástico utilizada para friccionar a poeira contra a malha; 4(C) poeira fina acondicionada em placa de petri e 4(D) em detalhe a amostra de poeira utilizada para avaliação dos níveis de alérgenos.Fonte: o autor (2013).

[14] Malha de 0,3mm de diâmetro (STANDARD SIEVE SERIES A.S.T.M- EUA).

Para preparação dos extratos, 100mg de poeira fina foram colocada em tubo de ensaio, onde foi adicionado a 2 mL de PBS-T (Solução Salina Tamponada com Fosfato, pH 7,4, contendo 0,05% de Tween 20).

Para amostras abaixo de 50 mg foi adicionado 1 mL, e para amostras entre 50 e 100mg foi adicionada quantidade proporcional de PBS-T. Posteriormente, as amostras foram re-suspendidas com a utilização de um agitador Vortex[15] e os tubos foram colocados em rotador orbital por 24 horas, a 4^0C.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 2500 rpm, a 4^0C por 20 minutos. O sobrenadante (aproximadamente 1,5 mL) foi removido com auxílio de pipeta de Pasteur e acondicionado a -20^0C, em tubos de Eppendorf[16], devidamente identificado, para posterior análise (Figura 5).

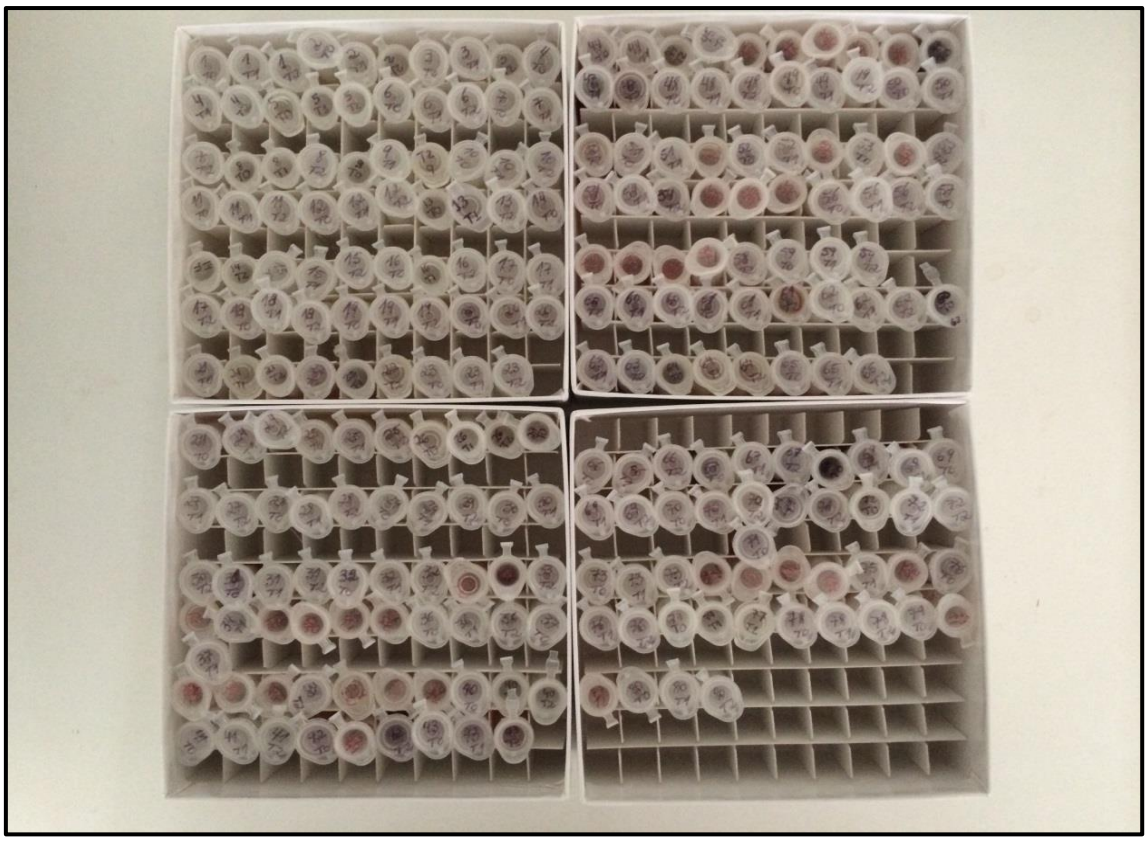

Figura 5- Sobrenadante das amostras devidamente identificado e acondicionado em tubos de eppendorf e mantidos a -20ºC para posterior análise Fonte: O autor ,2013.

[15] Agitador tipo DAIGGER VORTEX- GENIE 2
[16] Tubos Eppendorf Lobind

3.9.2 Análise das Concentrações do Alérgeno Can f 1

As concentrações de Can f 1 foram determinados por intermédio de ensaio imunoenzimático (ELISA), como descrito por Schou et al. (1992).

Para tanto, placas de microtitulação foram cobertas com 1µg/poço do anticorpo monoclonal 6E9 (anti Can f 1) em tampão carbonato-bicarbonato 50mM, pH 9,6, e mantidas a 4^0C por 18 horas. Após três lavagens com PBS-T, as placas foram bloqueadas usando 0,1 mL de 1% BSA PBS-T por 30 minutos 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 1:5, e as placas foram mantidas por uma hora à temperatura ambiente.

Uma curva controle foi construída com extrato de referência de escama de cão, e diluições seriadas de 1.000 UI/mL a 2 UI/mL em duplicata. As placas foram mantidas por uma hora à temperatura ambiente.

Após cinco lavagens[17] com PBS-T, foram adicionados 0,1 mL de anticorpo policlonal de coelho anti Can f 1, diluído 1:1000 em 1% BSA PBS-T. As placas foram mantidas por uma hora à temperatura ambiente (Figura 6).

Figura 6- Lavador de microplacas automático modelo elx 50 auto strip washer. Fonte: o autor, 2013.

[17] Lavador de microplacas automático MODELO ELX 50 AUTO STRIP WASHER.

Em seguida, as placas foram lavadas cinco vezes com PBS-T, e em seguida adicionados 0,1 mL de IgG de cabra anti-coelho, diluído 1:1000 em 1% BSA PBS-T. As placas novamente foram mantidas por uma hora à temperatura ambiente.

Após cinco lavagens com PBS-T, foram adicionados 0,1 mL de ABTS 1 mM em tampão Citrato- Fosfato, pH 4,2 contendo 0,03% de H_2O_2, para desenvolver a reação.

A leitura das placas foi realizada em leitor[18] de microplacas de ELISA[19] quando a absorvância do topo da curva controle (λ=405 nm) alcançou 2,0 a 2,4.

Cada unidade Internacional (IU) equivaleu a aproximadamente a 1µg de proteína Can f 1(Figura 7A e 7B).

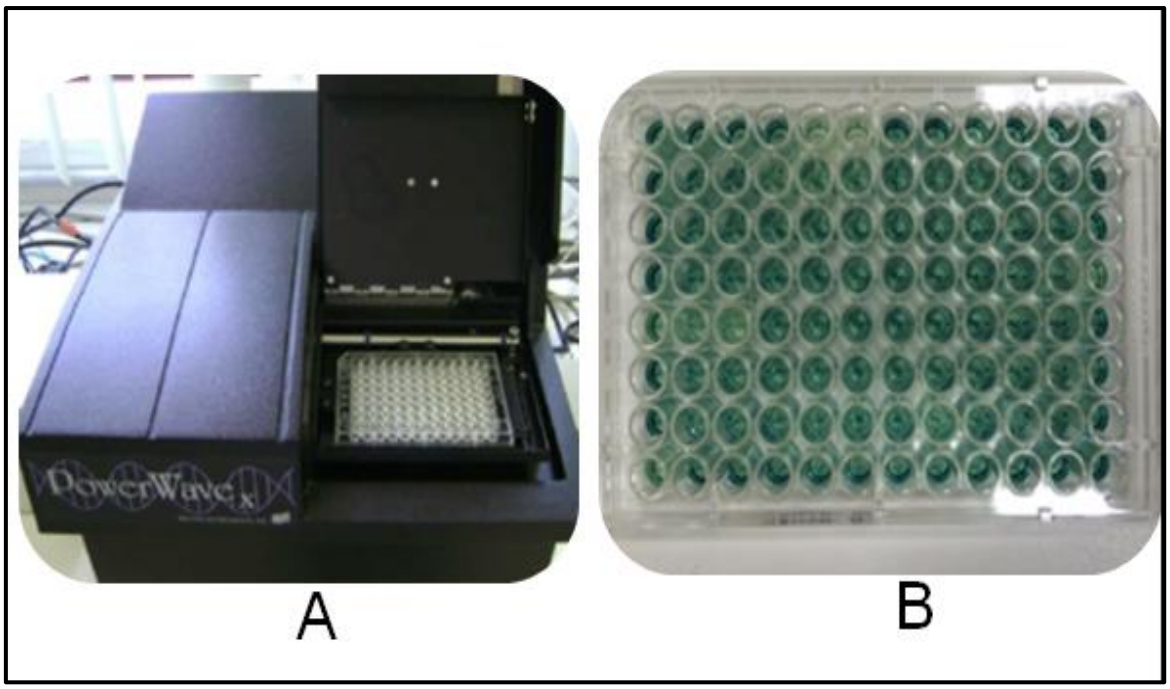

Figura 7- 7(A) leitor de ELISA 7(B) micro-placa de ELISA com reatividade positiva para Can f 1 a partir da amostra da poeira obtida dos cães aspirados. Fonte: o autor, 2013.

[18] Leitor de elisa POWER WAVE X
[19] Placas de microtitulação Immunolon II Dynatech, USA

3.10 AVALIAÇÃO DAS COLATERALIDADES DA SOLUÇÃO HIDRATANTE- HIGIENIZANTE NA PELE.

Para avaliação dos efeitos adversos relacionados ao uso da solução foi realizada observação da presença das seguintes manifestações clínicas dermatológicas (eritema, pápulas e erosões) abrangendo toda superfície corporal, esta avaliação foi realizada uma hora e sete dias após uso do produto.

3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados obtidos foram registrados em planilha eletrônica (Microsoft *Excel®),* conferidos e exportados para análise estatística com o *Software Statgraphics Centurion* XVII.

A estimativa da diferença entre médias em relação aos vários momentos de aspiração (T0, T1 e T2) em cada grupo de estudo foi realizada utilizando ANOVA e Bonferroni.

Para comparar a solução teste versus a água foi utilizado Teste t student.

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

4 RESULTADOS

As amostras do presente estudo foram coletadas de 80 cães provenientes de Curitiba-PR e região metropolitana, cujo os dados epidemiológicos estão expostos na (Tabela 1).

Tabela 1- Dados epidemiológicos dos 80 cães avaliados, relacionados ao gênero sexual, idade, raça, comprimento da pelagem, habitat, frequência de banhos e tipo de piso o qual estavam expostos.

Variáveis		**Percentual (%)**
GENERO SEXUAL	Macho	40 (50,0)
	Fêmea	40 (50,0)
IDADE	1-6	65 (62,5)
anos	7-14	25 (37,5)
RAÇAS	Beagle	1(1,25)
	Bulldog francês	1(1,25)
	Bulldog inglês	1(1,25)
	Dálmata	2(2,50)
	Daschund	1(1,25)
	Labrador	1(1,25)
	Lhasa apso	6(7,50)
	Pastor alemão	1(1,25)
	Pit bull	3(3,75)
	Yorkshire Terrier	1(1,25)
	Sem raça definida	62(77,5)
COMPRIMENTO DA PELAGEM	**Curta**	**62 (77,5)**
	Machos	34 (54,8)
	Fêmeas	28(45,1)
	Longa	**18(22,5)**
	Machos	6(33,3)
	Fêmeas	12(66,6)
HABITAT	Intradomiciliados	60(75,0)
	Semidomiciliados	20(25,0)

FREQUÊNCIA DE BANHOS	Semanal	48(60,0)
	Quinzenal	12(15,0)
	Mensal	08(10,0)
	Trimestral	12(15,0)
TIPOS DE PISO	Cerâmica	14(58,3)
	Carpete	02(8,3)
	Madeira	02(8,3)
	Laminado	06(25,0)

Fonte: O autor, 2014

O Can f 1 foi encontrado em 100% das amostras provenientes dos cães avaliados, com uma concentração média de 1,20 ± 0,06µg/g no grupo controle, e de 1,21± 0,06µg/g no grupo tratado.

Quando se comparou a concentração média de Can f 1 na pelagem dos cães, não se observou diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados (p > 0,05) (Figura 8).

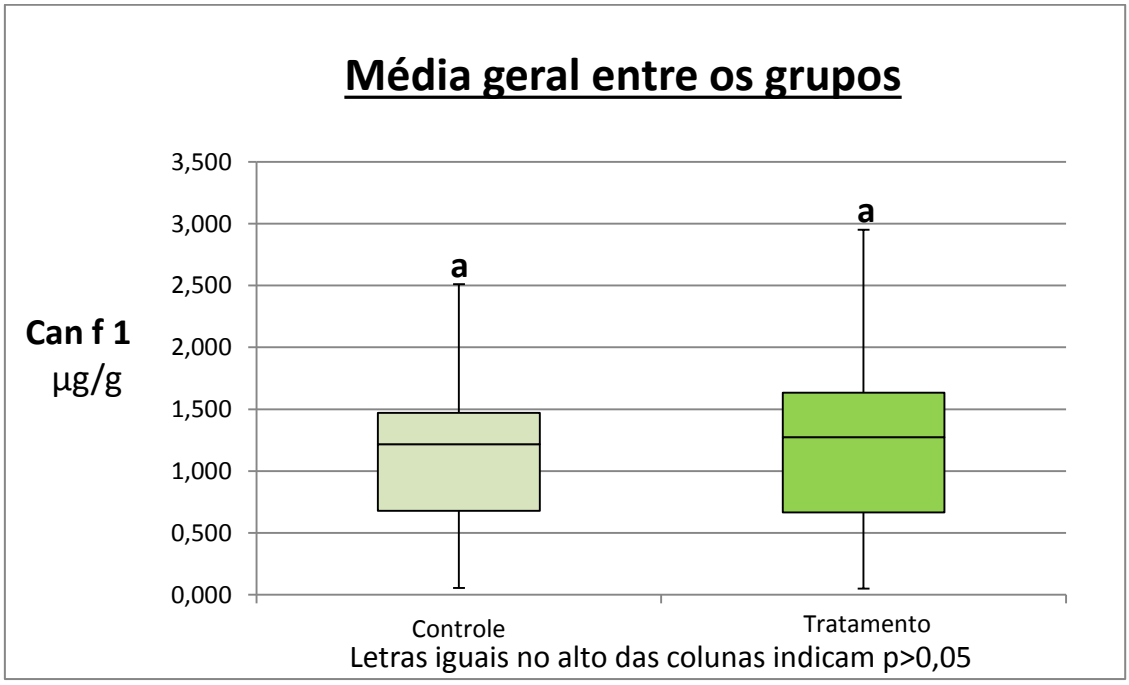

Figura 8- Concentrações geral de Can f 1 entre os dois grupos (tratado e controle), independente dos tempos de aspiração (T0,T1,T2), Fonte: O autor, 2014.

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada nos tempos 0, 1 e 2, na concentração média de Can f 1 na pelagem de cães (p > 0,05) (Figura 9).

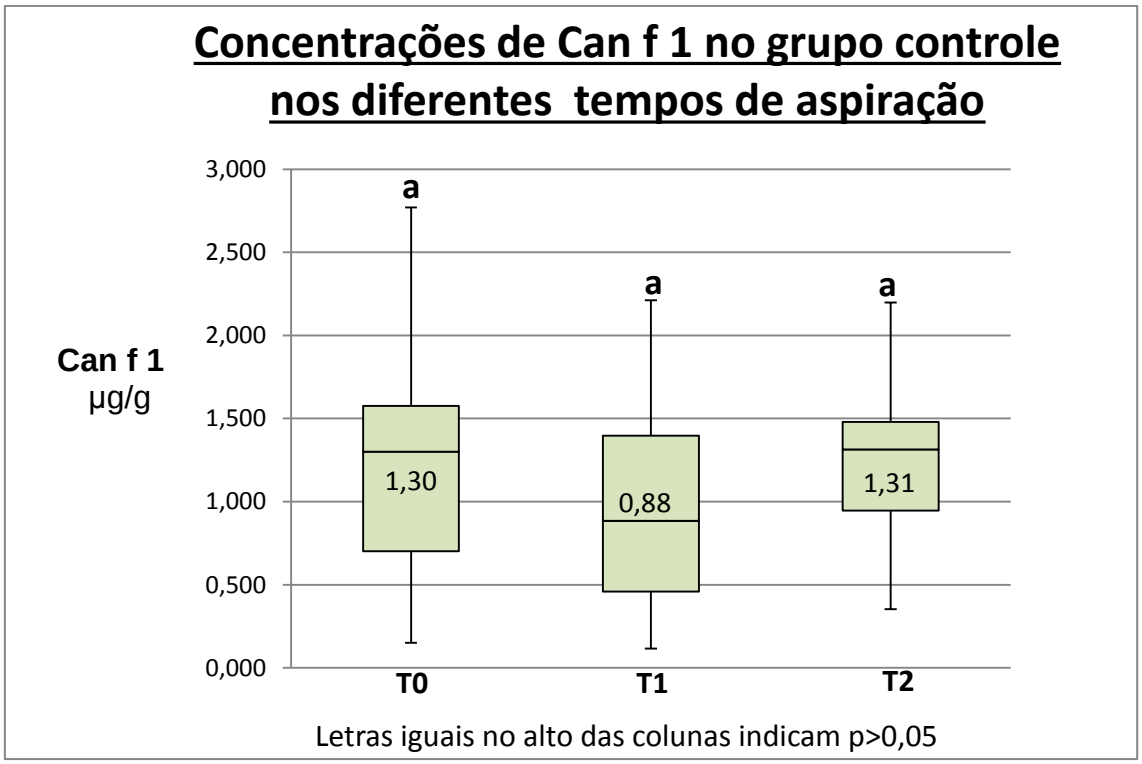

Figura 9- Concentrações Can f 1 no grupo controle nos diferentes tempos de aspiração (T0= primeira aspiração;T1 uma hora após uso produto;T2= sete dias após uso produto)Fonte: o autor 2014.

Em relação ao Grupo A, não houve variação estatisticamente significativa as concentrações médias de Can f 1 na pelagem dos cães, após o uso da solução higienizadora e hidratante, nos tempos 1 (uma hora após) e 2 (uma semana após), quando comparado ao tempo 0 (p > 0,05) (Figura 10).

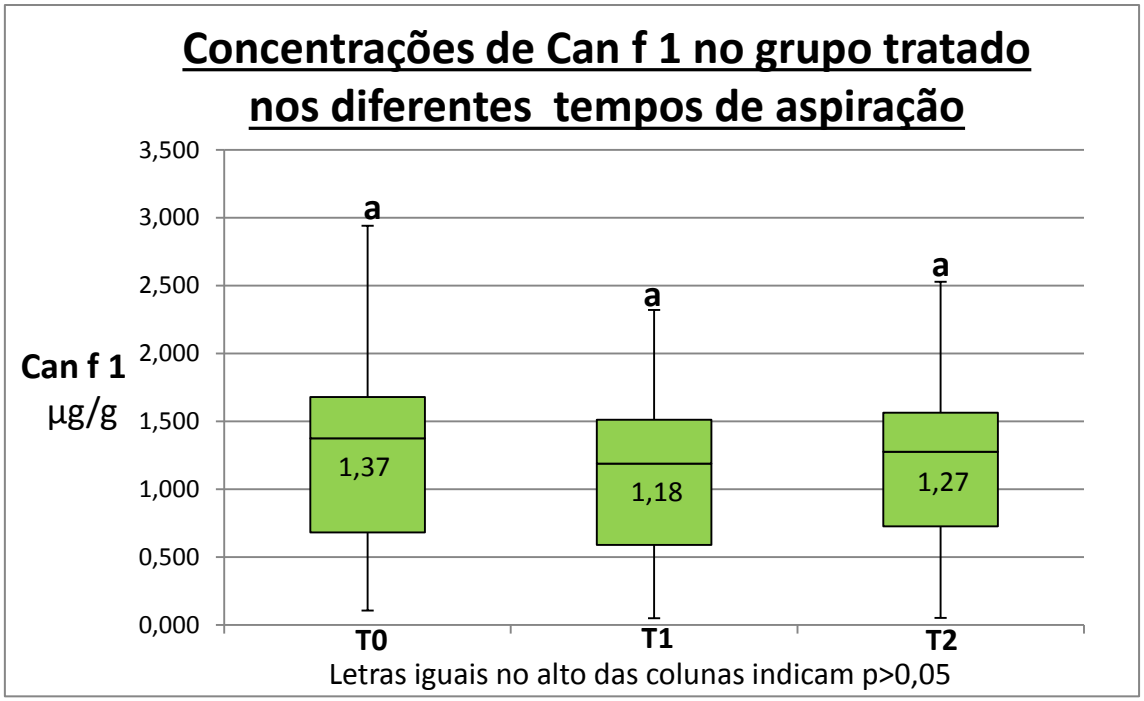

Figura 10- Concentrações de Can f 1 no grupo tratado nos diferentes tempos de aspiração (T0= primeira aspiração;T1 uma hora após uso produto;T2= sete dias após uso produto)Fonte: o autor 2014.

Quando comparado as concentrações médias de Can f 1 na pelagem dos cães do Grupo A, e do Grupo B, nos vários momentos, não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos nos tempos 0, 1 (uma hora após o tratamento) e 2 (uma semana após o tratamento) ($p > 0,05$) (Figura 11).

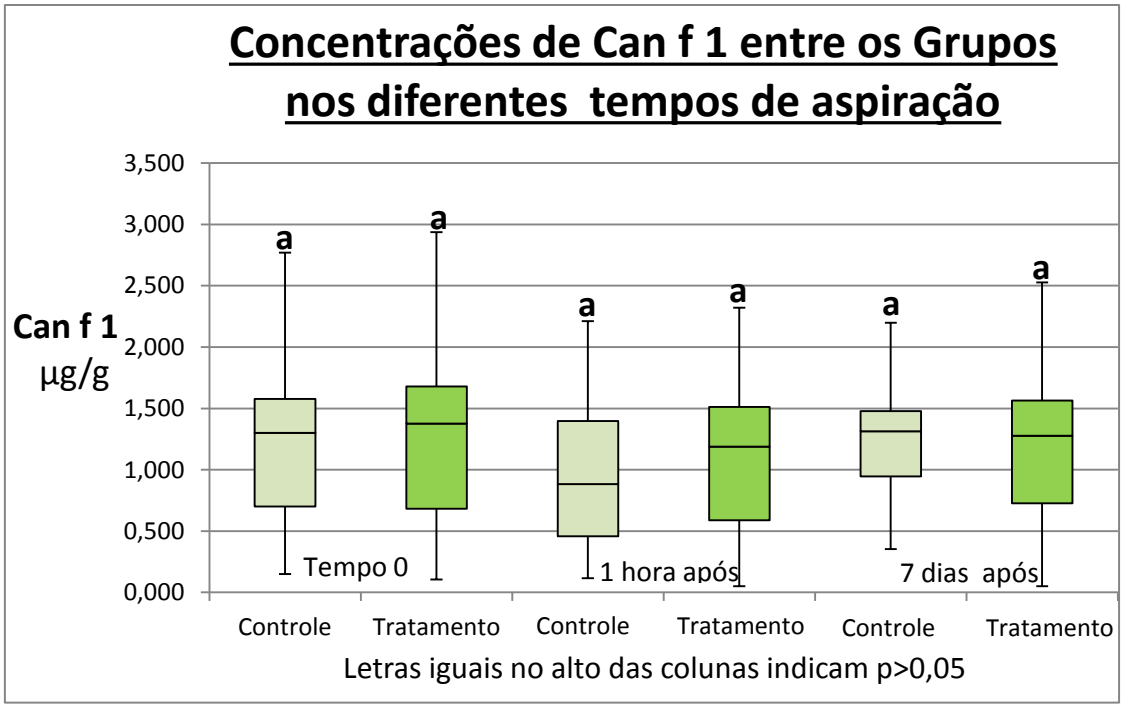

Figura 11- Concentrações de Can f 1 nos dois grupos (tratado e controle) nos diferentes tempos de aspiração (T0= primeira aspiração;T1 uma hora após uso produto;T2= sete dias após uso produto)Fonte: o autor 2014.

Em relação à reação de contato irritante relacionado após o uso da solução higienizante e hidratante a base de pantenol, alantoína, colágeno hidrolisado e aloe vera, não foi observado reação clínica dermatológica (eritema, pápulas e erosões) em nenhum dos cães avaliados no estudo.

5 DISCUSSÃO

O Can f 1 é um alérgeno de natureza lipoproteica e que tem como principal origem biológica as glândulas salivares (Polovic et al., 2013). Essa talvez seja a razão pelo qual este alérgeno é amplamente encontrado nos cães, independente da raça, gênero sexual e tamanho, como demonstrado no presente estudo, onde foi encontrado em 100% das amostras provenientes dos cães estudados.

A concentração média de Can f 1 na pelagem dos cães estudados foi de 1,21µg/g, concentração esta inferior ao encontrado por Farias e Rosário (2012), que ao avaliar a pelagem dos cães, verificaram Can f 1 em 96,9% das amostras, em uma concentração média de 3,3µg/g.

Esta diferença provavelmente ocorreu porque os cães desse estudo, em sua maioria, eram submetidos a rotina de banhos e escovação, já os cães avaliados por Farias e Rosário (2012), em sua maioria, eram animais mantidos em quintais, não higienizados, escovados e tosados regularmente, o que pode ter favorecido a retenção de queratina, debris celulares e material sebáceo em sua pelagem, elementos estes rico em Can f 1.

O uso da solução higienizante, hidratante e moduladora de alérgenos na pelagem dos cães não teve eficácia imediata em minimizar significativamente a concentração de Can f 1 nos animais avaliados.

Soluções moduladoras da concentração de alérgenos para realmente serem eficazes, devem ter efeitos desnaturantes proteicos (Portnoy et al., 2011). A solução testada possui colágeno, alantoína, pantenol e gel de *Aloe vera*.

O colágeno é uma molécula protéica restauradora (Yamamoto et al., 2006). A alantoína atua como antiinflamatório, hidratante e removedora de tecidos necrosados (Saito, 2005). O pantenol tem sido descrito como 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* estimula a epidermopoiese e tem efeitos emolientes na pele e pelagem (Patrocínio, 2010). Nenhum dos princípios ativos presentes na

solução têm função de desnaturação protéica, o que pode justificar ineficácia na minimização na concentração de Can f 1 na pelagem.

Segundo o fabricante da solução pode aumentar o peso molecular do alérgeno e diminuir seu tempo de suspensão no ar e, consequentemente, a probabilidade de sua inalação. Todavia, é preciso avaliar como esse aumento do peso molecular ocorre, e se isto é capaz de impedir sua inalação e o desenvolvimento de rinite, rinoconjuntivite e asma alérgicas, em indivíduos sensíveis a Can f 1.

O contato entre as pessoas e os cães está cada vez mais próximo e direto, e esta aproximação promove maior exposição ao alérgeno presente na pelagem do animal.

A solução moduladora de alérgeno também não demonstrou eficácia em diminuir a concentração de Can f 1 nos animais avaliados após uma semana do seu uso, o que demonstra que ela não tem poder residual. Isto pode ser explicado pelo fato dos princípios ativos presentes na formulação não terem efeito cumulativo ou efeito tardio.

Outro estudo avaliou o efeito de uma outra solução tópica minimizadora da concentração de alérgenos (Allerpet-C®) e relatou-se uma redução média de 62% de Fel d 1 em gatos, após o primeiro tratamento (Perzanowski et al., 1997). Porém o Allerpet-C® possui em sua fórmula o ácido cítrico, que tem o poder de atuar como um esfoliante da epiderme, removendo assim o acúmulo de debris celulares e material sebáceo na pele e pelagem, o que pode subsidiar sua eficácia.

Em relação a sua inocuidade, a solução estudada não apresentou efeito contato 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.

O uso de água simplesmente, também não foi capaz de reduzir as concentrações de Can f 1 na pelagem dos cães.

Resultados do estudo realizado por Hodson et al., (1999) mostraram que lavando os cães com água morna (40°C) e xampu, levou a uma redução na concentração Can f 1 na pelagem de cães, no entanto, a lavagem tinha que ser realizada no mínimo duas vezes por semana, já que o Can f 1 se acumula na pelagem em no máximo três dias.

Os saponientes, por terem efeito desengordurantes, podem ajudar na eliminação e desnaturação do alérgeno, porém se a frequência de banhos for alta, esse agente pode se tornar irritante para a pele.

Em adição, a realização de banhos em uma frequência alta, torna essa medida de controle um método desgastante para o cão e oneroso para o proprietário.

Avner et al. (1997) mostraram que a redução na concentração de alérgenos utilizando somente água quente é superior que banhos utilizando água morna e sabão. Com isso podemos pressupor que além da periodicidade, a temperatura da água é um fator importante a ser considerado nos banhos.

Como o Can f 1 é produzido principalmente nas glândulas salivares dos cães, e a saliva do cão tem grande potencial de impregná-lo na pelagem (Polovic et al., 2013), é provável que o desenvolvimento de produtos para higienização bucal seria uma forma inovadora de controle desse alérgeno.

6 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu concluir que:

A solução higienizante, hidratante e moduladora da concentração de alérgenos a base de colágeno, alantoína, pantenol e gel de *Aloe vera* não apresenta eficácia imediata (uma hora) ou residual (sete dias) na redução das concentrações de Can f 1 na pelagem de cães;

A solução a base de colágeno, alantoína, pantenol e gel de *Aloe vera* é inócua e não associada à contato irritante na pele de cães.

7.REFERÊNCIAS

Aberg N, Hasselmar B, Aberg B, Eriksson B. Increase of asthma, allergic rhinitis, and eczema in Swedish schoolchildren between1979-1991. Clin Exp Allergy 1995.

Angnes MR; Macagnan JBA; Cauduro JM ;Silveira L. Asma: uma revisão da literatura Rev. Saúde Pública. Santa Catarina., Florianópolis 2012; 81-94

Arbes S, Cohn RD, Muilenberg ML, Friedman W, Zeldin DC. Dog allergen (Can f 1) and cat allergen (Fel d 1) in US homes: Results from the National Survey of Lead and Allergens in Housing, J Allergy Clin Immunol 2004;114:111-7.

Arlian LG, Neal JS, Morgan MS, Rapp CM, Clobes AL. Distribution and removal of cat, dog and mite allergens on smooth surfaces in homes with and without pets. Ann Allergy Asthma Immunol 2001; 87:296-302.

Asher MI, Montefort S, Björkstén B, Lai CK, Strachan DP, Weiland SK, Worldwide time trends in the prevalence of symptoms of asthma, allergic rhinoconjunctivitis, and eczema in childhood: ISAAC Phases One and Three repeat multicountry cross-sectional surveys. Lancet. 2006; 733-43.

Avner DB, Perzanowski MS, Platts-Mills TAE,Woodfolk JA. Evaluation of different techniques for washing cats: quantitation of allergen removed from the cat and the effect on airborne Fel d 1. J Allergy Clin Immunol 1997;100: 307-12.

Bufford JD, Gern JE, Early Exposure to Pets: Good or Bad? Current Allergy and Asthma Reports 2007, 7:375-382.

Casale TB, Dykewicz MS. Clinical implications of the allergic rhinitis- asthma link. Am J Med Sci. 2004; 127-138.

Chapman, MD; Wood, R.A. The role and remediation of animal allergens in allergic diseases. J Allergy Clin Immunol 2001;107:414- 421.

Croner S, Kjellman N-IM. Natural history of bronchial asthma in childhood the prospective study from birth to 14 years of age. Allergy 1992.

Custovic A, Fletcher A, Pickering CA, Francis HC, Green R, Smith A, Chapman M, Woodcock A. Domestic allergens in public places III: house dust mite, cat, dog and cockroach allergens in British hospitals. Clinical Exp Allergy 1998;28:53-9.

Custovic A, Green R, Letchera F. Aerodynamic properties of the major dog allergen, Can f 1: Distribution in homes, concentration and particle size of allergen in the air. Am J Respir Crit Care Med 1997:155-94.

Dutra BMRS, Rosário NA, Zavadniak AF. Alérgenos inaláveis em Curitiba: uma revisão de sua relevância clínica. Revista brasileira alergia imunopatologia 2001;24:189-95.

Eder W, Klimecki W, Mutius E, Riedler J, Fahrländer C. Opposite effects of CD 14/-260 on serum IgE levels in children raised in different environments. J Allergy Clin Immunol 2005;116:601-7.

Eggleston, PA, Bush RK. Environmental allergen avoidance: an overview. Jornal Allergy Clinical Immunology 2001;107:403-5.

Epton MJ, Smith W, Hales BJ, Hazell L, Thompson PJ, Thomas WR. Antígeno não-alérgicos na sensibilização alérgica: respostas ao antígeno da cadeia pesada de ferritina ácaro por indivíduos alérgicos e não-alérgicos. Clin Exp Allergy 2002, 32 : 1341-7

Erwin EA, Custis N, Ronmark E, Wickens K, Sporik R, Woodfolk JA. Asthma and indoor air:contrasts in the dose response to cat and dustmite. Indoor Air 2005;10:33-9.

Esteves PC, Rosário Filho NA, Zavadniak AF. Prevalence of perennial and seasonal rhinitis in Curitiba, Brazil. Allergy & Clinical Immunology International 2000;2:138.

Farias M R. Avaliação da concentração de aeroalérgenos na pelagem de cães (canis familiaris) e na poeira a partir de domicílios de crianças com rinite e ou asma alérgicas [tese de Doutorado]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná – Setor de Ciências da Saúde; 2012.

Ford AW e Kemeny DM. Os alérgenos de cão. Identificação e purificação parcial de um dos principais alergénios caspa. Clinical Experimental Allergy 1992.

Fretzayas A, Kotzia D, Moustaki M. Controversial role of pets in the development of atopy in children World J Pediatr 2013;9(2):112-119.

Gern JE, Reardon CL, Hoffjan SH, Nicolae D, Zhanhai L, Roberg K, Neaville WA, Dakes KC, Adler K, Hamilton R, Anderson E, RN, MA, Gilbertson-White, S, Tisler C, DaSilva D, Anklam K, Mikus LD, Kamata Y, Miyanomae A, Nakayama E, Miyanomae T, Tajima T, Hoshi H: Characterization of dog allergens, Can f 1 and Can f 2. Preparation of their recombinant proteins and antibodies. Int Archive Allergy Immunology 2007.

Groot H, Goei KGH, Swieten PV, Aalberse RC: Affinity purification of a major and a minor allergen from dog extract: Serologic activity of affinity-purified Can f 1 and of Can f 1-depleted extract. J Allergy Clin Immunol 1991.

Hesselmar B, Aberg B, Eriksson B, Björkstén B, Aberg N. High-dose exposure to cat is associated with clinical tolerance: a modified Th2 immune response. Clinical and Experimental Allergy 2003;33:1681-5.

Hilger C, Swiontek K, Arumugam K, et al. Identification of a new major dog allergen highly cross-reactive with Fel d 4 in a population of cat- and dog-sensitized patients. J Allergy Clin Immunol. 2012.

Hodson T, Custovic A, simpson A, Chapman M, Woodcock A, Green R. Washing the dog reduces dog allergen levels, but the dog needs to be washed twice a week. J Allergy Clin Immunol 1999;103:581-5.

Hölscher B, Frye C, Wichmann HE, Heinrich J. Exposure to pets and allergies in children. Pediatric Allergy Immunology 2002.

Ingram JM, Sporik R, Rose G, Honsinger R, Chapman MD, Platts-Mills TAE. Quantitative assessment of exposure to dog (Can f 1) and cat (Fel d1) allergens: relationship to sensitization and asthma among children living in Los Alamos, New Mexico. Journal Allergy Clinical Immunology 1995.

Kamata Y, Miyanomae A, Nakayama E, Miyanomae T, Tajima T, Nishimura K, Tada T, Hoshi H. Caracterização dos alérgenos de cães Can f 1 e Can f 2. A comparação de Can f 1 com Can f 2 em relação à sua Propriedades bioquímicas e imunológicas. Archive Allergy Immunology 2007; 142 : 301-8.

Karlsson A S, Renström A, Hedrén M, Larsson K .Allergen avoidance does not alter airbone cat allergen levels in classrooms. Allergy, 2004;661-667.

Konieczny A, Morgenstern JP, Bizinkauskas CB, Lilley CH, Brauer AW, Bond JF, Aalberse RC, Wallner BP, Kasaian MT: The major dog allergens, Can f 1 and Can f 2, are salivary lipocalin proteins: cloning and immunological characterization of the recombinant forms. Immunology 1997; 92: 577–86.

Kuromoto LK, Neto AC, Ferreira OF, Prevalência de sintomas de asma, rinite e eczema atópico em escolares de 6 e 7 anos na cidade de Londrina (PR) J. bras. pneumol. vol.36 no.3 São Paulo 2010.

Leung R, Lai CK. The importance of domestic allergens in a tropical environment. Clinical Exp Allergy 1997;27:856-9.

Liccardi G, Salzillo A, Piccolo A; D'Amato G. Can the levels of Can f 1 in indoor environments be evaluated without considering passive transport of allergen indoors? J Allergy Clin Immunol, .2012.12-1579.

Liccardi G; Ccazzolam, Dd'amato Mm, d'Aamato G. Pets anda cockroaches: two increasing causes of respiratory allergy in indoor environments. Characteristics of airways sensitization and prevention strategies. Respiratory medicina (2000) 94, 1109-1118.

Mandhane PJ, Sears MR, Poulton R, Greene JM, Wendy Lou, Taylor DR, Hancox RJ. Cats and dogs and the risk of atopy in childhood and adulthood, J Allergy Clin Immunol 2009;124:745-50.

Mattsson L, Lundgren T, OlssonP, Sundberg M, Lidholm J,. Molecular and immunological characterization of Can f 4: a dog dander allergen cross-reactive with a 23 kDa odorant-binding protein in cow dander, Clin & Exp Allergy (40) 1276–1287; 2010.

Morris,DO. Human allergy to environmental pet danders: a public health perspective, Journal compilation Veterinary Dermatology 2010, 441–449.

Nafstad P, Magnus P, Gaarder PI, Jaakkola J. Exposure to pets and atopy-related diseases in the first 4 years of life. Allergy 2001.

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

Nicholas C, Wegienka G, Havstad S, Zoratti E, Ownby D, Johnson CC. Dog characteristics and allergen levels in the home. Ann Allergy Asthma Immunology 2010;105:228-233.

Parviainen S, Taivainen A, Liukko A, Nieminen A, Rytko¨nen-Nissinen M, Kinnunen T, Takkouche B, Barcala G, Etminan M, Fitzgerald M. Exposure to furry pets and the risk of asthma and allergic rhinitis: a meta-analysis. Allergy 2008;63:857-864.

Pastorino AC, Kuschnir FC, Arruda LK, Casagrande RR, Souza RG, Dias GA, Silveira HH, Cunha AJ, Jacob CM, Solé, D. Sensitisation to aeroallergens in Brazilian adolescents living at the periphery of large subtropical urban centres. Allergology Immunopathology 2008;36:9-16.

Pastorino AC, Rimazza RD, Leone C, Castro AP, Solé D, Jacob CM. Risk factors for asthma in adolescents in a large urban region of Brazil. Journal Asthma, 2006 ;695-700.

Paul W, Zhu J How are T(H)2-type immune responses initiated and Amplified; Nat Revista Immunology 10: 225–235 2010.

Perzanowski MS, Wheatley LM, Avner DB, Woodfolk JA, Platts-Mills . The effectiveness of Allerpet/c in reducing the cat allergen Fel d 1. J Allergy Clin Immunol 1997;100:428-30.

Pinto, L. A.; Stein, R. T.; Kabesch, M. O impacto da genética na asma infantil. Jornal Pediátrico, Rio Janeiro, v. 84, n. 4, p. S68-S75, 2008. Disponível em:<http://www.scielo.br/scielo.phpscript=sci_arttext&pid=S0021755720080005 00010>.Acesso em: 13 julho. 2014.

Platts-Mills TA. Indoor allergens. In: Middlenton's allergy, 7. ed., Mosby Elsevier: Philadelphia, p.539-554, 2009.

Polovic N, Wad K, Binnmyr C, Hamsten R, Gronneberg C, Palmberg N, Milcic-Matic N, Bergman T, Greonlund H, van Hage M. Dog saliva – an important source of dog allergens, Allergy 2013; 68: 585–592.

Portnoy J, Kennedy K, Sublett J. American Academy of Allergy Asthma & Immunology. Environmental Assessment and Remediation: a practice parameter [site na Internet]. Disponível em: http://www.aaaai.org/Aaaai/media/MediaLibrary/PDF%20Documents/Announce ments/Furry_Animals_13.pdf.

Reininger R, Varga EM, Zach M, Balic N, Lindemeier AD, Swoboda I. et al. Detection of an allergen in dog dander that cross- reacts with the mayor catallergen, Fel d 1. Clin Exp Allergy 2007;37(1):116-124.

Remes ST, Castro-Rodriguez JA, Holberg CJ, Martinez FD, Wright AL. Dog exposure in infancy decreases the subsequent risk of frequent wheeze but not of atopy. Journal Allergy Clinical Immunology 2001;108:509-515.

Rizzo JA, Cruz AA; Asma e rinite, uma mesma doença? Revista brasileira alergia imunopatologia, 2007.

Robert F, Lemanske Jr , Effects of dog ownership and genotype on immune development and atopy in infancy; Journal Allergy Clinical Immunology 2004;113:307-14.

Ronmark E, Lundback B, Jonsson E, Platts Mills TAE. Asthma, type 1 allergy and related conditions in 7 and 8 years-old children in Northern Sweden-prevalence rates and risk factor pattern.

Rosenstreich DL, Eggleston P, Kattan M, et al. The role of cockroach allergy and exposure to cockroach allergen in causing morbidity among inner-city children with asthma. N England Journal Med 1997;

Rosenthal LA, Ober C, Gangnon R, Mandhane PJ, Sears MR, Poulton R, Greene JM, Wendy WY, Taylor R, Hancox RJ. Cats and dogs the risk of atopy in childhood and adulthood, Journal Allergy Clinical Immunology 2009;124(4):745-750.

Saarelainen S, Taivainen A, Rytkonen-Nissinen M, Auriola S, Immonen A, Mantyjarvi R. Assessment of recombinant dog allergens Can f 1 and Can f2 for the diagnosis of dog allergy. Clinical Experimental Allergy 2004;34:1576-1582.

Samuel J. Arbes, Jr, Richard D. Cohn, Ming Yin, Michael L. Muilenberg, Warren Friedman,Darryl C. Zeldin. Dog allergen (Can f 1) and cat allergen (Fel d 1) in US homes: Results from the National Surveyof Lead and Allergens in Housing. j allergy clin immunol 2004;11-117

Sarinho EC, Mariano J, Sarinho SW, Medeiros D, Rizzo JA, Almerinda RS, SOLÉ D. Sensitisation to aeroallergens among asthmatic and nonasthmatic adolescents living in a poor region in the Northeast of Brazil. Allergology Immunopathol 2009;37:239-243.

Simpson A, Custovic A. Early pet exposure: friend or foe; Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology 2003;3:7-14.

Smedje G, Norback D. Irritants and allergens at school in relation to furnishings and cleaning. Indoor Air 2001;11:127-33.

Smith, W., Butler, A. J., Hazell, L. A., Chapman, M. D., Pomes, A., Nickels, D. G. & Thomas, W. R. (2004). Fel d 4, a cat lipocalin allergen. Clin. Exp. Allergy, 34, 1732–1738.

Solé D, Wandalsen GF, Camelo-Nunes IC, Naspitz CK; ISAAC Brazilian Group. Prevalence of symptoms of asthma, rhinitis, and atopic eczema among Brazilian children and adolescents identified by the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) - J Pediatr (Rio J). 2006;341-6.

Spitzauer S, Schweiger C, Anrather J, Ebner C, Scheiner O, Kraft D, Rumpold H. Caracterização dos alérgenos de cães por meio de immunoblotting. Int Arch Allergy Immunology 1993, 100: 60-7

Spitzauer S, Schweiger C, Sperr WR, Pandjaitan B, Valent P, Ebner C, Scheiner O, Kraft D, Rumpold H, Valenta R. Molecular characterization of dog albumin as a cross-reactive allergen, journal allergy clinical immunology Vol.93, 1994.

Trander, D. C. Indoor allergens in settled school dust: a review of findings and significant factors. Clinical Exp Allergy, 2005;126-136.

Virtanen T. Comparison of the allergic and nonallergic CD4 T-cell responses to the major dog allergen Can f 1, journal allergy clinical immunology 2010.

Vredegoor DW, Willemse T, Chapman MD, Heederik DJ, Krop EJ. Can f 1 levels in hair and homes of different dog breeds: lack of evidence to describe any dog breed as hypoallergenic. journal allergy clinical immunology 2012; 130:904-9.

Phipatanakul Wanda. Animal Allergens and Their Control, Current Allergy Reports 2001, 1:461–465.

Wehrmeister FC, Menezes AMB, Cascaes AM ;Mesa JM; Barros AJ; Tendência temporal de asma em crianças e adolescentes no Brasil no período de 1998 a 2008. Rev. Saúde Pública vol.46- São Paulo Apr. 2012.

Woodfolk JA, Luczynska CH, De Blay F, et al. Cat allergy. Ann Allergy 1992.

Zavadniak AF. Verificação da potência de extratos alergênicos e da exposição à alérgenos domiciliares: contribuição ao tratamento de doenças alérgicas. Curitiba. 96f. Dissertação (Mestrado em Pediatria) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2000.

Zheng T, Niu S, Lu B, Fan X, Sun F, Wang J, et al. Childhood asthma in Beijing, China: a population-based case-control study. Am Journal Epidemiology 2002;156:977-983.

ANEXO 1

PUCPR

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: **830B – 2ª versão**

TÍTULO DO PROJETO: Avaliação da concentração do principal alérgeno da pelagem de cães (*canis familiaris domestica*) antes e após o uso de uma solução tópica higienizante e desnaturante proteico.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Marconi Rodrigues de Farias

EQUIPE DE PESQUISA: Marconi Rodrigues Farias, Fabio Rodrigo Nogueira.

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

ESCOLA / CURSO:

Escola de Ciências Agrarias e Medicina Veterinária / Medicina Veterinária

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Canis familiaris	M/F	Superior a 1 ano	B/Mediato	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. Marta Luciane Fischer
Coordenadora
Comitê de Ética no Uso de Animais.

Profª Dra. Marta Luciane Fischer
Coordenadora Comite de Etica
no uso de animais

Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA
PUCPR

ANEXO 2

TERMO DE CONSENTIMENTO DO USO ANIMAL

Eu, **_____, brasileiro (a), _____anos, residente na rua _____, RG_____, e**stou permitindo a participação dos meus animais em um estudo denominado Avaliação da Concentração dos Alérgenos Maiores em cães (Canis Familiaris) Antes e Após Aplicação de Solução Tópica Higienizante e Desnaturante, cujo objetivos e justificativas são: Comparar se há eficácia na redução de alérgenos após o uso da solução tópica higienizante e desnaturante, pois se faz necessário realizar estudos para a avaliação de produtos utilizados sobre a pele do animal e que sua ação diminua a concentração de alérgenos para tornar a convivência harmoniosa entre cão e proprietário e minimizar a incidência de quadros alérgicos.

A participação dos meus animais no referido estudo será no sentido de serem aspiradas as pelagens para averiguar a concentração de alérgeno (componente de proteína presente nos pelos, que iniciam reação alérgica em pessoas sensíveis que entre em contato) antes e após o uso da solução (Free & Clear), o produto será aplicado com auxílio de uma toalha higienizada, não necessitando de banho e enxague, assim sendo, o animal não sofrerá qualquer procedimento que poderá infrigir dor ou lesão.

Estou ciente de que os meus animais serão atendidos, respeitados e receberão os cuidados necessários, como qualquer outro elemento submetido da mesma forma a procedimentos onde não estejam sendo utilizados para fins de pesquisa.

Também fui informado de que posso recusar a participação dos meus animais no estudo, ou retirar meu consentimento a qualquer momento, sem precisar justificar, e de, por desejar sair da pesquisa, não sofrerei qualquer prejuízo à assistência que meus animais estejam recebendo.

Os pesquisadores envolvidos com o referido projeto são Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias – PUCPR; Mestrando Maicon Roberto Paulo – PUCPR; e com eles poderei manter contato pelos telefones (41) 9983-8771; (47) 9190-0099, respectivamente.

È assegurada a assistência durante toda pesquisa, bem como me é garantido o livre acesso a todas as informações e esclarecimentos adicionais sobre o estudo e suas consequências, enfim, tudo o que eu queira saber antes, durante e depois da participação da pesquisa com os meus animais.

Enfim, tendo sido orientado quanto ao teor de todo o aqui mencionado e compreendido a natureza e o objetivo do já referido estudo, manifesto meu livre consentimento em permitir a participação do mesmo, estando totalmente ciente de que não há nenhum valor econômico, a receber ou a pagar, pela participação dos meus animais.

Curitiba, ____ de _____ de 2014.

Proprietário (a): _____

Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias - Orientador

Mestrando Maicon Roberto Paulo – Pesquisador-executor