

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**TESE**

**ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE CORPO  
TOTAL DE ÁCAROS DA POEIRA DOMICILIAR EM CÃES COM  
DERMATITE ATÓPICA E IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE  
ALÉRGENOS**

**Victor do Espirito Santo Cunha**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE CORPO  
TOTAL DE ÁCAROS DA POEIRA DOMICILIAR EM CÃES COM  
DERMATITE ATÓPICA E IDENTIFICAÇÃO SOROLÓGICA DE  
ALÉRGENOS**

**VICTOR DO ESPIRITO SANTO CUNHA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**João Luiz Horacio Faccini**

Tese submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de **Doutor em  
Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias, Área de Concentração  
em Sanidade Animal.

Seropédica, RJ  
Setembro de 2010

636.0896

C972e

T

Cunha, Victor do Espirito Santo,  
1971-

Estudo da atividade biológica de  
extratos de corpo total de ácaros da  
poeira domiciliar em cães com  
dermatite atópica e identificação  
sorológica de alérgenos / Victor do  
Espirito Santo Cunha - 2010.  
49 f.: il.

Orientador: João Luiz Horacio  
Faccini.

Tese (Doutorado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias.

Bibliografia: f. 36-45.

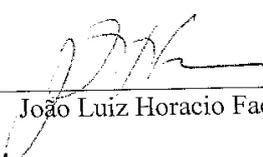
1. Cão - Doenças - Teses. 2.  
Dermatologia veterinária - Teses. 3.  
Pele - Doenças - Teses. 4. Ácaro -  
Teses. I. Faccini, João Luiz  
Horacio, 1947-. II. Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Curso de Pós-Graduação em Ciências  
Veterinárias. III. Título.

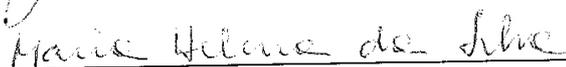
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

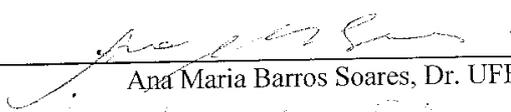
VICTOR DO ESPIRITO SANTO CUNHA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor** em Ciências, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Sanidade Animal.

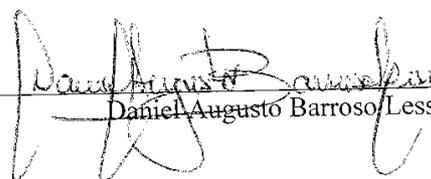
TESE APROVADA EM 21/10/2010

  
\_\_\_\_\_  
João Luiz Horacio Faccini, Ph.D. UFRRJ

  
\_\_\_\_\_  
Maria Helena da Silva, Dr. UFRJ

  
\_\_\_\_\_  
Ana Maria Barros Soares, Dr. UFF

  
\_\_\_\_\_  
Lúcia Helena Pinto da Silva, Dr. UFRRJ

  
\_\_\_\_\_  
Daniel Augusto Barroso Lessa, Dr. UFF

À quem sempre primou pela nossa educação  
À quem não poupava esforços pelos seus  
À quem recorria para comprar livros,  
para participar dos congressos  
Dedico à ti, minha avó querida  
Onde quer que esteja  
Com amor

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Regina Maria, pelo exemplo de caráter, equilíbrio, sabedoria e amor. Por sempre me apoiar e incentivar na busca do conhecimento e crescimento profissional.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, por possibilitar-me a realização do curso.

Ao Professor João Luiz Horacio Faccini, pela confiança depositada desde o primeiro encontro, em 2002, no prédio antigo da Parasitologia Veterinária.

À professora Maria Helena da Silva, pela oportunidade de aprender no laboratório de imunoquímica. Sempre atenta e disposta a ensinar, desde o quadro negro até às leituras dos scanners e espectrofotômetros. Pela convivência agradável, pelos ensinamentos de vida, pela amizade.

Ao Mestre Ruppert Ludwig Hahnstadt, por transmitir seus inestimáveis conhecimentos sobre o tema abordado, com a empolgação de sempre, de quem ama o que faz.

À Professora e amiga Ana Maria Barros Soares, pelo incentivo inicial visando a pós-graduação, assim como pela atenção dispensada durante todos esses anos.

À FDA-ALLERGENIC, pelo material fornecido e acessoria técnica dispensada em todos os momentos necessários.

À Dra. Lysianne Pinto, pela ajuda prestada no laboratório, pela paciência e atenção oferecida nos inúmeros momentos de dúvidas.

À professora Regina Ejzemberg, pela ajuda nas correções, pelos momentos deliciosos do café e pela cordialidade.

Ao professor Walter Oelemann, por disponibilizar os equipamentos que dispunha.

À todos que contribuíram, de forma direta ou indireta, para a execução deste trabalho.

## RESUMO

CUNHA, Victor do Espirito Santo. **Estudo da atividade biológica de extratos de corpo total de ácaros da poeira domiciliar em cães com dermatite atópica e identificação sorológica de alérgenos.** 2010. 49p Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Extratos de corpo total e proteínas de ácaros são utilizados para diagnóstico de doenças alérgicas em seres humanos e animais. O objetivo do presente trabalho foi determinar a atividade biológica de extratos alergênicos comerciais de *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis* em cães com dermatite atópica e identificar sorologicamente alérgenos presentes nesses extratos. Para tanto, 26 cães foram testados intradermicamente com extratos comerciais de ácaros (ALK-ABELLÓ ou FDA Allergenic) e as reações cutâneas avaliadas após 15 minutos. Proteínas alergênicas presentes nos extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis* foram identificadas por “immunoblotting” utilizando-se soros dos animais alérgicos e conjugado anti-IgE canina. Os resultados obtidos mostraram que, para provocar uma pápula com 14 mm de diâmetro nos animais sensíveis, são necessários 0,95 BU/mL e 1,68 BU/mL de extratos comerciais de *D. farinae* e *B. tropicalis* (ALK-ABELLÓ), respectivamente. A análise por “immunoblotting” dos antígenos presentes no extrato de *D. farinae* (FDA Allergenic), utilizando soros de dez animais alérgicos, mostrou que 80% dos soros reconhecem uma banda com peso molecular de aproximadamente 102 kDa; 80% duas bandas entre 52 e 76 kDa; 70% duas bandas acima de 225 kDa; 50% uma banda com aproximadamente 76 kDa; 50% uma banda com aproximadamente 225 kDa; 40% uma banda entre 31 e 38 kDa; e 20% uma banda entre 12 e 17 kDa. A análise por “immunoblotting” dos antígenos do extrato de *B. tropicalis* (FDA Allergenic) mostrou que 50% dos soros reconhecem duas bandas com pesos moleculares entre 52 e 76 kDa. Esses resultados demonstram a importância dessas duas espécies de ácaros da poeira domiciliar na patogênese da dermatite atópica canina no Brasil, assim como indicam alérgenos que devem estar presentes nos extratos alergênicos utilizados para diagnóstico e imunoterapia alérgeno-específica.

**Palavras-chave:** cães, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*

## ABSTRACT

CUNHA, Victor do Espirito Santo. **Study of the biological activity of house dust mite whole-body extracts in dogs with atopic dermatitis and serological identification of allergens.** 2010. 49p Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

Whole-body extracts and proteins of mites are used for the diagnosis of allergic diseases in humans and animals. The objective of the present study was to evaluate the biological activity of commercial *Dermatophagoides farinae* and *Blomia tropicalis* allergenic extracts in dogs with atopic dermatitis and to identify the allergens present in these extracts by serological assays. For this purpose, 26 dogs were submitted to skin tests using commercial mite extracts (ALK-Abelló or FDA Allergenic) and skin reactions were evaluated after 15 min. Allergenic proteins present in the *D. farinae* and *B. tropicalis* extracts were identified by immunoblotting using sera from allergic animals and anti-dog IgE conjugate. The results showed that 0.95 and 1.68 BU/mL of the commercial *D. farinae* and *B. tropicalis* extracts (ALK-Abelló), respectively, are necessary to provoke a papule measuring 14 mm in diameter in susceptible animals. Immunoblotting analysis of antigens present in the *D. farinae* extract (FDA Allergenic) using sera from 10 allergic animals showed that 80% of the sera recognized a band of approximately 102 kDa, 80% two bands of 52 to 76 kDa, 70% two bands larger than 225 kDa, 50% one band of approximately 76 kDa, 50% one band of approximately 225 kDa, 40% one band of 31 to 38 kDa, and 20% one band of 12 to 17 kDa. Immunoblotting of antigens of the *B. tropicalis* extract (FDA Allergenic) showed that 50% of the sera recognized two bands of 52 to 76 kDa. These results demonstrate the importance of the two house dust mite species for the pathogenesis of canine atopic dermatitis in Brazil. In addition, the results indicate allergens that should be present in allergenic extracts used for diagnosis and allergen-specific immunotherapy.

**Keywords:** dogs, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis*

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b>   | 1  |
| <b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>  | 3  |
| 2.1. Dermatite Atópica Canina  | 3  |
| 2.2. Alérgenos de ácaros da poeira domiciliar  | 10 |
| 2.3. Padronização de extratos alergênicos  | 14 |
| <b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>   | 17 |
| 3.1. Cães  | 17 |
| 3.2. Extratos alergênicos e soluções controles para os testes <i>in vivo</i> (testes intradérmicos)  | 17 |
| 3.3. Testes intradérmicos  | 17 |
| 3.4. Determinação da atividade biológica dos extratos alergênicos em HEID (“Histamine Equivalent Intradermal Testing”)   | 18 |
| 3.5. Determinação da atividade biológica dos extratos alergênicos em CBU (“Canine Biologic Units”)   | 18 |
| 3.6. Análise estatística   | 18 |
| 3.7. Soros caninos   | 18 |
| 3.8. Extratos alergênicos para os ensaios <i>in vitro</i>  | 19 |
| 3.9. Ensaio imunoenzimático  | 19 |
| 3.9.1. ELISA Indireto  | 19 |
| 3.9.2. “Immunoblotting”  | 20 |
| <b>4. RESULTADOS</b>   | 21 |
| 4.1. Testes intradérmicos com extratos alergênicos de ácaros em cães   | 21 |
| 4.2. Estatística descritiva dos diâmetros das reações obtidas com cada uma das concentrações de extrato alergênico de <i>D. farinae</i> e <i>B. tropicalis</i> e com a Histamina a 0,01% | 21 |
| 4.3. Bioensaio dose-resposta: reta de regressão  | 23 |
| 4.4. Cálculo das concentrações de extratos de <i>D. farinae</i> e <i>B. tropicalis</i> capazes de provocar uma reação com o mesmo diâmetro da reação provocada pela Histamina a 0,01%    | 23 |
| 4.5. Cálculo das concentrações dos extratos de <i>D. farinae</i> e <i>B. tropicalis</i> capazes de provocar uma reação de 14 mm  | 24 |
| 4.6. SDS-PAGE dos extratos de <i>D. farinae</i> e <i>B. tropicalis</i>   | 24 |
| 4.7. ELISA Indireto  | 25 |
| 4.7.1. Extrato de <i>D. farinae</i>  | 25 |
| 4.7.2. Extrato de <i>B. tropicalis</i>   | 25 |
| 4.8. “Immunoblotting”  | 27 |
| 4.8.1. Extrato de <i>D. farinae</i>  | 27 |
| 4.8.2. Extrato de <i>B. tropicalis</i>   | 28 |
| <b>5. DISCUSSÃO</b>  | 30 |

|   |    |
|---|----|
| <b>6. CONCLUSÕES</b>  | 35 |
| <b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>                                      | 36 |
| <b>ANEXOS</b>   | 46 |
| 1 - Exemplo de autorização para realização de teste intradérmico          | 47 |
| 2 - Exemplo de autorização para coleta de sangue                          | 48 |
| 3 – Exemplo de ficha para registro de resultados dos testes intradérmicos | 49 |

## 1. INTRODUÇÃO

Dermatite Atópica Canina (DAC) é dermatopatia alérgica crônica caracterizada por prurido e inflamação. Acredita-se que exista predisposição genética, com alterações clínicas associadas à produção de imunoglobulinas da classe IgE em resposta a alérgenos ambientais (SCOTT et al., 2001). Sua prevalência na população canina foi estimada em 10% (SCOTT et al., 2001), podendo chegar a 30% dos casos atendidos em clínicas particulares especializadas em dermatologia (NESBITT, 1983).

Os principais alérgenos ambientais incriminados na patogênese da Dermatite Atópica canina são: antígenos de ácaros da poeira domiciliar e de produtos armazenados; grãos de pólen de gramíneas, árvores e arbustos; esporos de fungos; antígenos epidermais; e antígenos de insetos (HILL & DEBOER, 2001).

Ácaros da poeira domiciliar, em particular *Dermatophagoides farinae* e *D. pteronyssinus* (família Pyroglyphidae), são considerados as principais fontes de alérgenos responsáveis pelas hipersensibilidades imediatas em cães, afetando de 30 a 100% dos cães com Dermatite Atópica (RANDALL et al., 2003).

Ácaros da família Glycyphagidae, em especial *Blomia tropicalis*, são encontrados frequentemente nos domicílios de regiões tropicais e subtropicais, sendo em muitos casos a espécie dominante da poeira domiciliar (ROSA & FLECHTMANN, 1979). Alérgenos de *B. tropicalis* são de grande importância para as doenças atópicas em seres humanos, no entanto, sua importância para a DAC é desconhecida.

O diagnóstico da DAC é baseado no histórico, na apresentação clínica e, posteriormente, complementado através dos testes intradérmicos (*in vivo*) ou testes sorológicos (*in vitro*), tais como o ensaio imunoenzimático ligado a enzimas (ELISA) e o teste de radioalergoadsorção (RAST). Os testes intradérmicos avaliam se o paciente é sensível ou não ao antígeno testado, enquanto os sorológicos avaliam os títulos de IgE alérgeno-específica. O objetivo desses testes é identificar alérgenos relacionados à doença possibilitando, desta forma, que medidas de controle sejam aplicadas para minimizar a exposição a estes alérgenos, assim como a seleção de antígenos para a imunoterapia alérgeno-específica.

Os testes intradérmicos possuem acurácia superior aos testes sorológicos (SCOTT et al., 2001). Porém, os extratos alergênicos utilizados em Medicina Veterinária para a realização dos testes cutâneos são controlados por métodos inapropriados de quantificação de alérgenos e estão disponíveis comercialmente em concentrações de peso por volume (w/v) ou unidades de nitrogênio proteico por mililitro (PNU/ml). Tais medidas de concentração não nos permitem conhecer a atividade biológica (ou potência) de um extrato, que pode variar de 10 a 1000 vezes entre extratos com a mesma concentração (SCOTT et al., 2001). Extratos alergênicos são misturas complexas de componentes antigênicos e o conteúdo proteico não está necessariamente relacionado ao conteúdo alergênico (IPSEN et al., 1998). Portanto, reações falso-positivas e falso-negativas podem ser observadas quando a potência de um extrato estiver muito alta ou muito baixa, respectivamente.

Todo clínico que trabalha com extratos alergênicos deve conhecer a composição e a bioatividade do material que está usando, para que possa fazer diagnósticos precisos e

procedimentos de imunoterapia alérgeno-específica seguros e eficazes (ASS et al., 1978). Para isso, é essencial a padronização dos extratos alergênicos. Os processos de padronização de extratos alergênicos têm três objetivos principais: a identificação de proteínas com atividade alergênica (ou alérgenos) presentes nos extratos; a quantificação dos alérgenos principais, que devem estar presentes em quantidades constantes nos extratos; e a quantificação da atividade biológica total do extrato (HILLIER & DEBOER, 2001). O conhecimento da quantidade de qualquer princípio ativo utilizado em medicina é um requisito de máxima importância. O benefício de um tratamento e a reprodutibilidade de um teste dependem, de forma direta, deste conhecimento.

Através de ensaios imunológicos realizados com soros de cães com Dermatite Atópica, alguns alérgenos de *D. farinae* e *D. pteronyssinus* já foram identificados (NOLI et al., 1996; McCALL et al., 2001; WEBER et al., 2003). Ainda não há relatos de estudos desta natureza no Brasil e, como o padrão de reconhecimento de antígenos pode variar entre populações devido às diferenças genéticas e ambientais, a identificação do padrão de reconhecimento de antígenos dos cães brasileiros assume grande importância.

Tendo em vista que ainda não existem extratos alergênicos padronizados em medicina veterinária e que alérgenos principais já descritos para seres humanos podem diferir dos alérgenos principais para cães (McCALL et al., 2001), o presente trabalho tem como objetivo:

1. Avaliar a atividade biológica, através de testes intradérmicos em cães, de extratos alergênicos de *D. farinae* e *B. tropicalis* utilizados para diagnóstico de doenças atópicas em seres humanos.
2. Identificar alérgenos importantes para cães, através de testes imunoquímicos, em extratos alergênicos comerciais de *D. farinae* e *B. tropicalis*.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. Dermatite Atópica Canina

A Dermatite Atópica Canina (DAC) é uma doença cutânea caracterizada por tendência hereditária à produção de imunoglobulinas da classe E em resposta a alérgenos ambientais (SCOTT et al., 2001). O primeiro caso descrito de doença atópica em cães tratava-se de um cão com sintomas sazonais de rinite alérgica (WITTICH, 1941). A segunda publicação de doença alérgica em cães foi descrita por PATTERSON (1960), e tratava-se de um cão com conjuntivite alérgica, aumento da produção de lágrimas e prurido. Porém, foi somente em 1971 que os sinais clínicos da DAC foram descritos (HALLIWELL & SCHWARTZMAN, 1971).

Acreditou-se durante muitas décadas que a via de penetração de antígenos fosse a respiratória. O antígeno seria inalado, penetraria no trato respiratório e através da circulação chegaria à pele, com subsequente desgranulação dos mastócitos. Porém, esta hipótese nunca foi comprovada experimentalmente e é atualmente considerada como dogma em medicina veterinária. Acredita-se, atualmente, que a via de penetração de antígenos para a DAC seja a epidermal e, portanto, o termo “dermatite alérgica a inalantes”, utilizado durante muitos anos, não deve mais ser utilizado (OLIVRY & HILL, 2001).

A incidência de doença atópica em seres humanos (asma, rinite alérgica e dermatite atópica) tem aumentado de forma significativa nas últimas décadas, especialmente em países desenvolvidos. Embora já se conheça predisposição genética para a doença, é pouco provável que este rápido aumento da incidência ocorra devido a processos de seleção genética. Acredita-se que fatores ambientais, tais como a crescente urbanização, com aumento da concentração de antígenos dentro dos domicílios, sejam os responsáveis por este aumento da incidência em seres humanos. Cães em centros urbanos são expostos aos mesmos antígenos ambientais que o homem e, portanto, parece provável que aumento similar da incidência da doença em cães também esteja ocorrendo (HILLIER & GRIFFIN, 2001).

Existem diversas publicações sobre a prevalência da DAC, porém nenhum desses estudos utilizou dados epidemiológicos representativos para que se pudesse inferir a verdadeira prevalência e incidência de dermatite atópica na população geral de cães (HILLIER & GRIFFIN, 2001). SCOTT et al. (2001) estimaram a prevalência da doença em 10% na população geral de cães e LUND et al. (1999) estimaram em 8,7% a prevalência de dermatite alérgica/atópica, alergia ou atopia, após análise de 31.484 cães atendidos com problemas de pele ou de ouvido em 52 clínicas privadas norte-americanas.

Atopia é um distúrbio orgânico de hipersensibilidade a diversos fatores ambientais e, na maioria das vezes, está associada à hiperprodução de imunoglobulina E. Dermatite atópica canina é a doença clínica observada em cães atópicos, resultante da produção de mediadores inflamatórios após reconhecimento e processamento de antígenos ambientais pelo sistema imunológico (ZUR et al., 2002).

O padrão de herança genética da dermatite atópica e da produção de altos títulos de IgE tem sido o foco de muitos estudos. Trabalhos iniciais sugeriram um padrão de herança multifatorial para a dermatite atópica em seres humanos. Entretanto, trabalhos subsequentes sobre asma, utilizando reatividade de IgE como um indicador fenotípico, indicaram que o modo de herança das doenças atópicas em seres humanos era autossômico dominante

(PALLER, 1993). Na DAC acredita-se que exista um componente genético devido a maior observação da doença em determinadas raças. As raças consideradas predispostas são: West Highland White Terrier, Labrador Retriever, Boxer, dentre outras. Porém, a maioria desses estudos não associou a prevalência da doença à frequência dessas raças na população geral de cães (SOUZA & MARSELLA, 2001). Um estudo recente (JAEGER, K. et al., 2010), que comparou as prevalências raciais com a população canina da região estudada, verificou que as predisposições raciais para a DAC podem variar enormemente entre continentes e também entre diferentes localizações no mesmo continente.

A apresentação clínica primária da DAC é caracterizada pela presença de prurido com lesões cutâneas secundárias resultantes do autotraumatismo. A maioria dos cães manifesta prurido ao esfregar a face e ao lamber ou mascar as patas. As lesões ocorrem mais comumente no abdômen ventral e região axilar e inguinal. Lesões descritas na literatura incluem escoriações, alopecia variável devido ao autotraumatismo, máculas eritematosas, pápulas, pústulas, hiperpigmentação e liquenificação (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001). A intensidade das lesões cutâneas pode variar de leve a grave e infecções cutâneas secundárias por bactérias e leveduras são comuns. Otite externa é observada em aproximadamente 55% dos cães diagnosticados com dermatite atópica (ZUR et al., 2002).

Em seres humanos, a dermatite atópica é caracterizada por pele seca e aumentada perda de água transepidermal. Acredita-se que um defeito de extrusão em organelas contendo lipídios, os corpos lamelares, resulte em mudanças na composição química da barreira lipídica epidermal e em aumento da perda de água transepidermal (LEUNG et al., 2004). No momento, não se sabe se um defeito na barreira lipídica também ocorre em cães atópicos. Estudos em medicina veterinária apresentam resultados controversos. Em um estudo, os valores de absorção e perda de água na pele de cães com dermatite atópica não foram diferentes daqueles valores de cães normais (CHESNEY, 1995). Em outro estudo, a pele de cães atópicos e normais foi avaliada através de microscopia eletrônica de transmissão para determinar diferenças estruturais nos lipídeos do extrato córneo. A deposição de lipídeos lamelares no extrato córneo de cães atópicos apresentou-se muito heterogênea se comparado a observada na pele de cães normais. A continuidade e espessura dos corpos lamelares lipídicos intercelulares foi significativamente menor na pele não lesionada de cães atópicos do que na pele de cães normais, sugerindo que a barreira lipídica epidermal possa estar alterada na pele de cães atópicos (INMAN et al., 2001).

A patofisiologia da dermatite atópica em seres humanos é o produto de interação complexa entre vários genes susceptíveis, fatores ambientais, agentes infecciosos, defeitos de função da barreira cutânea, e respostas imunológicas. Ativação de linfócitos T, células dendríticas, macrófagos, queratinócitos, mastócitos e eosinófilos são característicos da resposta inflamatória cutânea (AKDIS et al., 2006). Em cães, a dermatite atópica é também considerada síndrome complexa e sua etiopatogênese ainda é mal compreendida (BENSIGNOR & CARLOTTI, 2002). Diversas células inflamatórias participam da resposta imune embora, no passado, os mastócitos fossem considerados como as mais importantes. Atualmente, acredita-se que uma interação complexa ocorra entre uma ampla variedade de células, sendo consideradas as mais importantes as células de Langerhans, linfócitos-B, linfócitos-T auxiliares alérgeno-específicos, e mastócitos (HILL & OLIVRY, 2001).

Células apresentadoras de antígenos com morfologia dendrítica são também encontradas na derme (YAGER, 1992). Assim como as células de Langerhans, estas células estão envolvidas no processamento e apresentação de antígenos para os linfócitos. Essas células são encontradas em biópsias cutâneas de cães com dermatite atópica e de seres humanos (DAY, 1996; OLIVRY et al., 1997).

Os linfócitos-T são classificados em duas categorias de acordo com seus marcadores de superfície. As células CD4<sup>+</sup> são equipadas para responder a antígenos exógenos

apresentados pelas células apresentadoras de antígenos profissionais e, portanto, são essenciais na patogênese das doenças atópicas. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> são designados como linfócitos citotóxicos, embora ainda exista alguma controvérsia sobre suas funções supressoras (HILL & OLIVRY, 2001). Recentemente, em seres humanos, células T regulatórias (T<sub>reg</sub>) foram descritas como um subtipo de células T, com função imunossupressora e perfil de citocinas distinto de outras células T<sub>H1</sub> e T<sub>H2</sub>. Células T<sub>reg</sub> são capazes de inibir o desenvolvimento de ambas respostas T<sub>H1</sub> e T<sub>H2</sub> (AKDIS et al., 2006).

Uma investigação preliminar sobre produção de citocinas pelas células T na DAC, revelou que em biópsias cutâneas de cães normais ocorre predomínio de IL-2 e IL-12 e, em biópsias cutâneas de cães atópicos, predomínio de IL-4 e IL-5 (OLIVRY et al., 1999). Embora os resultados deste estudo indiquem que possa haver uma resposta predominantemente do tipo T<sub>H2</sub> em cães atópicos, o número de casos estudados foi pequeno e mais estudos são necessários para investigar essa importante área da imunologia canina (HILL & OLIVRY, 2001).

O papel dos mastócitos nas reações de hipersensibilidade está relacionado à síntese e liberação de mediadores inflamatórios no espaço intercelular. Estes mediadores ficam estocados em grânulos em seu interior e incluem histamina, triptases, quimases, leucotrienos e o TNF- $\alpha$  (HILL & OLIVRY, 2001). Quando ocorre a ligação entre o alérgeno e duas moléculas de IgE alérgeno-específicas adjacentes, acopladas na superfície do mastócito, este desgranula (BAKER, 1990). Os mediadores liberados são responsáveis por uma complexa interação entre a microcirculação e outras células inflamatórias, propiciando o aparecimento dos sinais clínicos da dermatite atópica. AUXILIA & HILL (2000) demonstraram que as áreas com maior concentração de mastócitos nos cães são as pinas e espaços interdigitais e levantaram a hipótese de que estes achados possam estar relacionados com a ocorrência frequente de pododermatites e otites externas na DAC.

Diversas linhas de investigação indicam que os eosinófilos são recrutados para o sítio de inflamação, e ativados neste ponto, por citocinas liberadas por linfócitos T<sub>H2</sub>, tais como IL-5 e IL-13 (SIMON et al., 2004). Os eosinófilos possuem receptores de superfície celular para essas substâncias, mas também podem expressar receptores Fc para IgG e receptores de baixa afinidade para IgE. Uma vez no ponto de inflamação mostram atividade fagocítica e secretória. Eles são capazes de fagocitar bactérias, complexos imunes e fungos, embora não tão eficientemente como observado em neutrófilos (McEWEN, 1992). Contudo, por conter abundantes grânulos citoplasmáticos, sua função secretória é muito mais importante. Eosinófilos podem secretar em resposta a estímulos dependentes de IgE ou independentes de IgE, mas ao contrário dos mastócitos e basófilos, os quais desgranulam rapidamente, eosinófilos secretam o conteúdo de seus grânulos lentamente (PLAGER et al., 1998). Os grânulos dos eosinófilos contêm várias proteínas importantes, incluindo proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica e peroxidase eosinofílica, assim como várias outras enzimas lisossomais (PLAGER et al., 1998). Essas proteínas possuem uma variedade de efeitos incluindo helmintotoxicidade, citotoxicidade, ação bactericida e a habilidade de desgranular mastócitos (McEWEN, 1992). Contudo, essas proteínas também podem causar injúria tecidual significativa em doenças alérgicas tais como a asma humana (PLAGER et al., 1998).

Os principais mediadores inflamatórios incriminados na patogênese da DAC são histamina, serotonina e leucotrienos, porém, destes apenas a histamina foi mais profundamente estudada e parece ser de grande importância para a patogênese da doença. Outras citocinas, já melhor estudadas na dermatite atópica humana, também podem estar envolvidas, tais como a IL4 e IL5 (MARSELLA & OLIVRY, 2001).

Na DAC, a principal função dos linfócitos-B é a síntese de imunoglobulinas alérgeno-específicas. Anticorpos da classe IgE aparentemente são os mais importantes, embora

subclasses de IgG também possam estar envolvidas. Em seres humanos, a associação de IgE com as hipersensibilidades tipo I é bem aceita. Contudo, a associação de anticorpos da classe IgG, particularmente IgG4, com tais doenças é controversa e paradóxica. Essa subclasse pode atuar como um anticorpo anafilático ineficiente que inicia uma hipersensibilidade imediata. Contudo, ele também pode atuar como um “anticorpo bloqueador” que pode prevenir a ligação de IgE ao alérgeno (AALBERSE et al., 1993).

A importância da IgG na DAC é menos compreendida. WILLENSE et al. (1985) identificaram um anticorpo anafilático não-IgE, chamado IgGd, no soro de cães atópicos. Foi proposto que IgGd possa ser importante na patogênese da DAC e uma possível explicação para resultados discordantes entre testes cutâneos e testes sorológicos para IgE em cães atópicos.

HITES et al. (1989) detectaram IgG alérgeno-específica em cães atópicos e normais, porém em níveis mais altos nos cães atópicos recebendo imunoterapia. HILL et al. (1995) observaram níveis significativamente mais altos de IgG total em cães atópicos do que em cães normais.

Diversos estudos no final dos anos 60 e início dos anos 70 do século passado estabeleceram que IgE era o principal, senão o único anticorpo com atividade reagínica no homem (ISHIZAKA & ISHIZAKA, 1967; BENNICH et al., 1969). A importância da IgE nas diferentes doenças classificadas como “atópicas” é, contudo, controversa. Embora já esteja estabelecido que imunoglobulinas IgE desempenhem papel crucial na rinite e asma alérgica no ser humano, alguns autores acreditam que o aumento de IgE represente apenas um epifenômeno (HOLDEN & PARISH, 1998).

Em cães, contudo, existe abundância de evidências clínicas indicando que a DAC é desencadeada por antígenos, e que a IgE atue não somente na fase efetora, induzindo a desgranulação dos mastócitos, mas também na captura de antígenos quando ligada aos receptores de alta afinidade (Fc $\gamma$ RI) na superfície das células de Langerhans (HILL & OLIVRY, 2001).

Os sinais clínicos da DAC são muito variáveis e não existe um sinal patognomônico. O diagnóstico inicial é clínico e deve ser realizado através da identificação de uma combinação de critérios clínicos associados à doença (DeBOER & HILLIER, 2001). Os critérios clínicos sugeridos por WILLENSE (1986) (Tabela 1) são os mais utilizados para o estabelecimento do diagnóstico de DAC. Infelizmente esses critérios nunca foram avaliados em relação à sensibilidade e especificidade e, portanto, devem sempre ser interpretados com cuidado e após a eliminação de outras hipóteses diagnósticas de doenças cutâneas pruriginosas (DeBOER & HILLIER, 2001).

**Tabela 1.** Critérios diagnósticos sugeridos por WILLENSE (1986) para a Dermatite Atópica Canina.

| Critérios maiores (no mínimo três)  | Critérios menores (no mínimo três)   |
|---|--|
| Prurido   | Início dos sintomas entre 1 e 3 anos   |
| Morfologia e distribuição das lesões:<br>acometimento facial e/ou digital<br>liquenificação do jarrete e/ou carpo cranial | Eritema facial<br>Conjuntivite bilateral<br>Pioderma superficial                   |
| Dermatite crônica ou recidivante  | Reações positivas no teste ID  |
| Predisposição racial ou histórico familiar  | Hiperidrose<br>IgGd alérgeno-específica elevada<br>IgE alérgeno-específica elevada |

Os achados histopatológicos das biópsias cutâneas de cães atópicos são caracterizados por graus variáveis de dermatite perivascular superficial com predomínio de linfócitos e histiócitos. Mastócitos podem estar aumentados na quantidade e embora possa ocorrer eosinofilia tecidual branda, este achado não é comum nos exames histopatológicos de rotina. A presença de intensa eosinofilia tecidual sugere outras doenças ou patologia concomitante. Agregados intraepidermais focais de eosinófilos ou células de Langerhans podem ser encontrados. A presença de numerosos neutrófilos, plasmócitos ou ambos, indicam infecção cutânea, na maioria das vezes causada por *Staphylococcus intermedius*. No entanto, o exame histopatológico não confirma o diagnóstico de dermatite atópica. Ele deve ser utilizado para descartar outras hipóteses diagnósticas e para sugerir a necessidade de outros testes diagnósticos complementares (SCOTT et al., 2001).

Existe consenso entre dermatologistas para que outras hipóteses diagnósticas de doenças pruriginosas devam ser descartadas, tais como escabiose, hipersensibilidade à picada de pulgas e alergia alimentar. Uma vez confirmada a suspeita inicial de dermatite atópica, o clínico deve utilizar os testes alérgicos para complementar o diagnóstico. Os testes alérgicos disponíveis em medicina veterinária são os testes intradérmicos e os testes sorológicos para quantificação de anticorpos IgE ou IgG alérgeno-específicas. Os principais objetivos destes testes são selecionar alérgenos candidatos para a imunoterapia e servir como base para a instituição de medidas que possam minimizar a exposição dos pacientes aos alérgenos identificados (DeBOER & HILLIER, 2001).

Os testes sorológicos disponíveis comercialmente para uso veterinário possuem baixa especificidade e, portanto, não devem ser recomendados como único método para o diagnóstico da DAC. Eles podem ser úteis, quando associados aos testes intradérmicos, na escolha de alérgenos que devem ser incluídos na imunoterapia. Os testes intradérmicos são mais fidedignos que os testes de escarificação cutânea, puntura (“prick test”) ou sorológicos e são utilizados em medicina humana e veterinária há muitas décadas (SCOTT et al., 2001). O objetivo destes testes é a demonstração de hipersensibilidade mediada por IgE. Contudo, a presença de uma reação positiva nem sempre indica doença alérgica, podendo algumas vezes indicar hipersensibilidade subclínica (HILLIER & DeBOER, 2001).

Até o momento, ainda não foram produzidos extratos alergênicos padronizados para o diagnóstico de doenças atópicas em animais. Os extratos utilizados em medicina veterinária são padronizados de forma inespecífica em peso/volume (w/v) ou em unidades de nitrogênio protéico/mililitro (PNU/ml) (HILLIER & DeBOER, 2001; REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001; ZUR et al., 2002). A solução de controle positivo mais utilizada em medicina veterinária é o difosfato de histamina a 0,01% (BENSIGNOR & CARLOTTI, 2002) ou 0,001% (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001). Recentemente, HENSEL et al. (2004) compararam estas duas concentrações de histamina em 30 cães saudáveis e concluíram que a concentração ótima para a utilização do controle positivo nos testes intradérmicos em cães é a de 1:10.000 w/v (0,01%). A solução de controle negativo deve ser composta por solução diluente usada na diluição dos extratos alergênicos, mais comumente tampão fosfato-salina a 0,9% (REEDY et al., 1997).

A seleção dos alérgenos utilizados nos testes intradérmicos irá variar de acordo com a região onde o paciente vive. As informações sobre os alérgenos mais importantes para cães em cada região podem ser obtidas de veterinários particulares locais, faculdades de veterinária locais, empresas que produzem e/ou fornecem extratos alergênicos para testes cutâneos ou laboratórios que oferecem testes sorológicos para quantificação de IgE alérgeno-específica, ou mesmo de livros texto de dermatologia e alergia veterinária (REEDY et al., 1997). Outras informações também podem ser obtidas de médicos-alergologistas da região, de faculdades de medicina e agências de climatologia. Porém, o veterinário-alergologista deve estar ciente de

que alérgenos de importância em medicina humana não são necessariamente importantes para cães e que, mesmo dentro de zonas definidas de polinização, pode haver uma grande variabilidade na vegetação e nas condições climáticas (HILLIER & DeBOER, 2001).

Muitas drogas podem alterar a reatividade aos alérgenos utilizados no teste intradérmico. O único antihistamínico avaliado em cães em relação à reatividade cutânea foi o hidroxizine. Na dosagem de 3 mg/kg duas vezes ao dia, observou-se a supressão da reatividade cutânea à histamina e antígenos de pulgas por até nove dias. Na ausência de outros trabalhos publicados sobre os efeitos dos antihistamínicos na reatividade cutânea, recomenda-se a interrupção desses medicamentos pelo menos entre sete a dez dias antes da realização dos testes (REEDY, et al., 1997; HILLIER & DeBOER, 2001). O período de interrupção para antihistamínicos de longa duração, como a cetirizina e astemizol, pode ser maior, como indicado em seres humanos (JUNIPER et al., 1988). Os efeitos dos glicocorticóides na reatividade cutânea são dependentes da formulação e potência utilizada, assim como da dosagem, frequência de administração, duração do tratamento, e fatores individuais do paciente. Glicocorticóides tópicos reduzem as reações cutâneas imediatas e as de fase lenta em seres humanos (PIPKORN et al., 1989). A recomendação para a interrupção de glicocorticóides tópicos e de uso oral é de 3 semanas e, de glicocorticóides injetáveis 8 semanas (SCOTT et al., 2001). Outras drogas que podem afetar a reatividade cutânea incluem compostos com progesterona, antidepressivos tricíclicos e agonistas  $\beta$ -2 adrenérgicos. Porém o efeito dessas drogas em cães ainda não foi avaliado (HILLIER & DeBOER, 2001).

No momento do teste intradérmico o paciente não deve ter a pele inflamada ou infeccionada. Se lesões cutâneas primárias ou secundárias estiverem presentes, os pontos de inoculação intradérmica devem estar distantes o suficiente destas lesões para permitir a interpretação da reatividade cutânea (HILLIER & DeBOER, 2001). A reatividade cutânea parece não variar nas diferentes regiões do corpo, e por convenção ou hábito, a maioria dos veterinários dermatologistas escolhe a área do tórax lateral para a realização do teste intradérmico (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001). O local é suavemente tricotomizado com uma lâmina de tosa número 40 e não deve ser lavado ou escovado. Os pontos de inoculação dos extratos alérgênicos devem ser marcados com caneta a prova d'água e separados por uma distância mínima de 3 cm (HILLIER & DeBOER, 2001).

Os testes intradérmicos podem ser realizados em cães sem sedação, porém é importante que esses cães não fiquem estressados, com conseqüente hipercortisolemia, o que poderia afetar adversamente a reatividade cutânea (FRANK et al., 1992). Contudo, a maioria dos veterinários dermatologistas prefere sedar os animais para facilitar as aplicações dos extratos e as leituras das reações. Sedativos e anestésicos que não afetam a reatividade cutânea e, portanto, são aceitáveis para a realização dos testes intradérmicos incluem a xilazina, medetomidina, tiletamina com zolazepam, thiamilal, halotano, isoflurano e methoxiflurano. Sedativos e anestésicos que podem alterar a reatividade cutânea e que, portanto, não devem ser utilizados incluem a oximorfina, ketamina com diazepam, acepromazina e propofol (HILLIER & DeBOER, 2001).

As injeções intradérmicas de soluções-controle e extratos alérgênicos são realizadas com seringas de 1,0 mL ou de tuberculina, e agulhas de 0,5 a 0,75 mm de diâmetro. Normalmente, 0,05 mL de solução controle ou extrato alérgênico é injetado por via intradérmica. A quantidade de solução injetada é menos importante do que a concentração dos extratos (MALLING, 1993). Embora volumes de 0,02 - 0,1 mL possam ser utilizados, a maioria dos dermatologistas injeta 0,05 mL de alérgenos ou soluções controle (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001) Após as aplicações corretas dos extratos alérgênicos e das soluções-controle, observa-se uma elevação esbranquiçada na pele. As seringas não devem conter bolhas de ar, pois se injetadas por via intradérmica podem dificultar a interpretação das reações. Agulhas sem corte, grossas demais ou técnica traumática podem provocar

hemorragias nos pontos de aplicação, dificultando desta forma a interpretação das reações (HILLIER & DeBOER, 2001).

As reações cutâneas imediatas são lidas entre 15 e 20 minutos após as injeções. As reações podem ser avaliadas de forma subjetiva, através da avaliação da intensidade e/ou tamanho do eritema e turgidez, ou objetivamente, através da medida do diâmetro ou área de eritema ou pápula (HILLIER & DeBOER, 2001). Os critérios utilizados para considerar uma reação positiva ou negativa variam amplamente, e ainda não foram criteriosamente avaliados em medicina veterinária. As reações podem ser consideradas positivas quando são iguais ou maiores que a média dos diâmetros dos controles positivo e negativo, ou quando possuem pelo menos 3 mm a mais que o diâmetro do controle negativo (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001).

Em seres humanos com dermatite atópica, a injeção intradérmica de alérgenos resulta em uma resposta bifásica. Depois da reação imediata já descrita, uma reação de fase lenta (“Late Phase Reaction”) ocorre entre 6 e 24 horas, caracterizada pelo espessamento, endurecimento, edema difuso, prurido e eritema da pele. Durante as primeiras 6 horas ocorre influxo de neutrófilos, eosinófilos e basófilos. Essa etapa é seguida pela infiltração de células mononucleares incluindo células T de memória. Esse padrão de infiltrado celular inflamatório lembra muito aquele observado nas lesões cutâneas da dermatite atópica, sugerindo que as reações de fase lenta possam ser clinicamente mais relevantes para a doença do que as reações imediatas. Porém, parâmetros para leitura e interpretação destas reações ainda não foram estabelecidos. Da mesma forma, essas reações ainda não foram convenientemente estudadas em medicina veterinária e, portanto, não se conhece a importância clínica e nem se são mais importantes que as reações imediatas (HILL et al., 2001).

O tratamento da DAC é multifacetado e consiste de uma combinação de ações que incluem evitar os alérgenos, uso de drogas antiinflamatórias, imunoterapia alérgeno-específica e drogas antimicrobianas. No entanto, a eliminação de alérgenos é difícil de ser alcançada e a resposta à farmacoterapia frequentemente é insatisfatória. Nesses casos, a possibilidade de modulação da resposta imune deve ser considerada. Este conceito norteia a idéia da imunoterapia alérgeno-específica ou SIT (“Specific Immunotherapy”), também conhecida como hipossensibilização, dessensibilização e “vacinação” para alergia (OLIVRY & SOUZA, 2001).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) emitiu um guia para SIT em pacientes alérgicos humanos. Esta forma de tratamento é definida como “a prática da administração de quantidades gradualmente crescentes de um produto alergênico a um indivíduo alérgico com o intuito de atenuar os sintomas associados com a exposição subsequente a um alérgeno causador” (BOUSQUET et al., 1998). Imunoterapia alérgeno-específica induz tolerância imunológica e clínica, tem eficácia de longa duração e pode prevenir a progressão da doença alérgica (ALVAREZ-CUESTA, et al., 2006). A imunoterapia não é indicada para todo paciente com dermatite alérgica (OLIVRY & SOUZA, 2001) e a OMS propôs que a imunoterapia é indicada apenas para pacientes que demonstram evidências de anticorpos da classe IgE específicos para alérgenos clinicamente relevantes e para pacientes cujos sintomas alérgicos justifiquem o tempo e o risco envolvidos com a imunoterapia alergênica (BOUSQUET et al., 1998). A imunoterapia alérgeno-específica é a única opção de tratamento disponível com o potencial de induzir à remissão parcial ou completa da DAC sem a necessidade do uso de drogas antiinflamatórias adicionais (OLIVRY & SOUZA, 2001).

## 2.2. Alérgenos de ácaros da poeira domiciliar

Os alérgenos são designados de acordo com a nomenclatura taxonômica aceita de suas fontes como segue: as primeiras três letras do gênero, espaço, a primeira letra da espécie, espaço, e um número Árabe. Os números são atribuídos aos alérgenos na ordem de sua identificação, e o mesmo número é geralmente usado para designar alérgenos homólogos de espécies relacionadas (KING et al., 1995). Por exemplo, Der p 1 e Der f 1 são do grupo 1 de alérgenos de *D. pteronyssinus* e *D. farinae*, respectivamente.

Ácaros da poeira domiciliar e de produtos armazenados são considerados como a principal causa de doença atópica em cães e seres humanos (SWINNEN & VROOM, 2004). Em seres humanos, ácaros da poeira domiciliar, especialmente *D. farinae* e *D. pteronyssinus*, induzem testes cutâneos positivos em 45 a 80% da população asmática. A associação entre alérgenos de ácaros da poeira domiciliar e sensibilização já é reconhecida, não somente em pacientes com asma, mas também naqueles com outras doenças alérgicas tais como rinite alérgica e dermatite atópica (AKDIS et al., 2006; PASSALACQUA & DURHAM, 2007).

Ácaros da poeira domiciliar são aracnídeos de vida livre que utilizam carpetes e tapetes de fibras naturais, colchões, roupas de cama e frestas de assoalhos e de rodapés para nidificação e reprodução. Para tal, são necessárias boas condições climáticas e disponibilidade de alimento, em geral representado por fungos e descamações da pele de pessoas e animais (BAGGIO et al., 1992). A umidade é o principal fator limitante para o desenvolvimento e crescimento da população de ácaros da poeira domiciliar. A regulação osmótica se faz através da cutícula e, portanto, altos níveis de umidade do ar são necessários para que não ocorra a dessecação do ácaro (EZEQUIEL et al., 2001). Ácaros da poeira domiciliar necessitam de temperatura ambiente ideal em torno de 25 a 30° C e umidade relativa entre 75 e 80% para se desenvolverem (PLATTS-MILLS & CHAPMAN, 1987). Os ácaros de produtos armazenados são encontrados principalmente no meio rural, em grãos, farinhas e feno, mas também podem ser encontrados na poeira domiciliar, desde que as condições de umidade e temperatura sejam favoráveis para o seu desenvolvimento. Estes ácaros se desenvolvem em ambientes úmidos, com umidade relativa ideal em torno de 80% e temperatura entre 25 e 30° C (TEE, 1994).

O Brasil é um país tropical com umidade relativa e temperatura média anual em torno de 70% e 27° C, respectivamente. Tais condições são altamente favoráveis para o desenvolvimento de ácaros da poeira domiciliar. Os gêneros mais comumente encontrados no país são pertencentes às famílias Pyroglyphidae, Glycyphagidae, Cheyletidae, e Acaridae. O gênero *Dermatophagoides* (Pyroglyphidae) é o mais descrito, representado principalmente pelas espécies *D. pteronyssinus* e *D. farinae* (BINOTTI et al., 2001). A primeira é encontrada em todo território nacional e sua prevalência variou de 3,7 a 89,3% dos ácaros encontrados nos diversos estados (ROSA, 1978; BAGGIO et al., 1992). A prevalência de *D. farinae* variou de 0,05% a 39,2%, sendo encontrada em quase todo território nacional (MOREIRA, 1975; BAGGIO & AMBROSIO, 1992). A família Glycyphagidae é a segunda mais descrita, sendo representada principalmente pelas espécies *Blomia tropicalis* e *Glycyphagus domesticus*, com prevalência variando entre 3,8 a 79,5% (ROSA, 1978; CHAGAS et al., 2000) e 6,8 a 36,5% (MOREIRA, 1975), respectivamente, nos diversos estados. *Tyrophagus putrescentiae* (Acaridae) já foi descrito em diversas regiões do país e sua prevalência variou de 0,2 a 10,5% (ROSA, 1978).

Ácaros da poeira domiciliar, em particular *D. farinae* e *D. pteronyssinus*, são considerados as principais fontes de alérgenos responsáveis pelas hipersensibilidades tipo I em cães, afetando de 30 a 100% dos cães com dermatite atópica (RANDALL et al., 2003). A suposição de que os ácaros da poeira domiciliar e de produtos armazenados são biologicamente relevantes para a patogênese da DAC é sustentada por três linhas principais de evidências (HILL & DeBOER, 2001). Primeiro, numerosos estudos demonstraram que cães

com sinais clínicos de dermatite atópica podem reagir a estes antígenos. Esta reatividade tem sido demonstrada através de três metodologias principais: reações positivas nos testes intradérmicos; níveis aumentados de IgE ou IgGd alérgeno-específico no soro; ou demonstração de IgE ou IgGd específicos para proteínas antigênicas através de eletroforese com gel de poliacrilamida e “immunoblotting” (“Western blotting”). Segundo, muitos estudos evidenciaram que os sinais clínicos da DAC podem ser reduzidos com imunoterapia alérgeno-específica. A terceira linha de evidência está baseada na suposição de que a DAC é uma doença similar às doenças atópicas em seres humanos, tais como asma, rinite alérgica e dermatite atópica (DA), com envolvimento de alérgenos similares. Além disso, pelo menos dois alérgenos principais de *D. farinae*, reconhecidos pelos soros de cães atópicos, já foram identificados e caracterizados (McCALL et al., 2001; WEBER et al., 2003) e medidas de controle de ácaros na poeira domiciliar levaram à redução dos sinais clínicos de cães com dermatite atópica (SWINNEN & VROOM, 2004).

Nos EUA, *D. farinae* é a espécie prevalecente dentre os pyroglyphideos e considerada de maior importância clínica para cães (SINKE et al., 2002; RANDALL et al., 2003). Apesar da presença dessa espécie ser pouco documentada no Reino Unido, a sensibilização de cães atópicos a *D. farinae* é mais comum do que à *D. pteronyssinus*, considerada espécie prevalecente. Um estudo realizado em Edinburg e Londres avaliou os resultados de testes intradérmicos em cães e mostrou que 40 a 50% dos cães eram sensíveis a *D. farinae*, mas somente 10 a 20% eram sensíveis a *D. pteronyssinus*, e concluíram que sensibilização a *D. pteronyssinus* na ausência de sensibilização a *D. farinae* era rara (STURE et al., 1995). Um estudo posterior em Edinburg mostrou que até 67% e até 50% dos soros de cães atópicos formavam bandas de precipitação em “Western Blottings” com extratos de *D. fariane* e *D. pteronyssinus*, respectivamente (NUTTAL et al., 2001a). Testes intradérmicos positivos a extratos de *D. farinae* são também mais frequentes que a extratos de *D. pteronyssinus* na França (BENSIGNOR & CARLOTTI, 2002), Japão (MASUDA et al., 2000) e Brasil (CUNHA et al., 2007). Estes achados sugerem que cães podem ser particularmente expostos a *D. farinae*. Descamações de cães podem servir como substrato importante para *D. farinae*, ou a permanência de um cão dentro de casa pode propiciar um microclima que favoreça essa espécie (NUTTAL et al., 2006).

Trabalhos anteriores podem também ter subestimado o número de *D. farinae* no ambiente. Em áreas onde sabidamente a quantidade de *D. farinae* é baixa, foram encontrados níveis iguais de Der p 1 e Der f 1 no ambiente (SOPELETE et al., 2000) e foi especulado que flutuações sazonais da população de ácaros podem conduzir a um número de *D. farinae* artificialmente baixo. A distribuição de espécies de *Dermatophagoides* também varia dentro de áreas geográficas pequenas. Na Croácia, por exemplo, *D. pteronyssinus* é mais comum que *D. farinae* na costa Mediterrânea, mas o inverso acontece na região continental (MACAN et al., 2003). Além disso, há evidências de que a sensibilização a *D. farinae* em cães pode representar reação cruzada com *D. pteronyssinus*. Dois estudos demonstraram que enquanto *D. pteronyssinus* é abundante, *D. farinae* é quase que ausente em ambientes de cães atópicos sensibilizados a ambas espécies no noroeste (RAFFAN et al., 2005) e sudoeste da Inglaterra (JACKSON et al., 2005). Um estudo similar em Ohio, contudo, demonstrou que *D. farinae* foi encontrado mais frequentemente e numa densidade mais alta que *D. pteronyssinus* (RANDALL et al., 2003). Variações substanciais nos níveis de Der f 1 entre cidades da Holanda, ambas próximas ao mar e afastadas entre si por 250 Km, podem indicar que fatores geológicos e demográficos também podem contribuir para a prevalência dessas espécies (TEMPELS-PAVLICA et al., 2004). Estudo realizado no Chile mostrou que níveis de Der p 1 em colchões foram significativamente mais altos em grupos socioeconômicos de classe média-baixa do que em grupos de classe média-alta de pacientes da mesma cidade (CALVO et al., 2005).

O ácaro *B. tropicalis* é comumente encontrado em domicílios de regiões subtropicais dos EUA e Europa, e em regiões tropicais e subtropicais da América do Sul e Ásia, normalmente associados aos ácaros pyroglyphideos (ROSA & FLECHTMANN, 1979; ARLIAN et al., 1993). Em climas tropicais *B. tropicalis* pode ser a espécie dominante. Uma pesquisa de ácaros em 72 casas no Brasil mostrou que *B. tropicalis* estava presente em todas as casas e constituiu 79,5% do número total de ácaros encontrados nas amostras (ROSA & FLECHTMANN, 1979).

Diversos estudos realizados com seres humanos revelaram testes cutâneos positivos e/ou presença de anticorpos IgE circulantes para *B. tropicalis* no soro de indivíduos que foram expostos a esta espécie (ARRUDA et al., 1991; LLERENA et al., 1991). Em estudo realizado na cidade de São Paulo, Brasil, 77 e 78% de um grupo de 123 pacientes com asma e/ou rinite tinham testes cutâneos positivos para *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis*, respectivamente (ARRUDA et al., 1991). Um estudo realizado em Cartagena, Colômbia, mostrou que 66 e 90% dos indivíduos alérgicos a ácaros tinham resultados positivos no RAST para *D. farinae* e *B. tropicalis*, respectivamente, com um coeficiente de correlação de 0,59 para sensibilidade a ambas as espécies (LLERENA et al., 1991). A importância de *B. tropicalis* para a DAC ainda é desconhecida.

Alérgenos principais ou ‘major’ são definidos por convenção como aqueles que são reconhecidos por mais que 50% dos soros de pacientes atópicos, e alérgenos secundários ou ‘minor’ são aqueles que são reconhecidos por menos que 50% dos pacientes (THOMAS et al., 1998). A Tabela 2 contém a lista dos principais alérgenos de *D. fariane*, *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* já identificados para seres humanos até o momento (COLLOFF, 2009) e depositados no banco de dados do Subcomitê para nomenclatura de alérgenos ([www.allergen.org](http://www.allergen.org)), o qual se encontra sob o auspício da União Internacional das Sociedades Imunológicas (I.U.I.S.) e da Organização Mundial de Saúde (W.H.O.).

Os alérgenos de *Dermatophagoides* relevantes para cães são menos conhecidos, mas os alérgenos principais parecem diferir entre cães e seres humanos. Ao contrário de seres humanos, cães reagem predominantemente a alérgenos de alto peso molecular (McCALL et al., 2001). Neste trabalho foi utilizado um receptor recombinante de alta afinidade para IgE humana (FcεRIα) para detectar proteínas com afinidade por IgE no westernblotting de *D. farinae*. Oitenta e cinco por cento dos cães atópicos reconheceram alérgenos de 60, 98 e 109 kDa, embora 69% destes também reconheceram Der f 1 (24 kDa).

Estudos prévios demonstraram pouca ou nenhuma ligação de IgE aos alérgenos de baixo peso molecular de extratos brutos de *Dermatophagoides* ou extratos purificados do grupo 1 e 2 (NOLI et al., 1996; McCALL et al., 2001; NUTTAL et al., 2001b).

Em um estudo recente, MAEDA et al. (2009) avaliaram os efeitos de Der f 1 sobre a expressão gênica de quimiocinas e citocinas em linhagens de queratinócitos caninos. Esses queratinócitos expressaram RNAm para TNF-α, IL-12p35, IL-18, GM-CSF, TGF-β, IL-8/CXCL8, TARC/CCL17, CTACK/CCL27 e MEC/CCL28. De todas as quimiocinas e citocinas investigadas nessa linhagem de células, os níveis de transcrição de RNAm para GM-CSF, IL-8/CXCL8 e TNF-α foram significativamente aumentados pela estimulação com Der f 1. Este estudo sugeriu que Der f 1 pode aumentar diretamente a produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias pelos queratinócitos, podendo iniciar uma reação inflamatória independentemente da presença de anticorpos anafiláticos.

**Tabela 2.** Principais alérgenos de ácaros identificados para a espécie humana e depositados no banco de dados da União Internacional das Sociedades Imunológicas (I.U.I.S.).

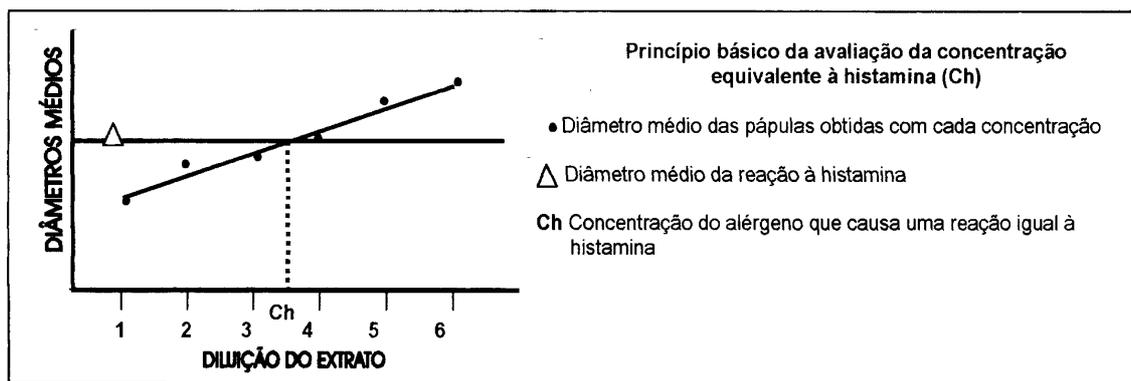
| Ácaros                   | Nome                        | Peso molecular (kDa) | Identidade                      |                             |
|--------------------------|-----------------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| <i>Blomia tropicalis</i> | Blo t 1                     | 25,126               | Peptidase cisteína              |                             |
|                          | Blo t 2                     | 13,528               | Proteína ligante de lipídio     |                             |
|                          | Blo t 3                     | 23,824               | Tripsina                        |                             |
|                          | Blo t 4                     | 55,055               | Alfa-amilase                    |                             |
|                          | Blo t 5                     | 13,497               | Proteína estrutural             |                             |
|                          | Blo t 6                     | 24,743               | Quimotripsina                   |                             |
|                          | Blo t 8                     | 27,630               | Glutaciona S-transferase        |                             |
|                          | Blo t 9                     | 23,598               | Colagenase                      |                             |
|                          | Blo t 10                    | 33,003               | Tropomiosina                    |                             |
|                          | Blo t 11                    | 102,028              | Paramiosina                     |                             |
|                          | Blo t 12                    | 14,337               | Proteína ligante de quitina     |                             |
|                          | Blo t 13                    | 14,8                 | Proteína ligante de ácido-graxo |                             |
|                          | Blo t 14                    | 39,353               | Vitelogenina                    |                             |
|                          | Blo t 18                    | 49,231               | Quitinase                       |                             |
|                          | Blo t 19                    | 7,226                | Peptídeo antimicrobiano         |                             |
|                          | Blo t 21                    | 14,944               | Proteína estrutural             |                             |
|                          | <i>Dermatophagoides sp.</i> | Der p 1              | 25,394                          | Peptidase cisteína          |
|                          |                             | Der f 1              | 25,148                          | Peptidase cisteína          |
|                          |                             | Der p 2              | 14,121                          | Proteína ligante de lipídio |
|                          |                             | Der f 2              | 14,081                          | Proteína ligante de lipídio |
|                          |                             | Der p 3              | 24,987                          | Tripsina                    |
| Der f 3                  |                             | 24,954               | Tripsina                        |                             |
| Der p 4                  |                             | 57,15                | Alfa-amilase                    |                             |
| Der p 5                  |                             | 13,587               | Proteína estrutural             |                             |
| Der f 5                  |                             | 13,614               | Proteína estrutural             |                             |
| Der p 6                  |                             | 24,885               | Quimotripsina                   |                             |
| Der f 6                  |                             | 25,034               | Quimotripsina                   |                             |
| Der p 7                  |                             | 22,179               | Função desconhecida             |                             |
| Der f 7                  |                             | 21,863               | Função desconhecida             |                             |
| Der p 8                  |                             | 25,668               | Glutaciona S-transferase        |                             |
| Der p 9                  |                             | 23,756               | Colagenase                      |                             |
| Der p 10                 |                             | 32,901               | Tropomiosina                    |                             |
| Der f 10                 |                             | 32,955               | Tropomiosina                    |                             |
| Der p 11                 |                             | 102,417              | Paramiosina                     |                             |
| Der f 11                 |                             | 81,372               | Paramiosina                     |                             |
| Der f 13                 |                             | 14,980               | Proteína ligante de ácido-graxo |                             |
| Der f 14                 | 39,668                      | Vitelogenina         |                                 |                             |
| Der p 15                 | 61,413                      | Quitinase            |                                 |                             |
| Der f 15                 | 61,111                      | Quitinase            |                                 |                             |
| Der f 16                 | 55,131                      | Gelsolina            |                                 |                             |
| Der p 18                 | 49,227                      | Quitinase            |                                 |                             |
| Der f 18                 | 49,468                      | Quitinase            |                                 |                             |
| Der p 20                 | 40,477                      | Arginina quinase     |                                 |                             |

### 2.3. Padronização de extratos alergênicos

Para que os resultados dos testes alérgicos sejam fidedignos é necessária a padronização dos extratos alérgicos (DREBORG, 1993; Position Statement: AAAAI, 1997). A primeira tentativa de padronização de extratos alérgicos foi desenvolvida por NOON (1911), que propôs o tratamento etiológico da “febre do feno” em seres humanos, causada por pólen (CARREIRA, 1992). O objetivo de NOON era injetar extratos de polens em indivíduos doentes para que houvesse a produção de antitoxinas que neutralizassem as toxinas dos pólenes. NOON chamou atenção para a importância de se poder determinar a quantidade do princípio ativo introduzido em seus pacientes, e criou seu próprio método de controle, até hoje utilizado por alguns grupos. Com o objetivo de expressar a potência do extrato, definiu a “unidade” de toxina polínica como aquela quantidade que podia ser extraída de 1 µg de pólen de *Phleum*. Desta forma, estabelecia um sistema numérico que permitia designar uma quantidade, para qualquer extrato, em Unidades Noon/mL. O conceito de toxina era incorreto, assim como o de unidades Noon, pois supunha que da mesma quantidade em peso de matéria prima, sempre se poderia extrair a mesma quantidade do princípio ativo, o que é totalmente falso. A unidade Noon tem sido utilizada até hoje com o nome de seu autor ou pela denominação de relação peso/volume (p/v) e, portanto, as objeções feitas para a unidade Noon são igualmente válidas para a relação peso/volume (CARREIRA, 1992).

Na década de 30 já se aceitava que a maioria dos alérgenos eram proteínas e STULL et al. (1933) sugeriram que a quantidade de proteína de um extrato representaria um bom método para controlar extratos alérgicos. Admitiu-se que toda proteína de um extrato poderia ser precipitada com ácido fosfotúngstico e que o nitrogênio medido no precipitado representaria a proteína total deste extrato. Desta forma, se estabeleceu a unidade de nitrogênio proteico, até hoje conhecida como PNU, na qual 1 PNU representa a quantidade de nitrogênio proteico correspondente a 62 ng de proteína. Porém, a quantidade total de proteína de um extrato não representa, de forma alguma, seu conteúdo em atividade alérgica ou proteína alérgica ativa. A maior parte de um extrato alérgico é composta por proteína não relacionada com fenômenos alérgicos e, o que é mais importante, a relação entre proteína alérgicamente ativa e alérgicamente inerte varia enormemente, não somente entre espécies, mas também entre lotes da mesma espécie. Além disso, alguns alérgenos importantes podem ser instáveis ao calor ou à degradação enzimática em certas condições de manipulação e armazenamento (CARREIRA, 1992).

Em 1978, ASS et al. publicaram o primeiro método de determinação de atividade biológica elaborado de forma sistemática. A técnica eleita foi o teste cutâneo de puntura e a avaliação da atividade biológica total, que representa o somatório das atividades individuais de todos os alérgenos do extrato, é baseada unicamente na reatividade cutânea dos pacientes sensíveis. Portanto, é de extrema importância a seleção correta dos indivíduos testados, cuja reatividade cutânea não pode estar alterada por imunoterapia prévia ou utilização de drogas para tratamento sintomático. São selecionados entre 10 e 20 sujeitos da pesquisa, com história clínica compatível, teste de puntura e RAST positivos ao alérgeno objeto de estudo. Os sujeitos da pesquisa são testados com no mínimo três concentrações do extrato em questão além dos controles negativo e positivo, neste caso, a histamina a 1% (10 mg/mL) e precisam evidenciar uma pápula de pelo menos 6 mm de diâmetro médio no ponto de aplicação do controle positivo. Desta forma, àquele extrato capaz de produzir uma pápula igual a da histamina a 10 mg/mL atribui-se 10 HEP (“Histamine Equivalent Prick”), isto é, uma atividade biológica capaz de produzir, por puntura, uma reação igual à gerada pela solução de histamina a 10 mg/mL (Figura 1). Ao extrato com 10 HEP de atividade alérgica foi designado 10.000 Unidades Biológicas/mL.



**Figura 1.** Método de determinação de atividade biológica de extratos alergênicos segundo ASS et al. (1978).

Em 1979, BRIGHTON et al. propuseram uma nova definição de unidade de atividade biológica para extratos alergênicos. Neste método, 30 pacientes clinicamente sensíveis ao extrato em questão são testados, através de teste de puntura, com 4 diluições do extrato. Foi definido que um extrato alergênico, livre de irritantes, contém uma atividade de 10 unidades biológicas por mililitro (BU/mL) quando é capaz de produzir uma pápula cuja média geométrica tem 75 mm<sup>2</sup>.

Em 1982, TURKELTAUB propôs um método de determinação de atividade biológica em unidades de atividade alergênica (Allergy Unit/mL). Pacientes altamente sensíveis são testados, através de testes intradérmicos, com quatro diluições do extrato objeto de estudo em diluições seriadas em fator de 3. A primeira diluição é aquela em que o eritema provocado tem o mesmo tamanho da pápula e as três seguintes são as imediatamente mais concentradas. O tamanho do eritema é calculado em milímetros pela soma do diâmetro maior com o diâmetro perpendicular ao ponto médio do maior. A diluição que proporciona um eritema cuja soma de diâmetros é igual a 50 milímetros é denominada de D50. Os extratos mais ativos necessitam de diluição de 3<sup>-14</sup> para produzir um eritema de 50 milímetros, o que se traduz por uma D50 = 14. Por definição, a estes extratos mais potentes são designadas 100.000 AU/ml. Os grupos são formados de tal forma que uma D50 média igual a 14 inclui diluições de 13 a 15, uma D50 igual a 12 diluições de 11 a 13 e assim sucessivamente. Desta forma qualquer extrato ativo pode ser incluído dentro de um grupo de atividade e receber Unidades de Alergia (TURKELTAUB, 1982).

A criação de extratos referência, com atividade biológica determinada mediante ensaios *in vivo* e expressa em Unidades Biológicas, é uma condição indispensável em qualquer programa de padronização. Extratos referência ou padrão são comparados, através de métodos *in vitro* ou *in vivo*, com os extratos destinados ao uso clínico. O método mais empregado é o RAST de inibição, o qual permite averiguar a atividade biológica de qualquer extrato sempre que se disponha de uma referência da mesma espécie (LOMBARDERO et al., 1986). A atividade biológica de um extrato representa a soma das atividades individuais de cada um dos alérgenos que compõem o extrato e, obviamente, a composição alergênica de todo extrato destinado ao uso clínico deve ser um reflexo da composição alergênica do material que sensibilizou o paciente. Por muitas razões, em especial por diferenças de matéria-prima e processos de produção, é possível que algum extrato não contenha um determinado alérgeno principal. Portanto, é essencial o conhecimento da composição qualitativa dos extratos alergênicos, seja extratos referência ou para uso clínico. As principais técnicas que podem fornecer estas informações são: imunoeletoforese (IEF), contraimunoeletoforese (CIE), focalização isoeletrica, SDS-PAGE e “immunoblotting”. Todas são complexas e algumas como a CIE, às vezes, difíceis de reproduzir quando

reagentes diferentes são utilizados. Portanto, é extremamente importante a utilização de pelo menos duas técnicas para cada extrato (CARREIRA, 1992).

Cada extrato alergênico é composto por um grande número de proteínas. Somente algumas, normalmente entre 5 e 10, são alérgenos identificáveis por técnicas de laboratório (VENTAS et al., 1991). A importância relativa de cada alérgeno no extrato é algo que deve ser bem estudado. Alguns alérgenos são reconhecidos pela maioria da população sensível à espécie em questão e são denominados alérgenos principais. Outros são reconhecidos por uma pequena parcela da população sensível e são denominados alérgenos secundários. Algumas espécies de ácaros têm um único alérgeno principal, outras têm dois, três ou mais. Em alguns casos os alérgenos principais apresentam reatividade cruzada entre si ou com alérgenos menos importantes da mesma espécie (VENTAS et al., 1991).

Um alérgeno é chamado de alérgeno principal ou *major* quando, pelo menos, 50% dos pacientes alérgicos ao conjunto de alérgenos da espécie possuem IgE específica para ele. O método de quantificação de extratos alergênicos em unidades de massa (UM) visa determinar com precisão a quantidade de cada alérgeno principal no estado ativo e expressar suas quantidades em  $\mu\text{g}$  ou  $\text{ng}$  de proteína por mililitro. Desta forma, pode-se considerar que um extrato alergênico é quantificado em UM/mL quando se pode definir que para um total de 100 BU/mL, por exemplo, existe 'X'  $\mu\text{g}$  do alérgeno 1, 'Y'  $\mu\text{g}$  do alérgeno 2, 'Z'  $\mu\text{g}$  do alérgeno 3. Os demais alérgenos, identificados por menos de 50% dos soros dos pacientes alérgicos ao conjunto de alérgenos da espécie, são chamados de secundários ou *minor* e devem estar presentes nestes extratos, ainda que não quantificados em unidades de massa. Quantificar um alérgeno em UM/mL implica numa série de etapas sucessivas cuja investigação é longa, complexa e às vezes difícil. As etapas mais importantes podem ser resumidas da seguinte maneira: identificação de alérgenos principais ou *majors*; purificação do alérgeno mediante técnicas convencionais de purificação de proteínas; confirmação de que o alérgeno purificado produz reação cutânea em pelo menos 50% dos pacientes alérgicos ao extrato completo e de que, aproximadamente, este mesmo percentual de pacientes possui IgE específica no soro; obtenção de anticorpos monoclonais, em animais, capazes de reconhecer o alérgeno e que tenham especificidade e afinidade adequadas; realização de imunoensaio que permita quantificar o alérgeno purificado e, por comparação a ele, o mesmo alérgeno em uma mistura complexa onde existam outras proteínas alergênicas e não alergênicas; determinação das concentrações relativas dos alérgenos em espécies com mais de um alérgeno principal; e determinação da relação entre quantidade de proteína alergênica e atividade biológica (CARREIRA, 1992).

Recentemente, a Agência de Medicina Européia (EMEA), que regulamenta a atividade dos laboratórios produtores de extratos alergênicos na Europa, estabeleceu alguns critérios para caracterização e controle de extratos alergênicos. A caracterização e controle de qualidade de extratos alergênicos devem ser realizados em relação às substâncias ativas. Os alérgenos principais para um determinado extrato têm que ser definidos pelo fabricante e tem que ser demonstrado que o processo de produção é capaz de manter esses alérgenos, que deverão ser identificados por métodos tais como técnicas que utilizam anticorpos ou espectrometria de massa. O perfil de proteínas deve corresponder ao perfil do extrato referência e a presença de alérgenos principais deve ser verificada sempre que possível. Se uma parcela significativa da atividade alergênica total de um extrato provém de alérgenos secundários, estes têm que ser medidos também (EMEA, 2008).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Cães

Para a determinação da atividade biológica dos extratos alergênicos foram utilizados 11 cães, sendo 5 machos e 6 fêmeas, com idades variando entre um ano e nove meses e onze anos, e de diferentes raças (um Terrier Brasileiro, um Schnauzer, um Rotweiller, um Cocker Spaniel, um Beagle, um Boxer, um Pastor Alemão, um Pug, um Golden Retriever e dois sem raça definida). Todos possuíam diagnóstico clínico de dermatite atópica, segundo critérios propostos por WILLENSE (1986), e resultados positivos nos testes intradérmicos para extratos dos ácaros domésticos *D. farinae* e/ou *B. tropicalis*.

Os cães foram atendidos em clínicas particulares localizadas nas cidades do Rio de Janeiro e Niterói entre maio de 2007 e maio de 2008. Em todos os casos os responsáveis autorizaram por escrito a participação no estudo (Anexo I). Este estudo foi realizado de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

#### 3.2. Extratos alergênicos e soluções controles para os testes *in vivo* (testes intradérmicos)

Extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis*, produzidos pela ALK-ABELLÓ e padronizados em Unidades Biológicas (BU) para uso em seres humanos, foram utilizados nas seguintes concentrações: 1 BU/mL (lote: 07AA0649 e 07AA0652, respectivamente), 2 BU/mL (lote: 07AA0650 e 07AA0653, respectivamente) e 4 BU/mL (lote: 07AA0651 e 07AA0654, respectivamente). O extrato de *D. farinae* também foi padronizado em unidades de massa (UM), e possuía 0,4 µg/mL de Der f 1 e 0,2 µg/mL de Der f 2, equivalentes a 1 BU/mL; os extratos com 2 BU/mL e 4 BU/mL possuíam, respectivamente, 0,8 µg/mL de Der f 1 e 0,4 µg/mL de Der f 2 e 1,6 µg/mL de Der f 1 e 0,8 µg/mL de Der f 2. A escolha destas concentrações foi baseada nos resultados obtidos em estudo prévio realizado com os mesmos extratos em cães (CUNHA et al., 2007).

Como controle positivo foi utilizado o fosfato de histamina com 0,1 mg/mL (0,01%) (HENSEL et al., 2004) e como controle negativo solução salina tamponada e fenicada, ambos produzidos pela FDA ALLERGENIC (lotes 07AA0658 e 07AA0659, respectivamente). Tanto os extratos alergênicos como os controles foram fornecidos pela FDA ALLERGENIC Ltda (Rua da Abolição, 413 – Rio de Janeiro – Brasil), representante exclusivo no Brasil da ALK-ABELLÓ (DK-2970, Horsholm – Dinamarca).

#### 3.3. Testes intradérmicos

Para a realização dos testes intradérmicos a administração de alguns fármacos aos cães teve de ser interrompida. O tempo mínimo de interrupção foi de dez dias para antihistamínicos, três semanas para corticoidoterapia oral e oito semanas para corticoidoterapia injetável (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001). Em todos os casos foi utilizada contenção farmacológica com xilazina (0,5 mg/kg) por via intramuscular associado ao sulfato de atropina (0,04 mg/kg) por via subcutânea, conforme sugerido por LIAN & HALLIWELL (1998).

Os cães foram tricotomizados na região lateral do tórax com lâmina de tosa número 40 e 0,05 mL dos extratos alergênicos, nas três concentrações citadas, e das soluções controles foram inoculados por via intradérmica, com um espaço mínimo de 3 cm entre as inoculações.

Foram utilizadas seringas de insulina de 0,3 mL e agulhas de 8 mm de comprimento e 0,3 mm de calibre (BD Ultra-Fine™ II). As reações cutâneas foram avaliadas objetivamente 15 minutos após as injeções e o diâmetro das reações calculado através da média aritmética do diâmetro maior com o seu perpendicular (diâmetro maior + diâmetro perpendicular ao diâmetro maior / 2) (REEDY et al., 1997; SCOTT et al., 2001). Os contornos das reações foram marcados com uma caneta de tinta indelével de ponta fina (Faber-Castell) e sobre eles uma fita transparente (Fita Mágica 3 M<sup>®</sup>) foi pressionada, de modo que as marcações na pele, sob a fita, puderam ser copiadas sobre a fita com a caneta de ponta fina. Finalmente, as fitas foram coladas nas fichas de registro de dados dos pacientes correspondentes (Anexo III) e os diâmetros das reações medidos com paquímetro.

### **3.4. Determinação da atividade biológica dos extratos alergênicos em HEID (“Histamine Equivalent Intradermal Testing”)**

Este método é baseado no método descrito por ASS et al. (1978) para determinação da atividade biológica de extratos alergênicos utilizados para diagnóstico e tratamento de pessoas alérgicas. No presente estudo, consideraremos que um extrato possui 1 HEID quando é capaz de provocar em cães, através de inoculação intradérmica, reações do mesmo tamanho das reações provocadas pelo fosfato de histamina 0,1 mg/mL.

### **3.5. Determinação da atividade biológica dos extratos alergênicos em CBU (“Canine Biologic Units”)**

Este método é baseado no método proposto por BRIGHTON et al. (1979) para determinação da atividade biológica de extratos alergênicos utilizados para diagnóstico e tratamento de pessoas alérgicas e se diferencia do método anterior por não utilizar nenhum controle como referência. Consideraremos que um extrato possui 10.000 CBU/mL quando capaz de induzir em pacientes sensíveis a este extrato uma reação de 14 mm de diâmetro. A escolha deste valor é arbitrária e definida em função do conhecimento prévio de que reações de 14 mm são apropriadas para a interpretação dos testes intradérmicos em cães, conforme sugerido por HENSEL et al. (2004).

### **3.6. Análise estatística**

Foram calculados a média, intervalos de confiança superior e inferior (95%), desvio padrão, mediana, primeiro quartil e terceiro quartil dos resultados obtidos com os extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis*.

### **3.7. Soros caninos**

Soros de 26 cães (20 cães sensíveis aos extratos de ácaros e 6 cães normais) foram obtidos a partir de amostras de sangue coletadas por venopuntura (veia cefálica ou jugular). Após coleta, o sangue foi mantido à temperatura ambiente por 30 minutos. Após a coagulação o soro foi separado por centrifugação em centrífuga analítica a 3.000 rpm. Os soros foram separados em alíquotas de 500 µL e mantidos a -20°C até o momento do uso.

A presença de anticorpos das classes IgG e IgE nos soros dos animais alérgicos e controles foi verificada por ensaios imunoenzimáticos (ELISA indireto e “Immunoblotting”) frente a amostras de extratos alergênicos de *D. farinae* e *B. tropicalis*.

### **3.8. Extratos alergênicos para os ensaios *in vitro***

Extratos alergênicos de *D. farinae* (lote 09PF01276) e *B. tropicalis* (lote 10BB00055), utilizados para a realização dos ensaios imunológicos descritos a seguir, foram produzidos e fornecidos pela FDA ALLERGENIC. Os extratos alergênicos foram filtrados e concentrados através da passagem por célula agitadora (AMICON YM 10, Millipore) com membrana de nitrocelulose capaz de separar proteínas com pesos moleculares acima de 10 kDa (Millipore). Em seguida, realizou-se a dosagem protéica dos extratos pelo método de BRADFORD (1976) com ligeiras modificações, usando soroalbumina bovina (Sigma Chemical Co. EUA) como referência.

Os extratos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida sob condições desnaturantes (SDS-PAGE) para análise de suas constituições protéicas (LAEMMLI, 1970). Resumidamente, os géis de empilhamento e separação utilizados continham 4 e 12% de poliacrilamida, respectivamente. Após a preparação dos géis em unidades verticais, as amostras de extratos foram adicionadas com tampão de amostra (contendo 2% de SDS e 5% de 2-mercaptoethanol), fervidas por 10 minutos, e em seguida aplicadas no gel de empilhamento (10 µg de proteína/poço). Como controle de pesos moleculares foi aplicado 10 µl do padrão de proteínas (Precision Plus Protein Standards Unstained - Bio Rad). Após imersão das unidades numa cuba contendo solução tampão para eletroforese (Tris/Glicina/SDS), uma corrente elétrica de 200 V foi aplicada durante aproximadamente 45 minutos. O equipamento utilizado para este processo foi o Mini-PROTEAN II (Bio Rad). Para visualização das bandas de proteínas dos extratos alergênicos e dos padrões foi utilizado o corante de Coomassie Brilliant Blue a 0,1% (BOLLAG et al., 1996).

### **3.9. Ensaio imunoenzimáticos**

#### **3.9.1. ELISA Indireto**

A pesquisa de anticorpos das classes IgG e IgE nos soros dos animais, específicos para os dois extratos de ácaros utilizados, foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) indireto de acordo com VOLLER & BIDWELL (1986). Amostras contendo 10 µg/mL de proteína de extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis* foram preparadas em PBS (tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,2 contendo NaCl a 0,85%) e 100 µL foram aplicados, em triplicata, aos poços de placa de poliestireno com 96 cavidades de fundo plano (Corning Laboratory Sciences Co. NY, EUA) para sensibilização. Para controle do ensaio, alguns orifícios receberam apenas PBS (100 µL/mL). Após incubação por 60 minutos a 37°C, a placa foi mantida a 4°C por 18 horas. Posteriormente, a placa foi lavada 2x com PBS e incubada com o mesmo tampão contendo 5% de leite desnatado (Molico – Nestlé), 100 µL/poço, por 60 minutos a 37°C para bloqueio. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de 100 µL dos soros caninos na diluição de 1:20 (IgG) ou 1:2 (IgE) em PBS/leite 5%. Após incubação por 120 minutos a 37°C, a placa foi lavada 3x com PBS, e incubada novamente nas mesmas condições com 100 µL/poço de conjugado de IgG de coelho anti-IgG canina marcada com peroxidase (Sigma, molécula total) diluído a 1/2.000 ou IgG de cabra anti-IgE canina marcada com peroxidase (ICL GE-40P) diluído a 1/1.000 em PBS/leite 5%. Após lavagem (4x) com PBS, adicionou-se o substrato [100 µL da solução de 4,0 mg de ortofenilenodiamina (OPD) + 4 µL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a 30% (Sigma Chemical Co. St Louis, EUA) em 10 mL de tampão citrato-fosfato de sódio 0,1 M, pH 5,0]. Após 20 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, a reação foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N (50 µL/poço). A leitura da absorbância foi realizada em leitor de ELISA (Bio Rad Modelo 680) a 492 nm. O resultado para cada soro foi obtido a partir da média das três leituras e depois de descontada a D.O. do respectivo controle.

#### **3.9.2. “Immunoblotting”**

O objetivo desta etapa foi transferir as proteínas separadas pela eletroforese no gel de poliacrilamida-SDS para uma matriz onde pudessem ser detectadas com anticorpo específico marcado com enzima.

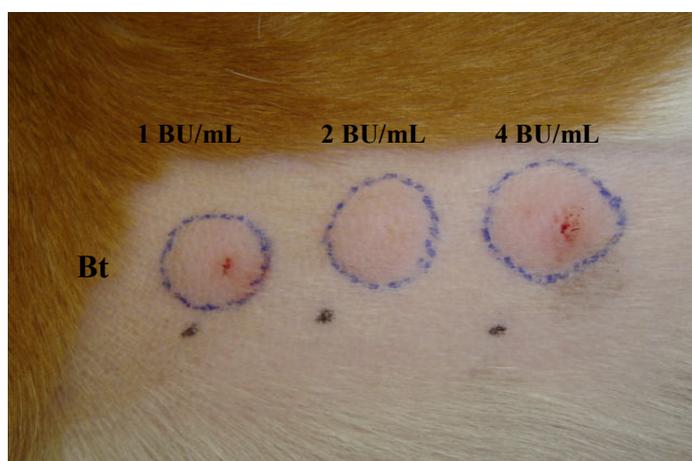
Extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis* foram separados em gel de poliacrilamida a 12% sob condições redutoras e desnaturantes (SDS-PAGE) e então transferidos para uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore). Para isso, o gel foi colocado em contato com a membrana de nitrocelulose e o conjunto montado em cassete de transferência de acordo com a recomendação do fabricante do equipamento (Mini-Trans-Blot, Bio Rad). O tampão de transferência utilizado continha Tris Base 15,6 mM, Glicina 120 mM e 20% de Metanol. Através da aplicação de gradiente de voltagem perpendicular ao gel (100 V durante 1 hora), as proteínas migram do gel para a membrana. A qualidade de transferência foi verificada através da coloração do gel com Comassie (0,1%) e observação da presença dos marcadores coloridos de pesos moleculares (Full Range Rainbow™ Recombinant Protein Molecular Weight Marker, Amersham™) na membrana.

A membrana foi bloqueada com albumina do soro bovino (BSA) a 3% em PBS, durante 1 hora sob agitação, e incubada em um “slot blot manifold” com os soros caninos na diluição de 1:5 em PBS/leite 5%, durante 2 horas sob agitação em temperatura ambiente. Após lavagem com PBS/Tween 20 (0,1%), a membrana foi incubada em temperatura ambiente durante 1 hora com conjugado anti-IgG canina marcada com peroxidase (Sigma, molécula total) na diluição de 1:2000 ou anti-IgE canina marcado com peroxidase (ICL GE-40P) na diluição de 1:1000 em PBS/leite 5% e, finalmente, após lavagem com PBS/Tween 20 (0,1%), adicionadas com substrato luminol (ECL plus Western Blotting Detection System, Amersham Biosciences) e reveladas com scanner (Storm, Molecular Dynamics, Amersham Pharmacia Biotech).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Testes intradérmicos com extratos alergênicos de ácaros em cães

A reação cutânea observada com os testes intradérmicos em cães é uma pápula, que alcança tamanho máximo entre 12 e 17 minutos após às injeções (REEDY, et al., 1997). Na Figura 2 são mostradas as reações cutâneas típicas de animais que receberam injeções intradérmicas de extratos de ácaros em três diferentes concentrações (1, 2 e 4 BU/mL), observadas 15 minutos após a inoculação dos extratos. Como pode ser observado, o diâmetro do halo de reação aumenta de acordo com a concentração dos extratos injetados.



**Figura 2.** Reações cutâneas observadas em cão alérgico após inoculação intradérmica de extrato de *B. tropicalis* (Bt). As áreas demarcadas correspondem às diferentes concentrações, em Unidades Biológicas por mililitro (BU/mL), do extrato inoculado.

Na Tabela 3 são mostrados os diâmetros dos halos das reações produzidas pela inoculação intradérmica dos extratos alergênicos de *D. farinae* e *B. tropicalis* em onze animais sensíveis. Como pode ser observado, o diâmetro do halo é proporcional à concentração (BU/mL) do extrato alergênico injetado.

### 4.2. Estatística descritiva dos diâmetros das reações obtidas com cada uma das concentrações de extrato alergênico de *D. farinae* e *B. tropicalis* e com o fosfato de histamina a 0,01%.

A média  $\pm$  1 desvio padrão das reações para cada uma das concentrações dos extratos alergênicos de *D. farinae* (1 BU/mL, 2 BU/mL e 4 BU/mL) foi de  $13,88 \pm 2,15$ ,  $15,19 \pm 2,55$  e  $16,63 \pm 2,1$  mm, respectivamente. Na tabela 4 são mostrados todos os dados desta estatística descritiva.

A média  $\pm$  1 desvio padrão das reações para cada uma das concentrações dos extratos alergênicos de *B. tropicalis* (1 BU/mL, 2 BU/mL e 4 BU/mL) foi de  $13,25 \pm 5,51$ ,  $14,6 \pm 6,71$  e  $15,65 \pm 8,25$  mm, respectivamente. Na tabela 5 são mostrados todos os dados desta estatística descritiva.

A média  $\pm$  1 desvio padrão das reações provocadas pela histamina a 0,01 % foi de  $20,25 \pm 2,82$  mm e  $19,6 \pm 6,71$  mm para cães sensíveis aos extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis*, respectivamente. Na tabela 4 e 5 são apresentados todos os dados desta estatística descritiva.

**Tabela 3.** Reações cutâneas em cães inoculados com extratos de corpo total de ácaros (*D. farinae* e *B. tropicalis*) e controle positivo, observadas após 15 min de aplicação e expressas em milímetros.

| n° cão | CP <sup>a</sup> | <i>D. farinae</i>    |         |         | <i>B. tropicalis</i> |         |         |
|--------|-----------------|----------------------|---------|---------|----------------------|---------|---------|
|        |                 | 1 BU/mL <sup>b</sup> | 2 BU/mL | 4 BU/mL | 1 BU/mL              | 2 BU/mL | 4 BU/mL |
| 1      | 18              | 12,5                 | 13      | 14,5    | 10                   | 11      | 12,5    |
| 2      | 18              | NT <sup>d</sup>      | NT      | NT      | 12,5                 | 13,5    | 14,5    |
| 3      | 21              | 11                   | 11      | 13,5    | 10,5                 | 11      | 12      |
| 4      | 18              | 12                   | 15      | 16      | 14,5                 | 15,5    | 16      |
| 5      | 25              | 14                   | 14,5    | 17      | 14                   | 18,5    | 19      |
| 6      | 23              | NT                   | NT      | NT      | 12                   | 14      | 15,5    |
| 7      | 18              | 14,5                 | 15,5    | 17      | 15                   | 16      | 17,5    |
| 8      | 19              | 15                   | 16      | 17      | 17,5                 | 18      | 19      |
| 9      | 17              | NT                   | NT      | NT      | 11,5                 | 13      | 13,5    |
| 10     | 19              | 14                   | 17      | 17,5    | 15                   | 15,5    | 17      |
| 11     | 24              | 18                   | 19,5    | 20,5    | NT                   | NT      | NT      |

a) CP – controle positivo (solução de fosfato de histamina a 0,01%).

b) BU/mL – unidades biológicas por mililitro.

c) NT – não testado

**Tabela 4.** Análise estatística dos resultados das reações cutâneas (milímetros) de 8 cães inoculados com diferentes concentrações de extrato de corpo total de *D. farinae*.

| Dados estatísticos                  | 1 BU/mL <sup>a</sup> | 2 BU/mL | 4 BU/mL | CP <sup>b</sup> |
|-------------------------------------|----------------------|---------|---------|-----------------|
| Média                               | 13,88                | 15,19   | 16,63   | 20,25           |
| Intervalo de confiança superior 95% | 15,6                 | 17,23   | 18,31   | 22,51           |
| Intervalo de confiança inferior 95% | 12,16                | 13,15   | 14,95   | 17,99           |
| Desvio padrão                       | 2,15                 | 2,55    | 2,1     | 2,82            |
| Mediana                             | 14                   | 15,25   | 17      | 19              |
| Primeiro quartil                    | 12,25                | 13,75   | 15,25   | 18              |
| Terceiro quartil                    | 14,75                | 16,5    | 17,25   | 22,5            |

a) BU/mL – Unidades Biológicas por mililitro.

b) CP – Controle Positivo (fosfato de histamina a 0,01%)

**Tabela 5.** Análise estatística dos resultados das reações cutâneas (milímetros) de 10 cães inoculados com diferentes concentrações de extrato de corpo total de *B. tropicalis*.

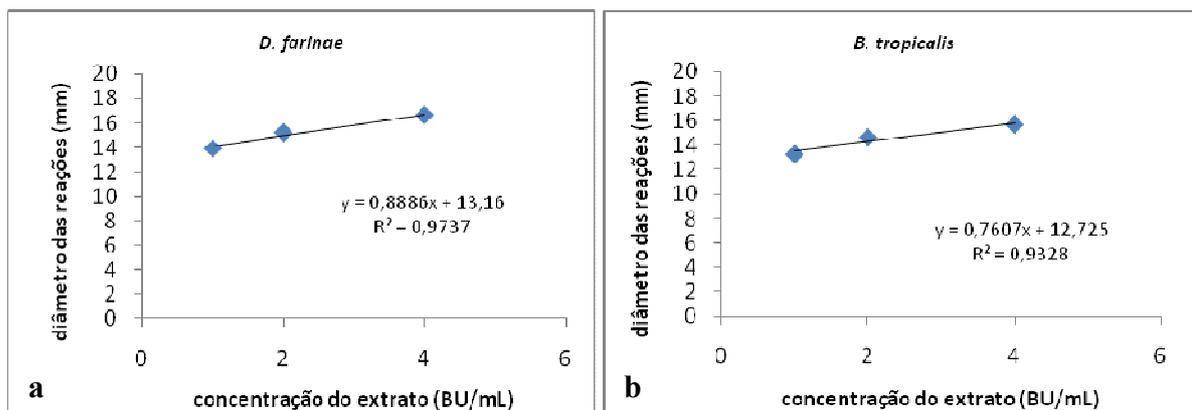
| Dados estatísticos                  | 1 BU/mL <sup>a</sup> | 2 BU/mL | 4 BU/mL | CP <sup>b</sup> |
|-------------------------------------|----------------------|---------|---------|-----------------|
| Média                               | 13,25                | 14,6    | 15,65   | 19,6            |
| Intervalo de confiança superior 95% | 17,19                | 19,4    | 21,55   | 24,39           |
| Intervalo de confiança inferior 95% | 9,31                 | 9,8     | 9,75    | 14,81           |
| Desvio padrão                       | 5,51                 | 6,71    | 8,25    | 6,71            |
| Mediana                             | 13,25                | 14,75   | 15,75   | 18,5            |
| Primeiro quartil                    | 11,62                | 13,12   | 13,75   | 18              |
| Terceiro quartil                    | 14,87                | 15,87   | 17,37   | 20,5            |

a) BU/mL – Unidades Biológicas por mililitro.

b) CP – Controle Positivo (fosfato de histamina a 0,01%)

### 4.3. Bioensaio dose-resposta: reta de regressão

Na Figura 3 estão apresentadas as retas de regressão, a equação das retas e suas constantes, calculadas a partir das médias das reações obtidas, em milímetros, com as três concentrações do extrato de *D. farinae* e *B. tropicalis*. As constantes das retas de regressão foram calculadas pela planilha de cálculos Microsoft Excel. A reta de regressão está representada da seguinte forma: (diâmetro da reação) = a + b (concentração do extrato).



**Figura 3.** Bioensaio dose-resposta realizado em cães com extratos de *D. farinae* (a) e *B. tropicalis* (b).

### 4.4. Cálculo das concentrações dos extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis* capazes de provocar uma reação com o mesmo diâmetro da reação provocada pelo fosfato de histamina a 0,01%.

Levando-se em consideração que a média dos diâmetros das reações provocadas pela histamina a 0,01% em cães sensíveis ao extrato de *D. farinae* foi de 20,25 mm e a equação da reta apresentada na figura 3a temos:  $20,25 = 0,8886x + 13,16$ . Então  $x = 7,98$  BU/mL.

Logo, a potência biológica em BU do extrato alergênico de *D. farinae* estudado equivalentes a 1 HEID (Histamine Equivalent Intradermal Testing) ou 10.000 CBU/mL é de 7,98 BU/mL.

Levando-se em consideração que a média dos diâmetros das reações provocadas pela histamina a 0,01% em cães sensíveis ao extrato de *B. tropicalis* foi de 19,6 mm e a equação da reta apresentada na figura 3b temos:  $19,6 = 0,7607x + 12,725$ . Então  $x = 9,04$  BU/mL.

Logo, a potência biológica em BU do extrato alergênico de *B. tropicalis* estudado equivalentes a 1 HEID (Histamine Equivalent Intradermal Testing) ou 10.000 CBU/mL é de 9,04 BU/mL.

#### **4.5. Cálculo das concentrações dos extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis* capazes de provocar uma reação de 14 mm.**

Levando-se em consideração a equação da reta apresentada na figura 3a temos:  
 $14 = 0,8886 x + 13,16$ . Então  $x = 0,95$  BU/mL.

Logo, a potência biológica em BU do extrato alergênico de *D. farinae* estudado equivalentes a 10.000 CBU/mL é de 0,95 BU/mL.

Levando-se em consideração a equação da reta apresentada na figura 3b temos:  
 $14 = 0,7607 x + 12,725$ . Então  $x = 1,68$  BU/mL.

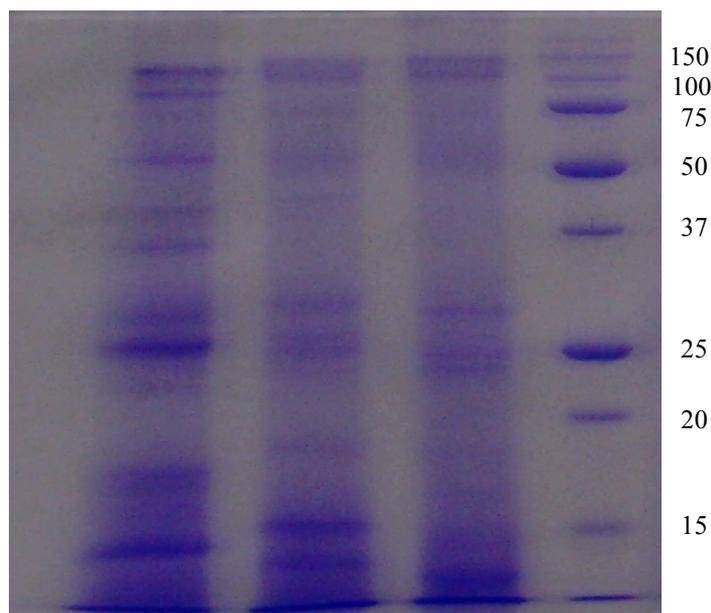
Logo, a potência biológica em BU do extrato alergênico de *B. tropicalis* estudado equivalentes a 10.000 CBU/mL é de 1,68 BU/mL.

#### **4.6. SDS-PAGE dos extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis***

As SDS-PAGE realizadas com os extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis* são apresentadas na Figura 4. Foram identificadas 8 bandas nítidas no extrato de *D. farinae* sob condições redutoras. Em ordem crescente, essas bandas se concentram nas seguintes regiões: aproximadamente 15 kDa; entre 15 e 20 kDa; duas com aproximadamente 25 kDa; duas com aproximadamente 37 kDa; aproximadamente 50 kDa; aproximadamente 100 kDa; e acima de 100 kDa.

Não foram observadas mudanças significativas no padrão de bandas protéicas encontradas nos extratos de *B. tropicalis* sob condições redutoras e não redutoras (Figura 4). Neste extrato foram identificadas ao menos 9 bandas que se concentram, em ordem crescente, nas seguintes regiões: menos de 15 kDa; aproximadamente 15 kDa; entre 15 e 20 kDa; duas bandas com aproximadamente 25 kDa; acima de 25 kDa; aproximadamente 50 kDa; aproximadamente 100 kDa; e entre 100 e 150 kDa.

Df (R)      Bt (R)      Bt (NR)      PM (kDa)



**Figura 4.** SDS-PAGE de extratos de *D. farinae* (Df) e *B. tropicalis* (Bt) sob condições redutoras (R) e não redutoras (NR). PM - Padrão de pesos moleculares.

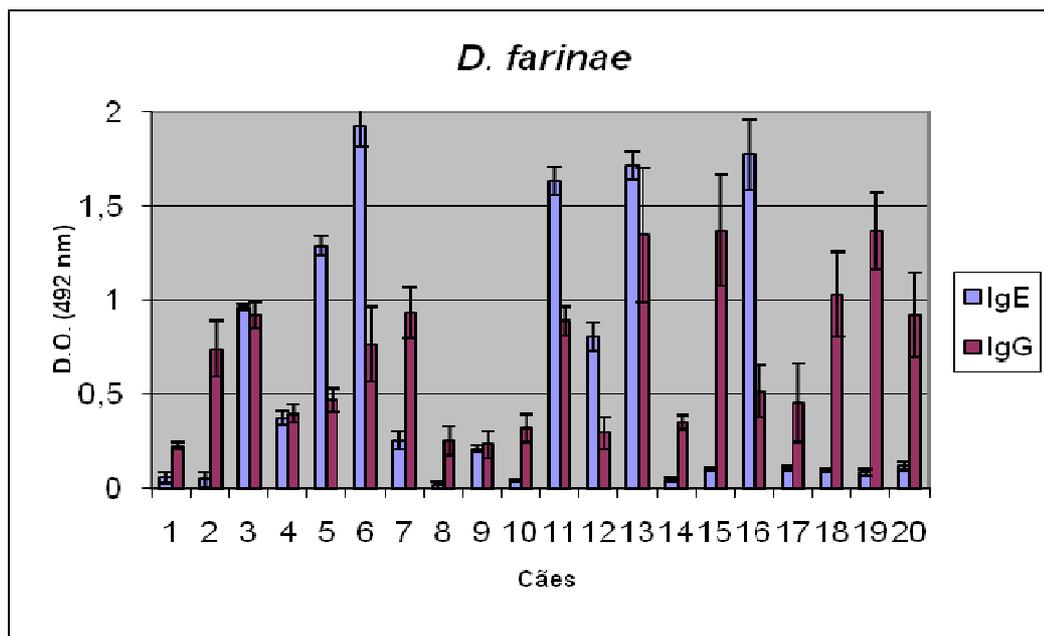
## 4.7. ELISA Indireto

### 4.7.1. Extrato de *D. farinae*

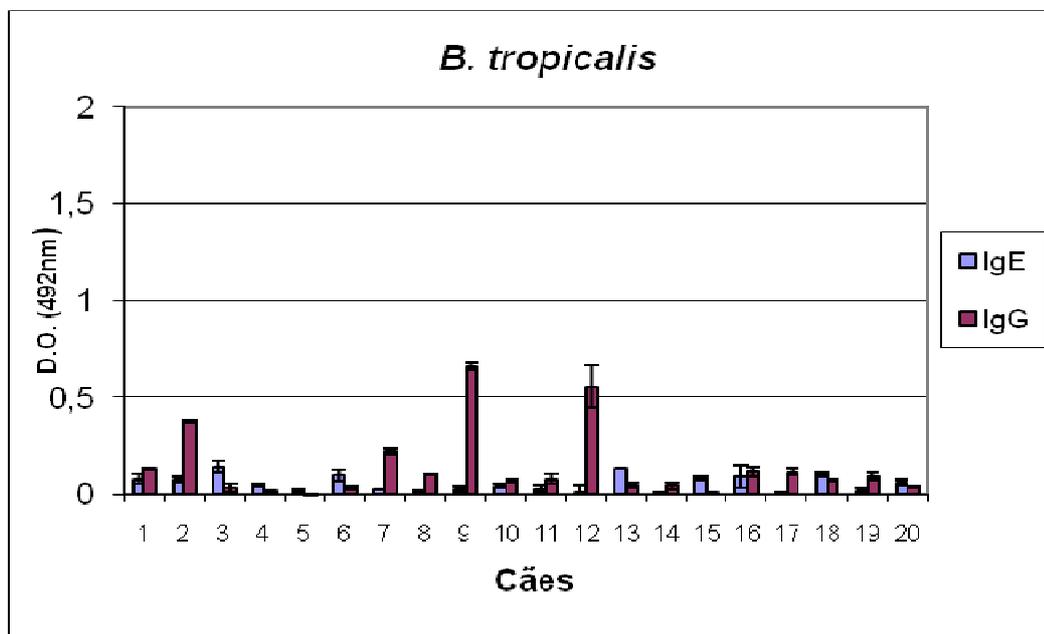
As densidades óticas (D.O.) obtidas nos ensaios imunoenzimáticos para detecção de IgG e IgE alérgeno-específicas com os soros de 15 cães alérgicos ao extrato de *D. farinae* e 5 cães normais são apresentadas na Figura 5. Os soros de cães alérgicos ao extrato de *D. farinae* (1 a 15) apresentaram valores de D.O. para IgE alérgeno-específica elevadas em relação aos valores obtidos com os soros de cães normais (16 a 20). Todos os soros testados apresentaram valores de D.O. para IgG alérgeno-específica elevados.

### 4.7.2. Extrato de *B. tropicalis*

As densidades óticas (D.O.) obtidas nos ensaios imunoenzimáticos para detecção de IgG e IgE alérgeno-específicas obtidas com os soros de 15 cães alérgicos ao extrato de *B. tropicalis* e 5 cães normais são apresentadas na Figura 6. Dos 15 soros de cães sensíveis ao extrato de *B. tropicalis* (1 a 15) e 5 soros de cães do grupo controle (16 a 20), nenhum apresentou valores de D.O. para IgE alérgeno-específica elevadas a este extrato. Apenas 4 cães do grupo alérgico apresentaram valores de D.O. para IgG alérgeno-específica elevados.



**Figura 5.** D.O. (492 nm; média de 3 leituras) obtidas com soros de 15 cães alérgicos ao extrato de *D. farinae* (1 a 15) e 5 cães normais (16 a 20).

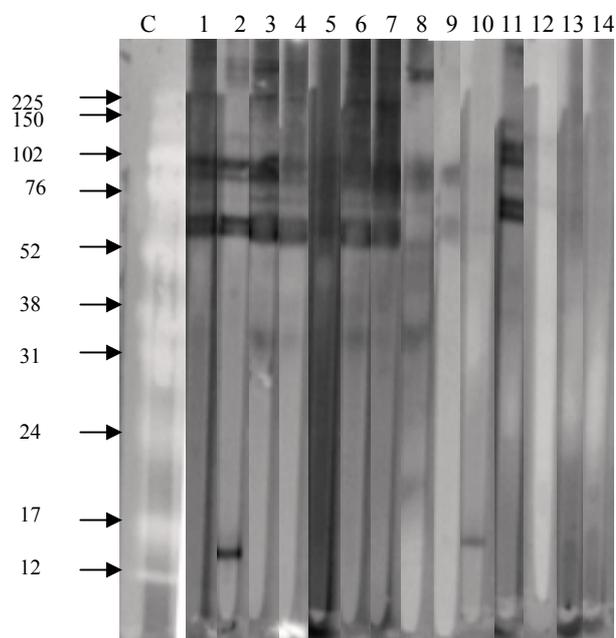


**Figura 6.** D.O. (492nm; média de 3 leituras) obtidas com soros de 15 cães alérgicos ao extrato de *B. tropicalis* (1 a 15) e 5 cães normais (16 a 20).

#### 4.8. “Immunoblotting”

#### 4.8.1. Extrato de *D. farinae*

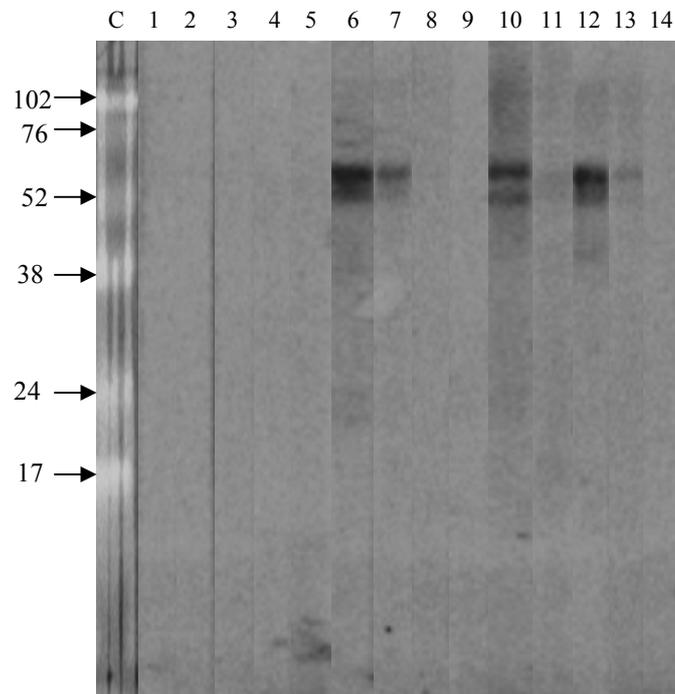
Dos dez soros de cães alérgicos a *D. farinae* testados com conjugado anti-IgE canina, oito reconheceram duas bandas com pesos moleculares em torno de 102 kDa. Oito soros reconheceram duas bandas com pesos moleculares entre 52 e 76 kDa. Sete soros identificaram duas bandas com pesos moleculares acima de 225 kD. Cinco soros reconheceram uma banda com aproximadamente 76 kDa. Cinco soros reconheceram uma banda com aproximadamente 225 kDa. Quatro soros identificaram uma banda com peso molecular entre 31 e 38 kD e dois soros identificaram uma banda com peso molecular entre 12 e 17 kDa. Dos 4 soros de cães normais testados apenas um reconheceu bandas com os seguintes pesos moleculares: duas bandas entre 52 e 76 kDa; aproximadamente 76 kDa; duas bandas entre 76 e 102 kDa; e pelo menos uma banda com peso molecular superior a 225 kDa (Figura 7).



**Figura 7.** Immunoblotting (anti-IgE) realizado com extrato de *D. farinae* e com soros de 10 cães alérgicos a *D. farinae* (1 a 10) e 4 cães normais (11 a 14). C – Controles de peso moleculares (kDa).

#### 4.8.2. Extrato de *B. tropicalis*

Dos 10 soros de cães sensíveis ao extrato de *B. tropicalis*, 5 (50%) reconheceram duas bandas com pesos moleculares entre 52 e 76 kDa. Nenhum dos 4 soros de cães normais reconheceu qualquer proteína deste extrato (Figura 8).



**Figura 8.** Immunoblotting (anti-IgE) realizado com extrato de *B. tropicalis*. e com soros de 4 cães normais (1 a 4) e 10 cães sensíveis a *B. tropicalis* (5 a 14). C – Controles de pesos moleculares (kDa).

A tabela 5 apresenta uma síntese de todos os resultados de testes *in vivo* e *in vitro* obtidos em cães alérgicos e controles.

**Tabela 5.** Análise comparativa dos testes *in vivo* (Intradérmicos) e *in vitro* (ELISA e “Immunoblotting”) de alérgenos de ácaros em cães alérgicos (1 a 20) e controles (21 a 26).

| Cães | Teste ID(a) | E(b) Df IgE | E Df IgG | E Bt IgE | E Bt IgG | I(c) Df IgE | I Bt IgE |
|------|-------------|-------------|----------|----------|----------|-------------|----------|
| 1    | Df, Bt      | 0,057       | 0,225    | 0,042    | 0,036    | NT          | -        |
| 2    | Df          | 0,046       | 0,74     | NT       | NT       | NT          | NT       |
| 3    | Df, Bt      | 0,962       | 0,917    | 0,077    | 0,092    | +           | -        |
| 4    | Df          | 0,369       | 0,389    | NT       | NT       | +           | NT       |
| 5    | Df, Bt      | 1,286       | 0,466    | 0,02     | 0,037    | +           | +        |
| 6    | Bt          | NT          | NT       | 0,027    | 0,537    | NT          | +        |
| 7    | Df, Bt      | 0,255       | 0,932    | 0,054    | 0,298    | +           | -        |
| 8    | Df, Bt      | 0,018       | 0,252    | 0,018    | 0,065    | NT          | NT       |
| 9    | Df, Bt      | 1,919       | 0,754    | NT       | 0,056    | +           | -        |
| 10   | Df          | 0,21        | 0,233    | NT       | NT       | -           | NT       |
| 11   | Df, Bt      | 0,04        | 0,319    | 0,007    | NT       | NT          | NT       |
| 12   | Df, Bt      | 1,633       | 0,886    | 0,02     | 0,014    | +           | +        |
| 13   | Df, Bt      | 0,805       | 0,294    | 0,039    | 0        | +           | +        |
| 14   | Df, Bt      | 1,712       | 1,342    | NT       | NT       | +           | NT       |
| 15   | Df, Bt      | 0,044       | 0,348    | 0,093    | NT       | NT          | NT       |
| 16   | Df, Bt      | NT          | NT       | 0,097    | 0,021    | NT          | +        |
| 17   | Df, Bt      | NT          | NT       | 0,048    | 0,201    | NT          | -        |
| 18   | Df, Bt      | NT          | NT       | 0,041    | 0,07     | NT          | -        |
| 19   | Bt          | NT          | NT       | 0,069    | 0,436    | NT          | NT       |
| 20   | Df, Bt      | NT          | NT       | NT       | 0,041    | NT          | NT       |
| 21   | Negativo    | 0,104       | 1,368    | 0,05     | 0,117    | -           | -        |
| 22   | Negativo    | 0,107       | 0,454    | 0,062    | 0,049    | NT          | NT       |
| 23   | Negativo    | 0,093       | 1,029    | 0,015    | 0,091    | -           | -        |
| 24   | Negativo    | 0,083       | 1,366    | 0,032    | 0,112    | -           | -        |
| 25   | Negativo    | 0,116       | 0,917    | 0,07     | 0,08     | -           | -        |
| 26   | Negativo    | 1,77        | 0,517    | 0,108    | 0,008    | +           | NT       |

a) Teste intradérmico positivo ou negativo para ácaros:

Df – *Dermatophagoides farinae*

Bt – *Blomia tropicalis*

b) Densidade óptica (D.O. – 492 nm; média de 3 determinações) nos testes ELISA para detecção de IgE e IgG anti Df e Bt.

c) Immunoblotting para detecção de alérgenos de Df e Bt por anticorpos da classe IgE.

d) NT – não testado

## 5. DISCUSSÃO

Extratos alergênicos de origem animal e vegetal são utilizados para diagnóstico e tratamento de doenças alérgicas. Com a padronização desses extratos é possível fornecer ao clínico conhecimento sobre a atividade biológica e composição de alérgenos do material que está usando. Este conhecimento é essencial para o diagnóstico correto e para imunoterapia alérgeno-específica segura e eficaz. Contudo, devido à complexidade dos processos de padronização de extratos alergênicos e questões éticas, a metodologia utilizada no presente estudo não é indicada para cada novo lote de extrato produzido ou adquirido para uso clínico. A idéia é a obtenção de conhecimentos sobre a composição e potência de um único extrato de uma determinada espécie, e a partir destes conhecimentos, comparar e calibrar os novos lotes produzidos, utilizando apenas métodos *in vitro*, como o SDS-PAGE ou focalização isoelétrica e o RAST de inibição ou ELISA de competição, respectivamente. Este extrato é então chamado de Extrato Referência e na Europa denominado de In House Reference Preparation (IHRP). Nos EUA, os Extratos Referência são desenvolvidos e fornecidos para as empresas fabricantes de extratos alergênicos pelo Food and Drug Administration (FDA) e pelo Center for Biologics Evaluation & Research (CBER). No Brasil, eles podem ser desenvolvidos pelas empresas produtoras de extratos alergênicos e são chamados de Produto Padrão Interno de Referência (PPIR). O presente trabalho avaliou dois métodos de determinação de atividade biológica de extratos alergênicos de ácaros da poeira domiciliar assim como identificou alérgenos candidatos para diagnóstico e imunoterapia alérgeno-específica para a espécie canina. Portanto, a metodologia empregada e as unidades biológicas propostas (HEID e CBU/mL) podem ser utilizadas para o desenvolvimento de Extratos Referência para uso veterinário.

Os resultados obtidos com os dois métodos de padronização biológica testados foram muito discordantes. Enquanto que com o método que utilizou o fosfato de histamina como referência seriam necessários 7,98 BU/mL de extrato de *D. farinae* e 9,04 BU/mL de extrato de *B. tropicalis* para termos um extrato com 10.000 CBU/mL, com o método que não utilizou nenhum controle como referência seriam necessários apenas 0,95 e 1,68 CBU/mL de extrato de *D. farinae* e *B. tropicalis*, respectivamente. Isso se deve ao elevado diâmetro médio provocado pela histamina a 0,01%, que foi de 20,25 mm no grupo sensível à *D. farinae* e 19,6 mm no grupo sensível à *B. tropicalis*. É muito provável que extratos com 7,98 ou 9,04 BU/mL, conforme calculado pelo primeiro método, se tornem irritativos, isto é, capazes de provocar reações falso-positivas.

A escolha da concentração de histamina utilizada no presente estudo foi baseada em estudo prévio que comparou as duas concentrações de histamina mais utilizadas para testes intradérmicos em cães. No estudo realizado por HENSEL et al. (2004), o diâmetro médio das reações provocadas pela histamina a 0,01% e a 0,001% foi de 14 mm (variação de 11 a 18) e 11,6 mm (variação de 9 a 14), respectivamente. Essa diferença de tamanho das reações provocada pela histamina a 0,01%, observada entre o presente estudo e o citado anteriormente, pode ser explicada pelo estado de sensibilização prévia dos cães testados, conforme sugerido para seres humanos (MALLING, 1984). Enquanto no trabalho de HENSEL et al. (2004) foram utilizados cães saudáveis e sem histórico de doenças cutâneas pruriginosas, no presente estudo foram testados cães com dermatite atópica sensíveis a ácaros domésticos. Segundo MALLING (1984), o tamanho das reações cutâneas provocadas pela histamina é dependente do estado de sensibilização dos pacientes, isso é, se o indivíduo testado é normal, pouco alérgico ou muito alérgico.

Além do estado de sensibilização, existem outros fatores que podem influenciar negativamente na utilização da histamina como referência para padronização de extratos alergênicos: a histamina não é o único mediador das reações alérgicas (CASALE et al., 1984); ela induz uma resposta máxima cutânea em tempos diferentes dos alérgenos (VOORHORST

1980); existe uma grande variabilidade de resposta à histamina, especialmente quando está em baixas concentrações (TAUDORF et al., 1985); e não há uma boa correlação com os alérgenos quando se aumenta a dose de ambos (MALLING, 1984). Além disso, no estudo realizado por CUNHA & FACCINI (2009), os diâmetros das reações provocadas pela histamina a 0,01% variou significativamente em função do peso corporal dos cães.

O uso da histamina como referência tem como objetivo minimizar a influência de erros de técnica durante os testes (DREBORG, 1989). Considera-se que em casos de variações na técnica, tanto os controles como os extratos seriam igualmente afetados. No entanto, a técnica mais utilizada para diagnóstico cutâneo em seres humanos é o “prick test”, que é sujeita a mais variações que o teste intradérmico utilizado em cães (SCOTT et al., 2001). No “prick test” a punção pode ser feita com puntores de diferentes tamanhos, formatos e materiais. A pressão aplicada nos puntores também pode variar significativamente entre médicos, assim como a quantidade de extrato absorvida pela epiderme. Como a técnica utilizada para padronização biológica de extratos alergênicos em cães neste estudo foi a intradérmica, a utilização de um controle positivo como referência pode ser desnecessária.

Com o método de avaliação da atividade biológica dos extratos que não usou a histamina como referência, apenas pequenos ajustes nas concentrações dos extratos seriam suficientes para induzir reações de 14 mm de diâmetro, conforme sugerido por HENSEL et al. (2004). Este sistema de quantificação de atividade biológica expressa de forma direta a atividade biológica como tal, e é facilmente compreendido pelo clínico. A unidade usada (CBU/mL) tem o mesmo significado para todos os alérgenos e pode ser usada como guia para a seleção de concentrações ótimas que expressem a quantidade total de alérgenos ativos biologicamente durante imunoterapia alérgeno-específica.

Até o momento já foram identificados mais de 70 alérgenos de ácaros da poeira domiciliar reconhecidos pelos soros da espécie humana (COLLOFF, 2009), porém, apenas alguns poucos alérgenos foram identificados para a espécie canina. Os mais importantes são: Der p 1 (25 kDa) e Der p 2 (14 kDa) de *D. pteronyssinus*, e Der f 1 (25 kDa), Der f 2 (14 kDa), Der f 10 (37 kDa), Der f 15 (98 kDa) e Der f 18 (60 kDa) de *D. farinae* (NOLI et al., 1996; McCALL et al., 2001; WEBER et al., 2003).

Os resultados do “immunoblotting” do presente trabalho, utilizado para detecção de antígenos de *D. farinae* reconhecidos por anticorpos da classe IgE, indicaram reconhecimento de pelo menos 12 bandas, com pesos moleculares variando entre 14 e mais de 225 kDa (figura 7). Soros de 8 (80%) cães atópicos identificaram duas bandas com pesos moleculares em torno de 102 kDa (figura 7). Duas proteínas, uma de 98 kDa e outra de 109 kDa, foram identificadas pela maioria dos soros de cães atópicos nos estudos realizados por LEUNG (2000) e McCALL et al. (2001). As sequências N-terminal dessas duas proteínas foram idênticas e o sequenciamento de peptídeos internos revelou homologia com quitinases de insetos (McCALL et al., 2001). Estes alérgenos foram detectados com igual frequência em “immunoblottings” sob condições redutoras e não redutoras, sugerindo serem relativamente resistentes à redução (LEUNG, 2000). A proteína de 98 kDa foi clonada e chamada de Der f 15 (McCALL et al., 2001) e todos os cães experimentalmente sensibilizados neste estudo apresentaram testes intradérmicos positivos ao extrato bruto de *D. farinae* e Der f 15 purificado. Além disso, de 41 cães atópicos com sorologia positiva a *D. farinae* neste estudo, 40 eram também positivos para Der f 15. O estudo imunohistoquímico demonstrou que Der f 15 está localizado no intestino dos ácaros, embora não em péletes fecais (McCALL, et al., 2001). Parece, portanto, tratar-se de uma enzima digestiva ao invés de estar envolvido com a formação do exoesqueleto do ácaro.

Soros de 8 (80%) cães atópicos reconheceram duas bandas entre 52 e 76 kDa (figura 7). Uma proteína de 60 kDa de *D. farinae*, chamada Der f 18, já foi identificada como alérgeno principal para seres humanos e cães. Ela é uma proteína glicosilada com 437 aminoácidos e

com um peso molecular nativo de 50 kDa. Der f 18 purificado foi identificado por 57 a 77% dos soros de cães sensibilizados com *D. farinae* no estudo realizado por WEBER et al. (2003). Der f 18 é homólogo às quitinases de insetos e, como Der f 15, foi localizado no sistema digestivo dos ácaros, mas não nos péletes fecais. Este alérgeno foi reconhecido por 85% dos soros de cães atópicos no estudo realizado por McCALL et al. (2001).

Soros de 7 (70%) cães atópicos reconheceram duas bandas com mais de 225 kDa. Pelo menos 5 (50%) soros de cães atópicos identificaram uma banda com peso molecular de aproximadamente 75 kDa e cinco (50%) uma banda com aproximadamente de 225 kDa (Figura 7). Essas bandas não foram citadas em estudos prévios que avaliaram o padrão de reconhecimento de soros de cães atópicos. Possíveis explicações para a identificação desses alérgenos no presente estudo seriam um padrão de reconhecimento de antígenos característico de cães brasileiros ou mesmo a ausência desses antígenos nos extratos alergênicos utilizados nos estudos anteriores.

Soros de quatro (40%) cães atópicos reconheceram uma banda com peso molecular entre 31 e 38 kDa (figura 7). No estudo realizado por McCALL et al. (2001), uma proteína de 37 kDa foi identificada em extrato de *D. farinae* e denominada de Der f 10. Neste estudo, 29% dos cães atópicos reconheceram esta banda e, portanto, assim como no presente trabalho, foi considerada como um alérgeno menor.

Dois soros do grupo de cães atópicos identificaram um alérgeno de baixo peso molecular, neste caso uma banda de aproximadamente 14 kDa (figura 7). Possivelmente, trata-se de Der f 2, um polipeptídeo com 129 aminoácidos e 14 kDa (O'HEHIR et al., 1993). Nenhum soro do grupo dos atópicos reconheceu Der f 1, um alérgeno principal para seres humanos e com peso molecular de 24 kDa. Alérgenos dos grupos 1 e 2 são abundantes e estáveis. Eles representam até 10% e 3% dos extratos de proteína de ácaros da poeira domiciliar, respectivamente, mas aproximadamente 20% das proteínas de péletes fecais, equivalente a 0,1 ng por pélete (SCHULZ, et al., 1999). Em estudos iniciais, 90% dos cães atópicos apresentaram testes cutâneos positivos e IgGd específicos no soro a extratos brutos de *D. farinae*, mas não a alérgenos purificados dos grupos 1 e 2, embora 2/5 dos soros de cães atópicos reconheceram Der f 1 e Der f 2 nos ELISAs (NOLI et al., 1996). No trabalho realizado por McCALL et al. (2001), bandas de baixo peso molecular, como as dos grupos 1 e 2 de alérgenos, tiveram uma baixa frequência de reconhecimento. No estudo realizado por NUTTAL et al. (2001b), menos de 10% dos soros de cães atópicos identificaram alérgenos dos grupos 1 e 2. Outro estudo demonstrou que extratos de Der f 1 e Der f 2 que induziam testes cutâneos positivos ligavam IgGd nos ELISAs mas não nos "immunoblottings" (NOLI et al., 1996). No estudo japonês realizado por MASUDA et al. (2000), por outro lado, quatro dentre seis cães apresentaram testes intradérmicos positivos com alérgenos purificados dos grupos 1 e 2 de *Dermatophagoides*. No ELISA realizado com anti-IgE canina, IgE específica a esses alérgenos foi detectada nos soros de três dentre quatro cães positivos no teste intradérmico. O autor também encontrou que 44% dos soros reconheceram Der f 1 e Der f 2 em ELISAs e dot blots com anti-IgE canina monoclonal. Estes resultados sugerem que possa haver um padrão de reconhecimento de alérgenos diferente entre cães japoneses e cães americanos ou europeus. Os resultados do presente estudo indicam que alérgenos de baixo peso molecular, como Der f 2, são alérgenos secundários para cães com dermatite atópica, corroborando os resultados obtidos nos estudos europeus e americanos.

Apenas um soro do grupo controle reconheceu bandas de proteínas no "immunoblotting" realizado com anticorpo secundário anti-IgE canina e extrato de *D. farinae*. Este soro reconheceu bandas com os seguintes pesos moleculares: duas bandas entre 52 e 76 kDa; uma banda com aproximadamente 76 kDa; duas bandas entre 76 e 102 kDa; e pelo menos uma banda com peso molecular superior a 225 kDa (Figura 7). Este soro também apresentou títulos elevados de IgE alérgeno-específica no ELISA. É possível que este soro

tenha sido obtido de um cão com hipersensibilidade subclínica e que tenha apresentado resultado de teste intradérmico negativo devido à produção endógena aumentada de glicocorticóide no momento do teste. Outra possível explicação para estes achados é a hipótese da heterogeneidade da IgE, conforme proposto por (McDONALD, et al., 1987), onde indivíduos sem sintomatologia alérgica apresentam níveis aumentados de IgE alérgeno-específica. Estes autores sugeriram que existem dois tipos básicos de IgE no homem: IgE+ e IgE-. IgE+ foi definida como sendo moléculas que são capazes de interagir com certos cofatores, chamados de fatores de liberação de histamina (HRF), para induzir a ativação de basófilos. Moléculas IgE- são totalmente capazes de se ligarem aos basófilos, mas não conseguem induzir ativação celular. O desenvolvimento de uma doença alérgica grave estaria relacionado à presença de IgE+. PENG et al. (1997) demonstraram a existência de duas populações de IgE canina, as quais diferem entre si pela carga e afinidade nas técnicas de separação de proteínas.

A importância clínica de alérgenos de *B. tropicalis* para a DAC ainda não está completamente esclarecida. *B. tropicalis* é uma espécie de ácaro de vida livre encontrada em climas tropicais e subtropicais e que, comprovadamente, contribui para a patogênese das doenças atópicas em seres humanos (THOMAS et al., 2003; ZAKZUK et al., 2009). No estudo realizado por ROSA & FLECHTMANN (1979), em que a acarofauna de 72 domínios em diferentes regiões do Brasil foi analisada, *B. tropicalis* esteve presente em 100% das amostras e constituiu 79,5% do número total de ácaros encontrados. Os alérgenos mais importantes para seres humanos são Blo t 3 (CHEONG, N. et al., 2003), Blo t 5 (ARRUDA, K.L. et al., 1997), Blo t 11 (RAMOS, J.D. et al., 2001) e Blo t 12 (PUERTA, L. et al., 1996).

Os resultados do “immunoblotting” realizado no presente estudo com extrato de *B. tropicalis* comprovam que, assim como observado em seres humanos, alérgenos de *B. tropicalis* contribuem para a patogênese das doenças alérgicas em cães. O frequente aparecimento de resultados positivos nos testes intradérmicos com extratos de *B. tropicalis* observado neste estudo associado ao conhecimento de que a maioria dos alérgenos de *B. tropicalis* são espécie-específicos e que não reagem de forma cruzada com alérgenos de ácaros pyroglyphideos, como *D. farinae* e *D. pteronyssinus* (ARLIAN, et al., 1993; CHEW et al., 1999), já sugeriam tal correlação. Dos 10 cães alérgicos sensíveis à *B. tropicalis* testados, 5 (50%) reconheceram duas bandas com pesos moleculares entre 52 e 76 kDa (Figura 8), as quais não foram identificadas pelos 4 soros do grupo controle. Um alérgeno de 56 kDa e denominado Blo t 4, já foi descrito como alérgeno secundário para seres humanos. Blo t 4 possui atividade de  $\alpha$ -amilase e  $\alpha$ -amilases são alérgenos potentes e altamente conservados encontrados em ácaros, fungos e cereais (MILLS et al., 1999). Estudos futuros bioquímicos e/ou moleculares são necessários para que se possa confirmar a verdadeira identidade dos alérgenos de *B. tropicalis* identificados no presente estudo.

Diferentemente do observado com o extrato de *D. farinae*, não foram identificados títulos elevados de IgE alérgeno-específica no ELISA realizado com extrato de *B. tropicalis*. Uma possível explicação para resultados negativos no ELISA e positivos no “immunoblotting” seria a diferença de sensibilidade existente entre as duas técnicas. Enquanto que a técnica de ELISA é capaz de identificar nanogramas de proteínas, o “immunoblotting” é capaz de identificar picogramas (BOLLAG et al., 1996), portanto, com uma sensibilidade bem superior ao ELISA.

As possíveis explicações para a não identificação de alérgenos de *B. tropicalis* nos soros de 5 (50%) cães alérgicos seriam: diagnóstico falso-positivo de alergia aos antígenos testados; erros de técnica; ausência de alérgenos no lote de extrato utilizado no “immunoblotting”; ou mesmo a participação de anticorpos anafiláticos não-IgE na DAC. Anticorpos anafiláticos não-IgE já foram identificados, como IgG4 no homem e porcos da guiné, IgG1 em camundongos, IgG2a em ratos e IgG2 em ovelhas (HOU, et al., 2006). DAY et al. (1996)

sugeriram que IgG1 e IgG4 pudessem participar da patogênese da DAC, dependendo do alérgeno indutor da resposta imune. Utilizando um painel de anticorpos monoclonais direcionados para as quatro subclasses de IgG (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), foi demonstrado que a resposta de IgG para *D. farinae* foi dominada pelas subclasses das IgG4 (HOU et al., 2006).

Apesar de LIAN & HALLIWELL (1998) terem observado títulos correlacionados entre IgE e IgG para *D. farinae* nos ELISAs realizados com soros de cães atópicos e normais, tais achados não foram confirmados no presente estudo. Todos os soros testados (cães alérgicos e controles) com extrato de *D. farinae* possuíam títulos elevados de IgG no ELISA, corroborando os resultados encontrados por HOU et al. (2006). Esses resultados indicam que anticorpos da classe das IgGs representam apenas reconhecimento de proteínas estranhas pelo sistema imune, ao invés de indicar participação na patogênese da DAC. Por outro lado, foi observado no presente estudo uma correlação positiva entre IgE alérgeno-específica para *D. farinae* e resultados dos testes intradérmicos (Tabela 5), corroborando o conhecimento atualmente aceito de que anticorpos da classe das IgEs participam de forma específica da patogênese da DAC.

## 6. CONCLUSÕES

6.1. O método de avaliação da atividade biológica de extratos alergênicos que não utiliza a histamina como referência é mais apropriado que o método que utiliza a histamina como referência. Com isso, são necessários 0,95 BU/mL e 1,68 BU/mL dos extratos de *D. farinae* e *B. tropicalis* (ALK-ABELLÓ, lotes: 07AA0649 e 07AA0652), respectivamente, para provocar uma reação de 14 mm de diâmetro, o que equivale a 10.000 CBU/mL.

6.2. Os ácaros da poeira domiciliar, especificamente *D. farinae* e *B. tropicalis*, contribuem para a patogênese da DAC no Brasil.

6.3. Os soros dos cães estudados reconheceram predominantemente alérgenos de alto peso molecular de *D. farinae*.

6.4. Dois alérgenos de *B. tropicalis*, com pesos moleculares entre 52 e 76 kDa, foram considerados como alérgenos principais para cães com DAC e, conseqüentemente, devem estar presentes nos extratos alergênicos destinados tanto para diagnóstico quanto para imunoterapia alérgeno-específica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AALBERSE, R.C.; van MILLIGEN, F.; TAN, K.Y.; STAPEL, S.O. Allergen-specific IgG4 in atopic disease. *Allergy*, v.48, p.559-569. 1993.

AKDIS et al. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology / American Academy of Allergy, Asthma and Immunology / PRACTALL Consensus Report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.118, n.1, p.152-169. 2006.

ALVAREZ-CUESTA, E.; BOUSQUET, J.; CANONICA, G.W.; DURHAM, S.R.; MALLING, H.-J.; VALOVIRTA, E. Standards for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergy*, v.61, Suppl.82, p.1-20. 2006.

ARLIAN, L.G.; Water balance and humidity requirements of house dust mites. *Experimental and Applied Acarology*, v.16, p.15-35. 1992.

ARLIAN, L.G.; VYSZENSKI-MOHER, D.L.; FERNANDEZ-CALDAS, E. Allergenicity of the mite, *Blomia tropicalis*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.91, n.5, p.1042-1050. 1993.

ARRUDA, L.K.; RIZZO, M.C.; CHAPMAN, M.D.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; BAGGTO, D.; PLATTS-MILLS, T.A.E.; NASPITZ, C.K.; Exposure and sensitization to dust mite allergens among asthmatic children in São Paulo, Brazil. *Clinical and Experimental Allergy*, v.21, n.4, p.433-439. 1991.

ARRUDA, L.K.; VAILES, L.D.; PLATTS-MILLS, T.A.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; MONTEALEGRE, F.; LIN, K.L.; CHUA, K.Y.; RIZZO, M.C.; NASPITZ, C.K.; CHAPMAN, M.D. Sensitization to *Blomia tropicalis* in patients with asthma and identification of allergen Blo t 5. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medical*, v.155, n.1, p.343-350. 1997.

ASS, K.; BACKMAN, A.; BELIN, L.; WEEKW, B. Standardization of allergen extracts with appropriate methods. *Allergy*, v.33, p.130-137. 1978.

AUXILIA, S.T.; HILL, P.B. Mast cell distribution, epidermal thickness and hair follicle density in normal canine skin: possible explanations for the predilection sites of atopic dermatitis? *Veterinary Dermatology*, v.11, p.247-254. 2000.

BAGGIO, D.; AMBROZIO, L.C. Domestic mites in the Brazilian countries. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v.15, A93. 1992.

BAGGIO, D.; AMBROZIO, L.C.; CORDARO, C. Household mites from South American Countries – A review. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v.15, A90. 1992.

BAKER, E. *Small Animal Allergy: A Practical Guide*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1990.

BENNICH, H.; ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T.; JOHANSON, S.G.O. A comparative antigenic study of gamma E-globulin and myeloma-Ig-ND. *Journal of Immunology*, v.102, p.826-831. 1969

BENSIGNOR, E.; CARLOTTI, D.N. Sensitivity patterns to house dust mites and forage mites in atopic dogs: 150 cases. *Veterinary Dermatology*, v.13, p.37-42. 2002.

BINOTTI, R.S.; MUNIZ, J.R.O.; PASCHOAL, I.A.; PRADO, A.P.; OLIVEIRA, C.H.. House dust mites in Brazil – an annotated bibliography. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96, n.8, p.1177-1184. 2001.

BOLLAG, D.M.; ROZYCKI, M.D.; EDELSTEIN, S.J. *Protein Methods*. 2<sup>a</sup> ed. New York: Wiley-Liss, 1996.

BOUSQUET, J.; LOCKEY, R.; MALLING, H.J. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.102, p.558-562. 1998.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.*, v.7, n.72, p.248-254. 1976.

BRIGHTON, W.D.; TOPPING, M.D.; HENOCQ, E. Activity units for allergen extracts. *Allergy*, v.9, p.591-596. 1979.

CALVO, M.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; ARELLANO, P. MARÍN, F.; CARNÉS, J.; HORMAECHEA, A. Mite allergen exposure, sensitization and clinical symptoms in Valdivia, Chile. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, v.15, 189-196. 2005.

CARREIRA, J. *Cuantificación de Alergenos en Unidades de Masa*, Madri: Ed. Alergia e Inmunología Abelló, S.A, 1992.

CASALE, T.B.; SHELHAMMER, J.H.; PRADILLO, J.E.; KALINER, M.A. Dopamine inhibition of histamine mediated cutaneous responses. *Journal of Allergy Clinical and Immunology*, v.73, p.837. 1984.

CHAGAS, K.N.; MUNIZ, J.R.O.; BINOTTI, R.S.; OLIVEIRA, C.H.; CHAGAS, K.D.N.; PRADO, A.P. Primeiro levantamento de ácaros em poeira de casas da cidade de Araguaína – Tocantins. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*, v.23, p.209. 2000.

CHEONG, N.; YANG, L.; LEE, B.W.; CHUA, K.Y. Cloning of a group 3 allergen from *Blomia tropicalis* mites. *Allergy*, v.58, n.4, p.352-356. 2003.

CHESNEY, C.J. Measurement of skin hydration in normal dogs and in dogs with atopy or a scaling dermatosis. *Journal of Small Animal Practice*, v.36, p.305-309. 1995.

CHEW, F.T.; YI, F.C.; CHUA, K.Y.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; ARRUDA, L.K.; CHAPMAN, M.D.; LEE, B.W. Allergenic differences between the domestic mites *Blomia tropicalis* e *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clinical and Experimental Allergy*, v.29, p.982-988. 1999.

COLLOFF, M.J. *Dust mites*. Collingwood: CSIRO, 2009.

CUNHA, V.E.S.; HAHNSTADT, R.L.; SOARES, A.M.B.; FACCINI, J.L.H. Evaluation of skin sensitivity in dogs bearing allergic dermatitis to standardized allergenic extracts of house dust and storage mites. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.27, p.341-344. 2007.

CUNHA, V.E.S.; FACCINI, J.L.H. Use of histamine phosphate for the interpretation of intradermal skin tests in dogs. *Veterinary Record*, v.165, p.723-724. 2009.

DAY, M.J. Expression of major histocompatibility complex class II molecules by dermal inflammatory cells, epidermal langerhans cells and keratinocytes in canine dermatological disease. *Journal of Comparative Pathology*, v.115, p.317-326. 1996.

DAY, M.J.; CORATO, A.; SHAW, S.E. Subclass profile of allergen-specific IgG antibodies in atopic dogs. *Research in Veterinary Science*, v.61, p.136-142. 1996.

DeBOER, D.J.; HILLIER, A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Veterinary Immunology and Immunophatology*, v.81, p.271-276. 2001.

DREBORG, S. Skin tests used for standardization of allergenic preparations. *Allergy*, v.44, suppl.10, p.38-46. 1989.

DREBORG, S. Standardization of allergenic preparations by in vitro and in vivo methods. *Allergy*, v.48, suppl.14, p.63-70. 1993.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. EMEA/CHMP/BWP/304831/2007: Guideline on allergen products: production and quality issues. Londres, 2008.

EZEQUIEL, O.S.; GAZETA, G.S.; AMORIM, M.; FREIRE, N.M.S. Evaluation of the acarofauna of the domiciliary ecosystem in Juiz de Fora, state of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.96, n.7, p.911-916. 2001.

FRANK, L.A.; KUNKLE, G.A.; BEALE, K.M. Comparison of serum cortisol concentration before and after intradermal testing in sedated and nonsedated dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.200, p.507-510. 1992.

HALLIWELL, R.E.W.; SCHWARTZMAN, R.M. Atopic disease in the dog. *Veterinary Records*, v.89: 209-214, 1971.

HENSEL, P.; AUSTEL, M.; MEDLEAU, L.; ZHAO, Y.; VIDYASHANKAR, A. Determination of threshold concentrations of allergen and evaluation of two different histamine concentrations in canine intradermal testing. *Veterinary Dermatology*, v.15, p.304-308. 2004.

HILL, P.B.; HILLIER, A. OLIVRY, T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VI): IgE-induced immediate and late-phase reactions, two inflammatory sequences at sites of intradermal allergen injections. *Veterinary Immunology and Immunophatology*, v.81, p.199-204. 2001.

- HILL, P.B.; DEBOER, D.J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.81, p.169-186. 2001.
- HILL, P.B.; MORIELLO, K.A.; DEBOER, D.J. Concentrations of total serum IgE, IgA e IgG in atopic and parasitized dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.44, p.105-113. 1995.
- HILL, P.B.; OLIVRY, T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (V): biology and role of inflammatory cells in cutaneous allergic reactions. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.81, p.187-198. 2001.
- HILLIER, A.; DEBOER, D.J. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.81, p.289-304. 2001.
- HILLIER, A.; GRIFFIN, C.E. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.81, p.147-151. 2001.
- HITES, M.J.; KLEINBECK, M.L.; LOKER, J.L.; LEE, K.W. Effect of immunotherapy on the serum concentration of allergen-specific IgG antibodies in dog sera. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.22, p.39-51. 1989.
- HOLDEN, C.A.; PARISH, W.E. Atopic dermatitis. In: CHAMPION, R.H.; BURTON, J.L.; BURNS, D.A.; BREATHNACH, S.M.; ROOK, A.; WILKINSON, D.; EBLING, F.J. (Eds.), *Textbook of Dermatology*. Oxford: Blackwell, 1998.
- HOU, C.; DAY, M.J.; NUTTALL, T.J.; HILL, P.B. Evaluation of IgG subclass responses against *Dermatophagoides farinae* allergens in healthy and atopic dogs. *Veterinary Dermatology*, v.17, p.103-110. 2006.
- INMAN A.O.; OLIVRY, T.; DUNSTON, S.M. Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids in normal and atopic dogs. *Veterinary Pathology*, v.38, p.720-723. 2001.
- IPSEN, H.; LARSEN, J.N.; NIEMEIJER, N.R.; LOWENSTEIN, H.; SCHOU, C.; SPANGFORT, M.D. Allergenic extracts. In: MIDDLETON, E.; REED, C.E.; ELLIS, E.F. (Eds.), *Allergy Principles and Practice*, 5<sup>a</sup> ed. St. Louis: Mosby Year Book, 1998.
- ISHIZAKA, K.; ISHIZAKA, T. Identification of  $\gamma$ E antibodies as carriers of reaginic antibody. *Journal of Immunology*, v.99, p.1187-1198. 1967.
- JACKSON, A.P.; FOSTER A.P.; HART, B.J.; HELPS, C.R.; SHAW, S.E. Prevalence of house dust mites and *Dermatophagoides* group 1 allergens collected from the bedding, skin and hair coat of dogs in southwest England. *Veterinary Dermatology*, v.16, p.32-38. 2005.
- JACKSON, H.A.; MILLER, H.R.P.; HALLIWELL, R.E.W. Canine leukocyte histamine release: Response to antigen and to anti-IgE. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.53, p.195-206. 1996.

JAEGER, K.; LINEK, M.; POWER, H.T.; BETTENAY, S.V.; ZABEL, S.; ROSYCHUK, R.A.W.; MUELLER, R.S. Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Veterinary Dermatology*, v.21, p.119-123. 2010.

JUNIPER, E.F.; WHITE, J.; DOLOVICH, J. Efficacy of continuous treatment with astemizole (Hismanal) and terfenadine (Seldane) in ragweed pollen induced rhinoconjunctivitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.82, p.670-675. 1988.

KING, T.P.; CHAIRMAN; HOFFMAN, D.; LOWENSTEIN, H.; MARSH, D.G.; PLATTS-MILLS, T.A.E.; THOMAS, W. Allergen nomenclature. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.96, p.5-14. 1995.

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

LEUNG, D.Y.M. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.105, p.860-876. 2000.

LEUNG, D.Y.M.; BOGUNIEWICZ, M.; HOWELL, M.D. New insights into atopic dermatitis. *J Clin Invest*, v.113, n.5, p.651-657. 2004

LIAN, T.M.; HALLIWELL, R.E.W. Allergen-specific IgE and IgGd antibodies in atopic and normal dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.66, p.203-223. 1998.

LLERENA, L.P.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; GRACIA, L.R.C.; LOCKEY, R.F. Sensitization to *Blomia tropicalis* and *Lepidoglyphus destructor* in *Dermatophagoides* spp. – allergic individuals. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.88, p.943-950. 1991.

LOMBARDERO, M.; GONZÁLES, R.; DUFFORT, O.; JUAN, F.; AYUSO, R.; VENTAS, P.; CORTÉS, C.; CARREIRA, J. Evaluación de la actividad biológica total y composición alérgica de extractos alérgicos. *Allergology and Immunopathology*, v.14, p.189. 1986.

LUND, E.M.; ARMSTRONG, P.J.; KIRK, C.A.; KOLAR, L.M.; KLAUSNER, J.S. Health status and population characteristics of dogs and cats examined at private veterinary practices in the United States. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v.214, p.1336-1341. 1999.

MACAN, J.; KANCELJAK, B.; PLAVEC, D.; MILKOVIC-KRAUS, S. Differences in mite fauna between the continental and Mediterranean climates of Croatia: microscopy and Dustscreen™ test findings. *Allergy*, v.58, p.780-783. 2003.

MAEDA, S.; MAEDA, S.; SHIBATA, S.; CHIMURA, N.; FUKATA, T. House dust mite major allergen Der f 1 enhances proinflammatory cytokine and chemokine gene expression in a cell line of canine epidermal keratinocytes. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.131, p.298-302. 2009.

MALLING, H.J. Methods of skin testing. *Allergy*, v.48, suppl. 14, p.55-56. 1993.

MALLING, H.J. Skin prick testing and the use of histamine references. *Allergy*, v.39, p.596. 1984.

- MARSELLA, R. OLIVRY, T. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VII): mediators of cutaneous inflammation. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.81, p.205-213. 2001.
- MASUDA, K.; TSUJIMOTO, H.; FUGIWARA, S.; KURATA, K.; YAMASHITA, K.; ODAGIRI, T.; NAKAO, Y.; MATSUKI, N.; ONO, K.; WATARI, T.; HASEGAWA, A.; TSUJIMOTO, H. Positive reactions to common allergens in 42 atopic dogs in Japan. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.73, p.193-199. 2000.
- McCALL, C.; HUNTER, S.; STEDMAN, K.; WEBER, E.; HILLIER, A.; BOZIC, C.; RIVOIRE, B.; OLIVRY, T. Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.78, p.231-247. 2001.
- McDONALD, S.M.; LICHTENSTEIN, L.M.; PROUD, D.; PLAUT, M.; NACLERIO, R.M.; MACGLASHAN, D.W.; KAGEY-SOBOTKA, A. Studies of IgE-dependent histamine releasing factors: Heterogeneity of IgE. *Journal of Immunology*, v.139, p.506-512. 1987.
- McEWEN, B.J. Eosinophils – a review. *Veterinary Research Communications*, v.16, p.11-14. 1992.
- MILLS, K.L.; HART, B.J.; LYNCH, N.R.; THOMAS, W.R.; Molecular characterization of the group 4 house dust mite allergen from *Dermatophagoides pteronyssinus* and its amylase homologue from *Euroglyphus maynei*. *International Archives of Allergy and Immunology*, v.120, p.100-107. 1999.
- MOREIRA, N.S. *Acarinos Pyroglyphidae e outros sarcoptiformes em amostras de pó domiciliar em Belo Horizonte, Minas Gerais*. Tese de Mestrado - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 1975.
- NESBITT, G.H. *Canine and Feline Dermatology: A Systematic Approach*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1983.
- NOLI, C.; BERNADINA, W.E.; WILLENSE, T. The significance of reactions to purified fractions of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.52, p.147-157. 1996.
- NOON, L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet*, i, 1572. 1911.
- NUTTAL, T.J., LAMB, J.R., HILL, P.B. Peripheral blood mononuclear cell responses to *Dermatophagoides farinae* in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology* v.82, p.273-280. 2001a.
- NUTTAL, T.J., LAMB, J.R., HILL, P.B. Characterization of major and minor *Dermatophagoides* allergens in canine atopic dermatitis. *Research in Veterinary Science* v.71, p.51-57. 2001b.

NUTTAL, T.J.; HILL, P.B.; BENSIGNOR, E.; WILLESENSE, T. House dust and storage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v.17, p.223-235. 2006.

NUTTAL, T.J.; PEMBERTON, A.D.; LAMB, J.R.; HILL, P.B. Peripheral blood mononuclear cells responses to major and minor Dermatophagoides allergens in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.84, p.143-150. 2002.

O'HEHIR, R.E.; HOYNE, G.F.; THOMAS, W.R.; LAMB, J.R. House dust mite allergy: from T-cell epitopes to immunotherapy. *European Journal of Clinical Investigation*, v.23, p.763-772. 1993.

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

OLIVRY, T.; DEAN, G.A.; THOMPSON, M.B.; DOW, J.L.; MOORE, P.F. Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Experimental Dermatology*, v.8, p.204-211. 1999.

OLIVRY, T.; NAYDAN, D.K.; MOORE, P.F. Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis. *American Journal of Dermatopathology*, v.19, p.477-486. 1997.

OLIVRY, T.; SOUSA, C.A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIX): general principles of therapy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.81, p.311-316. 2001.

PALLER, A.S. Clinical features of atopic dermatitis. *Clinical Review Allergy*, v.11, p.429-446. 1993.

PASSALACQUA, G.; DURHAM, S.R. Allergic rhinitis and its impact on asthma, update: allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.119, n.4, p.881-891. 2007.

PATTERSON, R. Investigations of spontaneous hypersensitivity of the dog. *Journal of Allergy*, v.31, p.351-363. 1960.

PENG, Z.; ARTHUR, G.; RECTOR, E.S.; KIERCK-JASZCZUK, D.; SIMONS, F.E.R.; BECKER, A.B. Heterogeneity of polyclonal dog IgE characterized by differential charge, affinity to protein A, and antigenicity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.100, p.87-95. 1997.

PIPKORN, U.; HAMMARLUND, A.; ENERBACK, L. Prolonged treatment with topical glucocorticoids results in an inhibition of the allergen-induced weal-and-flare response and a reduction in skin mast cell numbers and histamine content. *Clinical and Experimental Allergy*, v.19, p.19-25. 1989.

PLAGER, D.A.; STUART, S.; GLEICH, G.J. Human eosinophil granule: major basic protein and its novel homology. *Allergy*, v.53, p.33-40. 1998.

PLATTS-MILLS, T.A.E.; CHAPMAN, M.D. Dust mites: immunology, allergic disease, and environmental control. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.90, p.755-775. 1987.

POSITION STATEMENT: AAAAI. The use of standardized allergen extracts. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.99: 583-586. 1997.

PUERTA, L.; CARABALLO, L.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; AVJIOGLU, A.; MARSH, D.G.; LOCKEY, R.F.; DAO, M.L. Nucleotide sequence analysis of a complementary DNA coding for a *Blomia tropicalis* allergen. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.98, n.5, p.932-937. 1996.

RAFFAN, E.; LAWRENCE, H.; HENDERSON, T.; NELSON, S.; ISHERWOOD, D.; McARDLE, C.; NUTTAL, T. Prevalence of the group 1 *Dermatophagoides* allergens Der p 1 e Der f 1 in homes with no dogs, healthy dogs and *Dermatophagoides*-sensitised atopic dogs in Liverpool. *Veterinary Dermatology*, v.16, p.253-260. 2005.

RAMOS, J.D.; CHEONG, N.; LEE, B.W.; CHUA, K.Y. cDNA cloning and expression of Blo t 11, the *Blomia tropicalis* allergen homologous to paramyosin. *International Archives of Allergy and Immunology*, v.126, n.4, p.286-293. 2001.

RANDALL, M.; HILLIER, A.; COLE, L.K.; KWOCKKA, K.W.; NEEDHAM, G.; WASSOM, D.L. Quantitation of house dust mites and house dust mite allergens in the microenvironment of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, v.64, p.1580-1588. 2003.

REEDY, L.M.; MILLER, W.H.; WILLESENSE, T. *Allergic Skin Disease of Dog and Cat*. 2<sup>a</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 1997.

ROSA, A.E. & C.H.W. FLECHTMANN. Mites in house dust from Brazil. *International Journal of Acarology*, v.5(3), p. 195-198. 1979.

ROSA, A.E. *Estudo sobre a fauna acarina em poeira doméstica no Brasil*. Tese de mestrado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queirós", Universidade de São Paulo, 1978.

SCHULZ, O.; SEWEEL, H.F.; SHAKIB, F. The interaction between the dust mite antigen Der p 1 and cell-signaling molecules in amplifying allergic disease. *Clinical and Experimental Allergy*, v.29, p.439-444, 1999.

SCOTT, D. W.; MILLER, H. W.; GRIFFIN, C. E. *Small Animal Dermatology*. 6<sup>a</sup> ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001.

SIMON, D.; BRAATHEN, L.R.; SIMON, H.U. Eosinophils and atopic dermatitis. *Allergy*, v.59, p.561-570. 2004.

SINKE, J.D., RUTTEN, V.P.M.G., WILLESENSE, T. Immune dysregulation in atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.87, p.351-356. 2002.

SOPELETE, M.; SILVA, D.A.O.; ARRUDA, L.K.; CHAPMAN, M.D.; TAKETOMI, E.A. *Dermatophagoides farinae* (Der f 1) and *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p 1) allergen

exposure among subjects living in Uberlândia, Brazil. *International Archives of Allergy and Immunology*, v.122, p.257-263. 2000.

SOUZA, C.A.; MARSELLA, R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetic factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81, p.153-157. 2001.

STULL, A.; COOKE, R.A.; TENANT, J. The allergen content of pollen extracts; its determination and deterioration. *Journal of Allergy*, v.4, p.455, 1933.

STURE, G.H.; HALIWELL, R.E.W.; THODAY, K.L.; van den BROEK, A.H.M.; LLOYD, D.H.; MASON, I.S.; FERGUSON, E. Canine atopic dermatitis: the prevalence of positive intradermal skin tests at two sites in the North and South of Great Britain. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.44, p.293-308. 1995.

SWINNEN, C.; VROOM, M. The clinical effect of environmental control of house dust mites in 60 house dust mite-sensitive dogs. *Veterinary Dermatology*, v.15, p.31-36. 2004.

TEE, R.D. Allergy to storage mites. *Clinical and Experimental Allergy*, v.24, p.636-640. 1994.

TAUDORF, E.; MALLING, H.J.; LAURSEN, L.C.; LANNER, A.; WEEKE, B.; Reproducibility of histamine skin prick test. Inter and intravariation using histamine dehydrochloride 1,5 and 10mg/ml. *Allergy*, v.40, p.344. 1985.

TEMPELS-PAVLICA, Z.; OOSTING, A.J.; TERREEHORST, I.; GERTH-WIJK, R.; BRUIJNZEEL-KOOMEN, C.A.F.M.; MONCHY, J.G.R.; AALBERSE, R.C. Differential effects of mattress covers on the level of Der p 1 and Der f 1 in dust. *Clinical and Experimental Allergy*, v.34, p. 1444-1447. 2004.

THOMAS, W.R.; HALES; B.J.; SMITH, W. *Blomia tropicalis*: more than just another source of mite allergens. *Clinical and Experimental Allergy*, v.33, p.416-418. 2003.

THOMAS, W.R.; SMITH, W.; HALES; B.J. House dust mite allergen characterization: Implication for T-cells responses and immunotherapy. *International Archives of Allergy and Immunology*, v.115, p.9-14. 1998.

TURKELTAUB, P.C.; RASTOGI, S.C.; BAER, H.; ANDERSON, M.C.; NORMAN, P.S. A standardized quantitative skin-test assay of allergen potency and stability: studies on the allergen dose-response curve and effect of wheal, erythema and patients selection on assay results. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.70, p.343-352. 1982.

VENTAS, P.; CARREIRA, J.; POLO, F. Identification of IgE-binding proteins from *Lepidoglyphus destructor* and production of monoclonal antibodies to a major allergen. *Immunology Letters*, v.29, p. 229. 1991.

VOLLER, A. & BIDWELL, D. E. Enzyme-linked immunsorbent assay. In: Rose, N. R. *Manual of Clinical Laboratory Immunology*. 3. ed. Washigton: Friedman. H. & Faley, J., 1986.

VOORHORST, R. Perfection of skin testing technique. A review. *Allergy*, v.35, p.247, 1980.

WEBER, E.; HUNTER, S.; STEDMAN, K.; DREITZ, S.; OLIVRY, T.; HILLIER, A.; MCCALL, C. Identification, characterization, and cloning of a complementary DNA encoding a 60 kDa house dust mite allergen (Der f 18) for human beings and dogs. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v.112, p.79-86. 2003.

WILLENSE, A.; NOORDZIJ, A.; RUTTEN, V.P.M.G.; BERNADINA, W.E. Induction of non-IgE anaphylactic antibodies in dogs. *Clinical and Experimental Immunology*, v.59, p.351-358. 1985.

WILLENSE, T. Atopic skin disease: a review and a reconsideration of diagnostic criteria. *Journal of Small Animal Practice*, v.27, p.771-778. 1986.

WITTICH, F.W. Spontaneous allergy (atopy) in the lower animal: seasonal hay fever (fall type) in a dog. *Journal of Allergy*, v.12, p.247-251. 1941.

YAGER, J.A. The skin as an immune organ. *Adv. Vet. Dermatol.*, v.2, p.3-31. 1992.

ZAKZUK, J.; JIMÉNEZ, S.; CHEONG, N.; PUERTA, L.; LEE, B.W.; CHUA, K.Y.; CARABALLO, L. Immunologic characterization of a Blot t 12 isoallergen: identification of immunoglobulin E epitopes. *Clinical and Experimental Allergy*, v.39, p.608-616. 2009.

ZUR, G.; WHITE, S.D.; IHRKE, P.J.; KASS, P.H.; TOEBES, N. Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 169 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part II. Response to hyposensitization. *Veterinary Dermatology*, v.13, p.103-111. 2002.

|  |    |
|--|----|
| ANEXO 1: Exemplo de autorização para realização de teste intradérmico          | 47 |
| ANEXO 2: Exemplo de autorização para coleta de sangue                          | 48 |
| ANEXO 3: Exemplo de ficha para registro de resultados dos testes intradérmicos | 49 |

**Anexo 1:** Exemplo de autorização para realização de teste intradérmico.

**Autorização para participação em projeto de pesquisa**

(Teste intradérmico)

|               |                       |       |               |          |                |
|---------------|-----------------------|-------|---------------|----------|----------------|
| Data:         | <u>14 / 11 / 07</u>   |       |               |          |                |
| Nome:         | <u>Boris</u>          |       |               |          |                |
| Espécie:      | <u>Canina</u>         | Raça: | <u>Beagle</u> |          |                |
| Idade:        | <u>4,7M</u>           | Sexo: | <u>M</u>      | Pelagem: | <u>Triples</u> |
| Proprietário: | <u>Mônica Boumann</u> |       |               |          |                |

Autorizo a participação do animal acima caracterizado no projeto de doutorado intitulado "Padronização biológica e estudo qualitativo de extratos alergênicos de ácaros da poeira domiciliar utilizados para diagnóstico e tratamento de cães com dermatite atópica", sob responsabilidade do Dr. Victor E. S. Cunha, aluno de doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.



**Autorização para participação em projeto de pesquisa**

(Coleta de sangue)

|  |
|--|
| Data: <u>14 / 11 / 07</u>                                |
| Nome: <u>Rogis</u>                                       |
| Espécie: <u>Canis</u> Raça: <u>Beagle</u>                |
| Idade: <u>47M</u> Sexo: <u>M</u> Pelagem: <u>Triples</u> |
| Proprietário: <u>Maíra Bonamini</u>                      |

Autorizo a participação do animal acima caracterizado no projeto de doutorado intitulado "Padronização biológica e estudo qualitativo de extratos alergênicos de ácaros da poeira domiciliar utilizados para diagnóstico e tratamento de cães com dermatite atópica", sob responsabilidade do Dr. Victor E. S. Cunha, aluno de doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.



PROJETO DE DOUTORADO CPGCV/UFRRJ – ANIMAIS PARTICIPANTES

Data: 14/11/07 Nº: 6  
Nome: Boris  
Raça: Brazil Sexo: M  
Idade: 47A Localização: Niterói/Terapi  
Extrato alergênico: B. tropicalis

LEITURA IMEDIATA (20min)



IL: Histamina = 23 mm  
B<sub>1</sub> = 12 mm  
B<sub>2</sub> = 14 mm  
B<sub>3</sub> = 15,5 mm

LEITURA IMEDIATA (20min)