

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ESTUDO DA SENSIBILIZAÇÃO DE CÃES COM
DERMATITE ATÓPICA NA REGIÃO CENTRAL DO
RIO GRANDE DO SUL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Desydere Trindade Pereira

Santa Maria, RS, Brasil

2015

ESTUDO DA SENSIBILIZAÇÃO DE CÃES COM DERMATITE ATÓPICA NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL

Desydere Trindade Pereira

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Cirurgia e Clínica Veterinária, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção de grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Krause

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**Universidade Federal De Santa Maria
Centro De Ciências Rurais
Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária**

A Comissão Examinadora baixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ESTUDO DA SENSIBILIZAÇÃO DE CÃES COM DERMATITE ATÓPICA
NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL**
elaborada por
Desydere Trindade Pereira

Como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA

Alexandre Krause, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Marconi Rodrigues de Farias, Dr. (PUCPR)

Rafael Rodrigues Ferreira, Dr. (UFRGS)

Santa Maria, 12 de fevereiro de 2015.

*“A alma do sucesso é um sorriso
estampado na face, então nunca
desista de seus ideais, pois desistir
é não acreditar em si mesmo.”*

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

ESTUDO DA SENSIBILIZAÇÃO DE CÃES COM DERMATITE ATÓPICA NA REGIÃO CENTRAL DO RIO GRANDE DO SUL AUTORA: DESYDERE TRINDADE PEREIRA ORIENTADOR: ALEXANDRE KRAUSE

Santa Maria, 12 de fevereiro de 2015.

A dermatite atópica canina (DAC) é uma dermatose comum, definida como uma doença de cunho genético que predispõe à inflamação e ao prurido cutâneo, mediada por imunoglobulinas da classe IgE dirigidas contra antígenos específicos na maior parte dos casos. O diagnóstico da DAC é clínico e pode ser posteriormente complementado por testes alérgicos cutâneos e/ou sorológicos. O objetivo desses testes é identificar possíveis alérgenos e, com isso, possibilitar ao clínico a seleção de antígenos candidatos para a imunoterapia alérgeno-específica. No presente trabalho buscou-se identificar o perfil de sensibilização de 58 cães diagnosticados com dermatite atópica. Todos os animais foram submetidos ao teste intradérmico (TID) e à detecção de anticorpos específicos para diferentes alérgenos através de teste sorológico (ELISA). Os ácaros domiciliares são descritos como os alérgenos mais frequentes em todos os continentes. Entretanto, a positividade ao *C. dactylon* não é usualmente descrita e pode ser característica da região. Com esse trabalho foi possível identificar os principais alérgenos envolvidos na resposta imunológica de cães atópicos residentes no Rio Grande do Sul, ressaltando-se a importância da inclusão do extrato de *C. dactylon* em testes alérgicos.

Palavras-chaves: Teste intradérmico, teste sorológico, ácaros da poeira domiciliar, ácaros de produtos armazenados, *Cynodon dactylon*.

ABSTRACT

Master's Dissertation
Post-Graduate Program in Veterinary Medicine
Federal University of Santa Maria

SENSITIZATION STUDY OF THE DOGS WITH ATOPIC DERMATITIS IN CENTRAL REGION OF RIO GRANDE DO SUL

AUTHOR: DESYDERE TRINDADE PEREIRA

ADVISOR: ALEXANDRE KRAUSE

Santa Maria, February 12th 2015

Canine atopic dermatitis (CAD) is a common dermatosis, defined as a genetic-based disease, which predisposes to cutaneous inflammation and pruritus, mediated by class IgE immunoglobulins directed against specific antigens in most cases. Clinical diagnosis may be later complemented by skin allergic and/or serological tests (ELISA). The aim of these tests is to identify possible allergens in order to enable the clinicians to select candidate antigens for allergen specific immunotherapy. This work aimed to identify the sensitization profile of 58 dogs with atopic dermatitis diagnosis. All animals were submitted to intradermic test (IDT) and screened for the presence of antibodies against different allergens using a serologic test. House dust mites are described as the most frequent allergens in all continents. However, the positivity to *C. dactylon* is not commonly described and may be characteristic for the region. With this work it was possible to identify the main allergens involved in the immunologic response of atopic dogs residing in Rio Grande do Sul, pointing to the importance to include *C. dactylon* in screening tests for allergy.

Keywords: Intradermal test, serological test, house dust mites, storage mites, *Cynodon dactylon*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Principais áreas lesionais em cães com DA. Em A nota-se importante eritema facial (periorbital e perioral); em B, Hipotricose, eritema e edema na região interdigital; nas imagens C e D se observa as regiões axilar e abdominal com hiperqueratose e xerose.14
- Figura 2 - Representação esquemática da resposta alérgica mediada por IgE. Quando o alérgeno ligar-se a duas moléculas de IgE, aderidas ao citoplasma dos mastócitos, ocorrerá a desgranulação e liberação de mediadores, produzindo, assim, os sinais clínicos da dermatite atópica. Fonte: GERSHWIN, 2014.....16
- Figura 3 - Exemplo de testes alérgicos realizados em cães atópicos: (A) teste intradérmico, onde as reações positivas formam pápulas eritematosas; (B) teste sorológico, reações positivas em coloração azulada.18

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1 - Percentual de sensibilidade dos principais antígenos testados.....	28
Tabela 2 - Análise de concordância Kappa entre antígenos os testados no teste intradérmico e sorológico.....	28

LISTA DE ABREVIATURAS

AD – Ácaros domiciliares

CAD – Canine atopic dermatitis

CN – Controle negativo

CP – Controle positivo

DAC – Dermatite atópica canina

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

IDT – Intradermic test

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-12 – Interleucina 12

IL-13 – Interleucina 13

INF- γ – interferon gama

JAK – Janus Kinase

MS – Monossensibilização

PS – Polissensibilização

RAST – Radioallergosorbent test

TID – Teste intradérmico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 CAPÍTULO 1.....	22
Manuscrito.....	22
Abstract.....	23
Resumo.....	23
Introdução	23
Material e métodos	24
Desenho do estudo.....	24
Cães.....	24
Teste intradérmico.....	24
Teste sorológico.....	24
Análise estatística	25
Resultados	25
Discussão	25
Conclusão	26
Referências	27
3 CONCLUSÃO.....	29
REFERÊNCIAS.....	30
ANEXO I	33
ANEXO II	35

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte desta dissertação são apresentados sob a forma de manuscrito e se encontram no item “Manuscrito”. As seções “Material e Métodos”, “Resultados”, “Discussão” e “Referências” estão contidas no próprio manuscrito que representa este estudo na íntegra. O item “Conclusões”, ao final desta dissertação, refere-se a interpretações gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho. As referências correspondem somente às citações que aparecem no item “Introdução” desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

A dermatite atópica é uma doença de pele crônica que pode afetar humanos e alguns animais, como os cães (OLIVRY et al., 2010). A prevalência da dermatite atópica é crescente em humanos, e representa em torno de 20% dos casos dermatológicos atendidos em cães (CARLOTTI, 2012).

A dermatite atópica é definida como um distúrbio genético relacionado à resposta inflamatória exacerbada e tendência ao prurido, cujas características clínicas estão associadas com a resposta aos anticorpos da classe IgE, mais comumente dirigidos a alérgenos ambientais (HALLIWELL, 2006).

A dermatite atópica está relacionada à perda da função de barreira tegumentar e sensibilização a alérgenos ambientais, alimentares e microbianos. Quando há sensibilização a alérgenos ambientais é denominada dermatite atópica *strictu sensu* e quando relacionada a alérgenos alimentares é dermatite atópica induzida por alimentos. Porém, a integração gene x gene pode causar eczema espontâneo, de origem não alérgica.

De acordo com Nutall (2008), a DAC é uma doença que deve ser classificada como multifatorial e que envolve: resposta alérgica específica, infecções e defeitos da barreira cutânea, entre outros fatores predisponentes.

Os principais alérgenos envolvidos nessa patogênese são: antígenos de ácaros domiciliares (AD); esporos de fungos anemófilos; polens de gramíneas, árvores e arbustos; e antígenos epidermais (HILL; DEBOER, 2001).

Ainda, de acordo com Halliwell (2006), cães com sinais clínicos idênticos aos da DAC que, no entanto, não possuem resposta com predomínio de IgE documentada devem ser classificados como dermatite atópica *simile*.

Na dermatite atópica a função de barreira da pele é afetada pela integridade da estrutura do extrato córneo. Integridade essa que é mantida por desmossomos modificados, queratinócitos diferenciados e lipídios intercelulares.

Durante o processo de queratinização, organelas contidas no extrato córneo (corpos lamelares) fornecem lipídios e enzimas necessários para a diferenciação celular e descamação final da epiderme. Os lipídios se organizam e formam lamelas extracelulares que ajudam a

prevenir a perda de água transepidérmica, e limitam a penetração de material exógeno (bactérias, alérgenos e irritantes primários por exemplo).

A matriz extracelular lipídica é normalmente composta de ceramidas, colesterol, ácidos graxos e ésteres de colesterol. O comprometimento da barreira cutânea tem sido muito estudado em humanos com dermatite atópica. Esse comprometimento consiste em uma alteração na quantidade e na composição dos ceramídeos. Nos indivíduos predispostos, a facilidade de entrada de partículas e microrganismos é acompanhada de processo inflamatório, que acarreta ciclos de sensibilizações adicionais e do agravamento progressivo da doença (MARSELLA et al., 2009).

Através de um trabalho com avaliação de microscopia eletrônica da epiderme de cães da raça beagle atópicos e não atópicos, Marsella e colaboradores (2009) comprovaram a deficiência na produção de lipídios nestes animais. Esses cães possuíam uma camada córnea menos compacta, mais porosa e com menor coesão intercelular, devido a pouca produção e distribuição irregular de lipídios produzida pelos queratinócitos. Em adição, inúmeras anormalidades estruturais foram encontradas na epiderme de cães com dermatite atópica quando comparados aos cães do grupo controle, e incluíam o aumento dos espaços intercelulares e a desorganização das lamelas lipídicas.

Outra consequência da menor produção e distribuição dos ceramídeos é a perda transepidérmica de água, fato que aumenta os espaços intercelulares, torna a pele xerótica e mais vulnerável às infecções oportunistas. Hightower et al. (2010) avaliaram a quantidade de perda transepidérmica de água em áreas específicas do corpo de cães com dermatite atópica. De acordo com seus resultados, pouca água é perdida no tronco e no dorso, e grande quantidade é perdida nas pálpebras (principalmente superior), no mento, em dobras flexurais, nas axilas, na região inguinal, na porção distal dos membros, e no pavilhão auricular. Estas áreas (Figura 1) já haviam sido definidas como as principais áreas lesionais no consenso de DAC do Colégio Americano de Dermatologia Veterinária em 2001 (OLIVRY et al., 2001).



FIGURA 1 – Principais áreas lesionais em cães com DA. Em A nota-se importante eritema facial (periorbital e perioral); em B, Hipotricose, eritema e edema na região interdigital; nas imagens C e D se observa as regiões axilar e abdominal com hiperqueratose e xerose.

Em humanos, um dos fatores predisponentes para o rompimento da barreira cutânea em pacientes com dermatite atópica é a alteração da agregação dos filamentos de filagrina. A filagrina é uma das proteínas mais importantes no desenvolvimento da camada córnea (SANTORO et al., 2013). Após a transformação da pró-filagrina em filagrina, essa contribui na agregação do citoesqueleto queratinoso, proporcionando a hidratação natural da camada granular da epiderme.

Na ausência de filagrina, a barreira epidérmica deixa de funcionar normalmente, aumentando a perda hídrica transepidérmica (LAI-CHEONG et al., 2006). As mutações do gene *Filagrin* estão presentes em 15% dos pacientes humanos com dermatite atópica, geralmente associadas com a forma mais grave da doença.

Assim como em humanos, a expressão de filagrina pode estar alterada na pele de cães com dermatite atópica, no entanto, mais estudos são necessários para a identificação da região do DNA alterada responsável pela expressão alterada da filagrina nestes cães e suas relações com a DA (SANTORO et al., 2013).

Muitas aberrações da resposta imunológica têm sido descritas em cães com dermatite atópica, e existe a dúvida se essas possuem um papel primário ou se essa resposta é consequência de outros defeitos, como falhas na barreira cutânea. Contudo, o entendimento dessa complexa doença é desafiador (MULLER et al., 2013).

Com relação à resposta alérgica, resumidamente, quando um alérgeno penetra no hospedeiro, este é fagocitado por células dendríticas que o processam e transportam até um linfonodo regional. A molécula processada é apresentada pelas células dendríticas aos linfócitos T. O linfócito T, sensibilizado pela molécula é denominado linfócito T ativado. A partir daí, o linfócito T pode produzir diferentes moléculas sinalizadoras (citocinas). Quando o linfócito produz IL-4, a célula T induzirá a resposta Th2 e secretará grandes quantidades de IL-4 e IL-13. Quando, entretanto, as células dendríticas secretarem IL-12, as células T serão direcionadas para desenvolver uma resposta Th1 e produzirão interferon gama (INF- γ) (GERSHWIN, 2014).

As lesões agudas normalmente envolvem a liberação das citocinas IL-4 e IL-13 (liberadas por Th2 e eosinófilos); e a resposta ligada aos macrófagos e citocinas do tipo Th1 (IL-2, IL-12 e INF- γ) está associada a cronicidade (MULLER et al., 2013).

As citocinas IL-4 e IL-13, também podem ligar-se a receptores das células B e, assim estimulá-las a se diferenciar em plasmócitos, produzindo imunoglobulinas da classe IgE específicas para o alérgeno que desencadeou a resposta (GERSHWIN, 2014)

A IgE alérgeno-específica se localiza aderida à membrana dos mastócitos e, se ocorrer novo contato, o alérgeno vai, então, se ligar aos receptores das IgEs, e conduzir à desgranulação dos mastócitos, liberando principalmente histamina, heparina, serotonina). Esses mediadores estimulam a via do ácido araquidônico pela ativação da fosfolipase A2 na membrana da célula (Figura 1). A ativação desta via ativa as enzimas ciclo-oxigenase e lipoxigenase, levando à produção de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxano e leucotrienos) que são potentes indutores da inflamação (GERSHWIN, 2014).

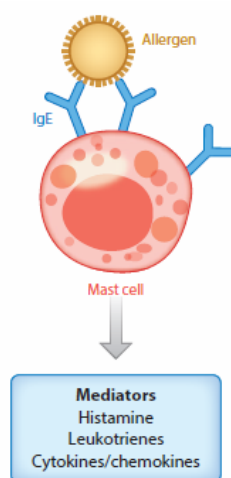


FIGURA 2 – Representação esquemática da resposta alérgica mediada por IgE. Quando o alérgeno ligar-se a duas moléculas de IgE, aderidas ao citoplasma dos mastócitos, ocorrerá a desgranulação e liberação de mediadores, produzindo, assim, os sinais clínicos da dermatite atópica. Fonte: GERSHWIN, 2014.

Em comparação com os humanos, os cães possuem níveis séricos superiores de IgE. Acredita-se que isto ocorra devido à grande exposição a parasitos. Além disso, a maioria dos cães com dermatite atópica possui altos níveis de IgE. Apesar de nem todos os animais apresentarem altos níveis de IgE, existem provas de que a reatividade aos alérgenos ambientais tem papel importante na DAC e que aproximadamente 80% dos cães que apresentam a doença possuem anticorpos da classe IgE específicos para reconhecer um ou mais antígenos do ambiente (MULLER et al., 2013).

Ainda, outros fatores que podem estar envolvidos no desenvolvimento da DAC são a época do nascimento e alimentação durante a lactação. Cães nascidos em épocas de maior exposição ao pólen, possuem maior risco de desenvolvimento de dermatite atópica, o que é sustentado pelo fato que alergias mediadas por IgE requerem contato precoce.

Em relação à alimentação, uma fêmea lactante que se alimenta de produtos não industrializados, pode desenvolver um efeito protetor à sua prole, apesar de ser um dado intrigante, alterações na dieta podem modular IgE alérgeno-específica, mas não impedir totalmente o desenvolvimento da doença (MULLER et al., 2013).

O diagnóstico clínico da DAC é fundamentado pelos critérios estabelecidos por Favrot et al. (2010), com 85% de sensibilidade e 79% de especificidade para cães que cumprirem ao menos cinco ou seis dos oito critérios: (1) início dos sinais antes dos três anos de idade; (2) cão vivendo a maior parte do tempo em ambientes internos; (3) prurido responsivo a glicocorticoides; (4)

prurido não-lesional; (5) lesões em extremidades distal dos membros torácicos; (6) lesões na superfície côncava do pavilhão auricular, (7) ausência de lesões nas margens das orelhas e (8) na região dorsolombar.

O diagnóstico diferencial deve considerar outras dermatites pruriginas, como a seborreia primária, hipersensibilidade alimentar, escabiose, hipersensibilidade a saliva de artrópodes, mormente pulgas, dermatite de contato irritante e alérgica, hipersensibilidade a parasitas intestinais, foliculite bacteriana e malasseziose.

A hipersensibilidade à picada de pulga raramente provoca dermatite facial, conjuntivite, otite média ou externa, mas muitos cães com dermatite atópica (75%) possuem hipersensibilidade à saliva da pulga concomitantemente (SCOTT et al., 2001).

O prurido pode provocar lesões não visíveis, máculas levemente eritematosas ou eritema difuso. As lesões de pele em cães atópicos geralmente são aquelas associadas ao auto-traumatismo, piodermite secundária, malasseziose e disqueratose. Essas lesões podem resultar em hipotricose e alopecia, feotriquia, pápulas, pústulas, hiperpigmentação e liquenificação tegumentar (MULLER et al., 2013).

O tratamento dos cães com DAC envolve o reestabelecimento da barreira cutânea através de hidratação, mas principalmente se baseia em reduzir a inflamação e o prurido.

O controle da dermatite atópica pode ser realizado através da redução da exposição ao alérgeno ou através do uso de antihistamínicos, ácidos graxos, glicocorticoides, ciclosporina, tacrolimus, pentoxifilina ou medicações tópicas (ZANON, 2008; MEDLEAU; HNILICA, 2009; OLIVRY et al., 2010). Uso de fármacos antimicrobianos são indicados quando há comorbidades infecciosas ao quadro alérgico.

De maneira geral, a dermatite atópica responde bem aos glicocorticoides sistêmicos, e este é o tratamento de escolha para a fase aguda da doença, ou quando nenhuma outra terapia seja capaz de controlar o prurido (SCOTT et al., 2001). O uso de glicocorticoides é também empregado no tratamento das fases crônicas da doença, associado a outros imunomoduladores como a ciclosporina, até que esta inicie seu efeito.

Apesar de eficaz, devido a seus efeitos colaterais (poliúria, polidipsia, alopecia, polifagia, obesidade, infecções urinárias do trato inferior, até efeitos mais graves como pancreatite, ulceração e perfuração gastrintestinal e miopatias), estes não devem ser utilizados de forma contínua para o controle da doença (SCOTT et al., 2001).

Recentemente, um inibidor seletivo da Janus cinase (JAK), o oclacitinib, teve sua eficácia comprovada em reduzir o prurido alérgico bloqueando estímulos neurais específicos (COSGROVE et al., 2014).

Com o objetivo de reduzir efeitos adversos de intervenções farmacológicas, a investigação dos alérgenos envolvidos na patogênese da DAC é crucial para oferecer tratamentos alternativos, especialmente para os casos em que a terapia tradicional com glicocorticoides é ineficaz ou associada há efeitos colaterais inaceitáveis (MARSELLA; NICKLIN, 2001).

A identificação dos alérgenos envolvidos na hipersensibilidade mediada por IgE, na precipitação e exacerbação da dermatite atópica é fundamental para o estabelecimento da exclusão ambiental, e imunoterapia alérgenos-específica em cães com DA (OLIVRY et al., 2005). A figura 3 representa dois testes utilizados para tal identificação, o teste intradérmico e a sorologia pelo enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

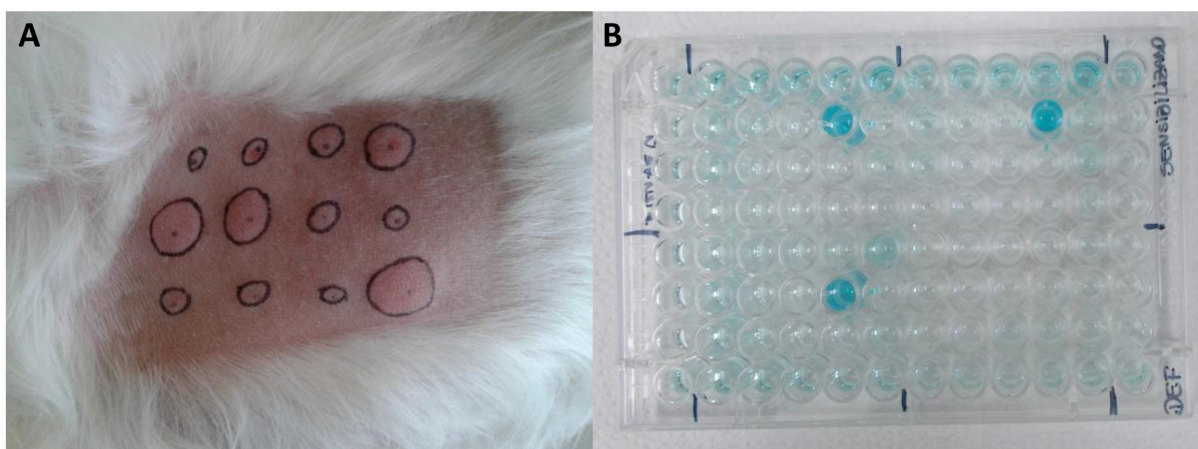


FIGURA 3 – Exemplo de testes alérgicos realizados em cães atópicos: (A) teste intradérmico, onde as reações positivas formam pápulas eritematosas; (B) teste sorológico, reações positivas em coloração azulada.

O teste intradérmico (TID) é considerado o teste padrão ouro para a pesquisa de fontes alergênicas que podem estar envolvidas na manifestação alérgica de cães com DA e continua sendo largamente utilizado por grande parte de dermatologistas veterinários (MEDLEAU; HNILICA, 2009).

O TID consiste na injeção intradérmica de extratos produzidos a partir dos alérgenos suspeitos, e na observação de reação local característica da hipersensibilidade do tipo imediata,

ou seja, a presença de eritema, edema e pápula no local. As reações cutâneas são avaliadas objetivamente 15 minutos após as injeções, e o diâmetro das reações deve ser calculado através da média aritmética do diâmetro maior com o seu perpendicular. Para uma reação ser considerada positiva, o diâmetro da pápula deve ser maior que a média dos diâmetros do controle positivo (CP) e negativo (CN) (SCOTT et al., 2001).

Em medicina veterinária, o TID é mais recomendado, ao contrário do que ocorre na medicina, em que se utiliza o teste de puntura como primeira escolha. Em cães, o resultado do teste de puntura pode ser insatisfatório devido ao tempo de espera até a gotícula ser absorvida.

Como no TID, ocorre aplicação de uma pequena quantidade (geralmente 0,05ml) no espaço intradérmico, o tempo de permanência do animal contido é menor. É de suma importância a escolha dos extratos alergênicos que serão utilizados, bem como a forma de diluição e sua concentração com base em estudos espécie- específicos, para evitar resultados falsos-negativos e/ou falsos-positivos, não sendo recomendada a utilização frascos com múltiplos alérgenos (MULLER et al., 2013).

Concentrações consideradas ideais de histamina base e de alguns extratos alergênicos, foram propostas por Ferreira (2013), com intuito de reduzir a incidência de resultados falsos-negativos (histamina) e falsos-positivos (extratos alergênicos), na avaliação de testes intradérmicos realizados em cães com dermatite atópica.

Alguns fármacos devem ter seu uso interrompido antes que um cão seja submetido ao TID e, de acordo com Olivry et al., (2013), existe a necessidade de pelo menos sete dias sem uso de anti-histamínico para que se faça o teste. Quanto ao uso de glicocorticoides orais, apesar de ainda haver controvérsias sobre a influência desses na resposta imediata do TID, recomenda-se sua interrupção 14 dias antes de se realizar o teste. Essa recomendação também se aplica aos glicocorticoides de uso tópico, tanto cutâneos quanto óticos. Em relação aos glicocorticoides de depósito (ex.: metilprednisolona), não se deve submeter o animal ao teste com tempo inferior a 28 dias da aplicação.

Testes sorológicos são amplamente utilizados em dermatologia veterinária para a identificação de sensibilização a alérgenos reconhecido pelas IgE sérica em cães alérgicos. A mensuração apenas de IgE é um pobre indicador do estado alergênico, nesse caso podendo não distinguir um cão alérgico de um paciente normal. Mesmo quando se utiliza IgE alérgeno-

específica, os testes sorológicos apresentam alta sensibilidade e alto valor preditivo negativo (MULLER et al., 2013).

Os resultados dos testes sorológicos IgE específicos parecem não ser alterados pelo uso de anti-histamínicos, mas esta afirmação ainda não foi comprovada. Já glicocorticoides orais são improváveis de causar alteração em testes sorológicos, assim como os de uso tópico. No entanto, não existem dados que avaliem a interferência de corticoides de depósito, sendo recomendado o período de 28 dias de suspensão do tratamento para a realização da sorologia, assim como descrito para realização de TID. O uso de ciclosporina oral parece não influenciar nos resultados de ambos os testes (OLIVRY et al., 2013).

A imunoterapia tem sido utilizada para prevenir recorrência do eczema em cães com dermatite atópica, após exposições a alérgenos futuros (OLIVRY et al., 2010). Esta modalidade terapêutica foi introduzida por Noon e Freeman em 1911 para o tratamento de rinite alérgica.

A imunoterapia com vacinas alergênicas é o único tratamento que modifica a evolução natural das alergias mediadas pela IgE. Ela objetiva o controle da doença, ao contrário dos medicamentos que apenas aliviam os sintomas.

A imunoterapia deve ser ministrada por, no mínimo, três anos, segundo recomendação da Organização Mundial da Saúde. As vacinas alergênicas são apresentadas em fases, de concentrações crescentes, e a imunoterapia consiste na administração do alérgeno ao qual o paciente é sensível, de forma progressiva e gradual, com o objetivo de estimular o sistema imunológico a produzir anticorpos bloqueadores (IgG), aumentando a resistência e diminuindo a sensibilidade específica contra o alérgeno. Consequentemente obtém-se a melhora dos sinais e da qualidade de vida do paciente em tratamentos de, no mínimo, três anos (WHO, 1997).

Olivry e colaboradores (2010) examinaram a eficácia da imunoterapia alérgeno-específica, através da avaliação de três trabalhos (randomizados e controlados). A qualidade dos projetos de estudo variou de intermediária a alta. Um desses estudos comparou a eficácia em longo prazo da imunoterapia alérgeno-específica com grupo controle placebo, porém, durante o estudo ocorreram diversos casos de desistência da terapia, o que afetou o resultado da avaliação. Os autores relataram eficácia superior da intervenção ativa (imunoterapia) em relação ao placebo, mas os escores de lesão e grau de redução do prurido não puderam ser determinados.

No segundo estudo, os investigadores estabeleceram estes escores e houve mais de 50% de melhora nas lesões de pele e de prurido em 30-50% dos casos. O outro estudo teve como

resultado redução dos escores de lesão e prurido em 64% e 45% dos casos, respectivamente.

Juntos, esses três estudos relataram efeitos colaterais da imunoterapia em uma minoria de pacientes, e estes consistiram no aumento de prurido (11% dos casos) e desconforto do animal (15% de casos).

Com base nesses estudos, os autores concluíram que a imunoterapia possui boa eficácia, porém, por ser um tratamento longo (pelo menos três anos), é comum que os proprietários menos interessados abandonem o protocolo vacinal de seu cão.

Através da criação de um questionário, Favrot et al. (2010) buscaram avaliar a qualidade de vida de cães com dermatite atópica e de seus donos. O grupo concluiu que o gênero sexual do proprietário não influencia na percepção da doença, no entanto, houve uma diferença significativa entre proprietários jovens e idosos. Uma possível explicação é que muitos idosos poderiam passar mais tempo com seu animal de estimação, criando, desta forma, uma maior percepção da doença do cão.

O benefício global do proprietário em ter um cão com dermatite atópica não é afetado pela gravidade da doença e é particularmente interessante notar que poucos proprietários consideraram eutanásia como opção, ou se diziam arrependidos de ter um cão por causa de sua enfermidade.

Em relação ao animal, suas atividades e condições fisiológicas não são fortemente influenciadas pela doença, no entanto, o prurido provocado parece afetar consideravelmente a qualidade do sono do animal e pode estar relacionado à ansiedade.

Para que a imunoterapia alérgeno-específica seja introduzida corretamente, é essencial que se teste as principais fontes alergênicas possíveis de estarem envolvidas na patogênese da DAC do animal, de acordo com o local onde o mesmo vive.

No Brasil, até o momento, há pouca informação a respeito do perfil de sensibilidade de cães com DA. Cunha et al. (2012) observaram que alérgenos de ácaros domiciliares, como *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*, são reconhecidos pelos soros de cães atópicos através de immunoblotting.

Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de sensibilização em cães atópicos, através de testes intradérmico e sorológico, com o intuito de direcionar quais alérgenos devem compor os testes alérgicos de cães residentes no estado do Rio Grande do Sul.

2 CAPÍTULO I

MANUSCRITO

Os resultados desta dissertação são apresentados na forma de artigo científico, com sua formatação de acordo com as orientações da revista a que será submetido:

Estudo da sensibilização de cães com dermatite atópica na região central do Rio Grande do Sul

Autores: Desydere Trindade Pereira, Victor do Espírito Santo Cunha, Claudete Schmidt, Tielli Magnus, Alexandre Krause

De acordo com normas para publicação em: Pesquisa Veterinária Brasileira

Estudo da sensibilização de cães com dermatite atópica na região central do Rio Grande do Sul

Desydere T. Pereira^{1*}, Victor do Espírito Santo Cunha², Claudete Schmidt³, Tielli Magnus²,
Alexandre Krause³

ABSTRACT.- Pereira D.T, Cunha V.E.S., Schmidt C., Magnus T. & Krause A. 2015. **Sensitization study of the dogs with atopic dermatitis in central region of Rio Grande do Sul.** Perfil de sensibilização em cães atópicos no Rio Grande do Sul frente a antígenos ambientais. *Pesquisa Veterinária Brasileira* 0(0):00-00. Departamento de Clínica de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil. E-mail: desydere@gmail.com

Canine atopic dermatitis (CAD) is a common dermatosis, defined as a genetic-related disease which predisposes to skin inflammation and pruritus, associated to a IgE-specific response in most of cases. Clinical diagnosis may be later complemented by skin allergic and/or serological tests. The aim of these tests is to identify possible allergens in order to enable the clinicians to select candidate antigens for allergen specific immunotherapy. In the present study 58 CAD positive animals were tested. All were submitted to the intradermal test (IDT) and screened for the presence of antibodies against different antigens using ELISA. The obtained results could show a high prevalence of sensitization among the tested dogs to house dust mites and to pollen of *C. dactylon*. With this work it was possible to identify the main allergens involved in immunological response of atopic dogs living in Rio Grande do Sul.

INDEX TERMS: Intradermal test, serological test, house dust mites, storage mites, *Cynodon dactylon*

RESUMO.- A dermatite atópica canina (DAC) é uma dermatose comum, definida como doença de cunho genético que predispõe à inflamação e ao prurido cutâneo, associados à resposta IgE específica na maior parte dos casos. O diagnóstico da DAC é clínico e pode ser posteriormente complementado por testes alérgicos cutâneos e/ou sorológicos. O objetivo desses testes é identificar possíveis alérgenos e, com isso, possibilitar ao clínico a seleção de antígenos candidatos para a imunoterapia alérgeno-específica. No presente estudo foram testados 58 animais diagnosticados para DAC. Todos os animais foram submetidos ao teste cutâneo intradérmico (TID) e amostras de sangue foram colhidas para a realização de testes sorológicos. Os resultados obtidos demonstraram alta prevalência de sensibilização aos ácaros domiciliares e ao pólen da gramínea *C. dactylon* nos cães testados. Com esse trabalho, foi possível identificar os principais alérgenos envolvidos na resposta imunológica de cães atópicos residentes no Rio Grande do Sul.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: Teste intradérmico, teste sorológico, ácaros da poeira domiciliar, ácaros de produtos armazenados, *Cynodon dactylon*.

INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) é uma dermatopatia comum, crônica, definida como uma doença multifatorial e de cunho genético que predispõe à inflamação e ao prurido cutâneo, associada à resposta mediada por imunoglobulinas alérgeno-específicas, da classe IgE na maior parte dos casos (OLIVRY et al. 2010). Os principais alérgenos envolvidos na patogênese da DA são os antígenos de ácaros da poeira domiciliar e de produtos armazenados (AD); esporos de fungos; polens de gramíneas, árvores e arbustos; e antígenos epidermais (HILL & DEBOER 2001).

O diagnóstico clínico da DA é relativamente simples e, de acordo com Favrot et al. (2010), pode ser estabelecido com 42% de sensibilidade e 94% de especificidade para cães que cumprirem seis dos sete critérios e, 77 % de sensibilidade e 83% de especificidade para o caso de cães que cumprem ao menos cinco dos seguintes

¹ Pós-graduação em Medicina Veterinária, área de Cirurgia e Clínica Veterinária, Centro de ciências rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: desydere@gmail.com

² Departamento de P&D, FDA Allergenic LTDA, Rio de Janeiro

³ Departamento de Clínica de Pequenos Animais (DCPA), Centro de ciências rurais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima 1000, Santa Maria, RS, 97105-900, Brasil.

sete critérios: (1) início dos sinais antes dos três anos de idade; (2) cão vivendo no interior da residência; (3) prurido primário (4) extremidades distal dos membros torácicos afetados; (5) lesões nas porções côncavas dos pavilhões auriculares; (6) ausência de lesões nas margens das orelhas; (7) ausência de lesões na região dorsolombar. Outras hipóteses diagnósticas de doença cutânea pruriginosa devem sempre ser descartadas.

O tratamento dos cães com DAC envolve o reestabelecimento da barreira cutânea através da hidratação, mas principalmente se baseia em reduzir a inflamação e prurido. Para tanto, o uso de corticosteroides e outros medicamentos anti-inflamatórios, imunomoduladores e imunossupressores tem sido utilizado. Com o objetivo de reduzir o uso desses medicamentos, a imunoterapia alérgeno-específica pode ser incorporada no protocolo de tratamento (DEBOER & MARSELLA 2001).

Os testes alérgicos são úteis para identificar hipersensibilidade mediada por IgE e selecionar alérgenos candidatos para imunoterapia alérgeno-específica em cães com DA. É de suma importância traçar o perfil de sensibilidade de um paciente antes do início da mesma (OLIVRY et al. 2005). No Brasil, até o momento, há pouca informação a respeito do perfil de sensibilidade de cães com DAC. Cunha et al. (2012) observaram por *immunoblotting* que alérgenos de ácaros domiciliares, como *Dermatophagoides farinae* e *Blomia tropicalis*, são reconhecidos pelo soro de cães com dermatite atópica residentes no Rio de Janeiro.

O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de sensibilização em cães com dermatite atópica, residentes na região central Rio Grande do Sul, através de testes intradérmicos (IDT) e testes sorológicos.

MATERIAL E MÉTODOS

Desenho do estudo: estudo transversal exploratório e analítico.

Cães: foram selecionados 58 cães independente da raça, com idades entre seis meses a oito anos, e com diagnóstico de dermatite atópica, estabelecido através da utilização dos critérios de Favrot et al. (2010). Todos passaram inicialmente por exame físico e dermatológico completos, tratamento, quando necessário, de infecções cutâneas secundárias, e posteriormente foram submetidos ao IDT e à colheita de sangue para obtenção de soro e realização do ELISA.

Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (número 070/2014) os procedimentos estão de acordo com a Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos – DBCA, do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA. Além disso, os responsáveis pelos animais assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Participação em Pesquisa.

Teste intradérmico: Todos os cães foram submetidos ao IDT, onde foram testados extratos alergênicos de *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Blomia tropicalis* (com concentrações padronizadas para cães, de acordo com Ferreira, 2013), *Cynodon dactylon* e *Paspalum notatum*, fornecidos pela FDA Allergenic (Rio de Janeiro - Brasil). Previamente à realização do teste, fármacos que alterassem a reatividade cutânea foram interrompidas pelo período mínimo recomendado por OLIVRY et al. 2013. Os cães foram tricotomizados na região lateral do tórax com lâmina 40. Após 0,05 ml dos extratos e soluções controles foram inoculados por via intradérmica, com espaço mínimo de 2 cm entre as aplicações. Foram utilizadas agulhas de calibre 0,25mm x 6mm acopladas a seringas de 0,3ml (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. Para uma reação ser considerada positiva, o diâmetro da pápula deve que ser igual ou maior que a média dos diâmetros do controle positivo (solução fosfato de histamina 0,1 mg/ml) e negativo (solução salina-fenolada) (SCOTT et al. 2001).

Teste sorológico: todos os animais foram submetidos à colheita de 5 ml de sangue da veia jugular ou cefálica. A coagulação ocorreu a temperatura ambiente e, após, o sangue foi centrifugado por 20 minutos a 7.500 rpm, o soro separado e congelado entre - 10 e - 20°C. Em amostras obtidas de 30 cães se realizou ELISA indireto desenvolvido pelo Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da FDA Allergenic, e nas amostras de 28 animais se realizou teste com kit comercial de ELISA indireto (Pet ELISA® – ALERGOVET).

Nos 30 animais que realizaram ELISA indireto desenvolvido pelo Departamento de Pesquisa e Desenvolvimento da FDA Allergenic (ELISA indireto FDA Allergenic), foram testados os antígenos de *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. tropicalis* e *Tyrophagus putrescentiae*. O protocolo utilizado constou de sensibilização da placa com aplicação de extrato alergênico diluído (100µl/poço), incubação *overnight* (18 horas), lavagem 4X

(200µl/poço) com PBS – tween 20 a 0,01%, seguido de mais duas lavagens com PBS. Para o bloqueio se utilizou albumina de soro bovino (BSA 1%), 200µl/poço e incubação à 37°C por 1h:30min., Após ocorreu nova lavagem e aplicação de 100 µl dos soros dos cães diluídos entre 1:10 e 1:30 em BSA (de acordo com validação previa) e em quadruplicata. Nos poços das colunas 1 e 12 foram aplicados apenas BSA 1% como controles negativos, seguido de incubação à 37°C por 2h e lavagem. Após aplicou-se anti-IgE canina policlonal, conjugada a peroxidase, na diluição de 1:8.000 em BSA, 0,1% 100µl/poço, com incubação à 37°C por 2h e lavagem. Substrato (TMB peroxidase) foi em seguida incubado à temperatura ambiente por 20 minutos. Para a paralização das reações, aplicou-se ácido fosfórico 1M e por fim realizou-se leitura automatizada em espectrofotometro (filtro 450 nm).

Nos 28 cães que realizaram teste sorológico com kit comercial de ELISA indireto (Pet ELISA® – ALERGOVET), além dos extratos de *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. tropicalis* e *T. putrescentiae*, foram testados antígenos de *Acaro sirus*, *Lepidoglyphus destructor*, *Cynodon. dactylon*, *Phleum*, *Aveia*, *Lolium*, *Artemisia vulgaris*, *Chaenopodium spp*, *Parietaria judaica*, *Ambrosia elatior*, *Betulácea* e *Quercus*. Este teste utiliza protocolo semelhante ao descrito para os testes da FDA Allergenic, com exceção do anticorpo secundário, que neste caso é um anticorpo oligoclonal composto por uma mistura de três anticorpos monoclonais específicos para detecção da IgE canina (Olygo.3mAb).

Análise estatística: para avaliar a concordância de sensibilização dos antígenos *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. tropicalis* e *C. dactylon*, que foram testados em ambos os testes, utilizou-se a estatística Kappa (SPSS, 2007), através do software SPSS. O nível de significância considerado foi de 5%.

RESULTADOS

Dos 58 animais submetidos ao IDT, 25 apresentaram resultado negativo. Dos 33 animais positivos, 16 foram sensíveis a apenas um dos antígenos testados, e 17 foram positivos a mais de um dos antígenos testados. Os antígenos que apresentaram maior sensibilidade foram: *B. tropicalis* 48,5% (16/33), *C. dactylon* 42,4% (14/33) e *D. farinae* 33,33% (11/33).

Quanto aos testes sorológicos, 30 animais foram submetidos ao ELISA – FDA Allergenic e 28 ao Pet ELISA® – ALERGOVET, 37 cães foram positivos, sendo nove cães sensibilizados a apenas um dos antígenos testado e 28 cães foram sensíveis a mais de um antígeno. O maior percentual de sensibilização foi de 86,5% (32/37) para o ácaro *D. farinae*, seguido dos ácaros *T. putrescentiae* 56,8% (21/37), *B. tropicalis* 48,6% (18/37) e 41,2% (7/17) de positividade a *C. dactylon*, que foi testado apenas no teste Pet ELISA® – ALERGOVET (de 28 animais testados, 17 foram positivos) (Tabela 1).

Os antígenos *D. pteronyssinus*, *L. destructor* e *P. notatum*, foram responsáveis por sensibilização em pelo menos 20% dos animais testados (independente do teste realizado) (Tabela 1), no entanto, os demais antígenos foram inferiores a esse percentual, de acordo com o que segue: *A. vulgaris* 17,6% (3/17), *A. elatior* e *Betulácea* 11,8% (2/17), *Phleum*, *Aveia*, *Lolium*, *Chaenopodium spp* e *Quercus* com apenas um cão dos 17 sensíveis (5,9%); nenhum cão obteve sensibilidade a *P. judaica*.

Com o intuito de comparar os testes intradérmico e sorológico, foi realizada a análise de concordância de Kappa para os antígenos *D. pteronyssinus*, *D. farinae*, *B. tropicalis* e *C. dactylon*, os quais não demonstraram correlação, de acordo com o demonstrado na Tabela 2.

DISCUSSÃO

O percentual de negatividade de 43,1% no IDT pode ter ocorrido pela ausência de antígenos relevantes testados, baixa sensibilidade do teste, ou, ainda, a condição denominada *canine atopic like dermatitis*, condição em que cães com características clínicas de DAC não possuem anticorpos (IgE) detectados (HALLIWELL 2006).

Dentre os animais positivos, a maioria apresentou sensibilidade a mais de um antígeno testado. Em humanos essa também é a condição mais comum (CALDERON et al. 2012). A PS a diferentes espécies de AD foi a situação mais comum, porém, não foi possível concluir se esta situação ocorreu por exposição às diferentes espécies de AD ou por reações cruzadas. No que se refere ao IDT, Buckley et al. (2013) demonstram a existência de reação cruzada de alérgenos filogeneticamente similares, sendo possível que haja compartilhamento de moléculas alergênicas principais dentro de cada grupo de ácaros, como por exemplo, entre os *Dermatophagoides*.

Os resultados mais expressivos de sensibilidade foram para os alérgenos de *B. tropicalis*, *D. farinae*, *D. pteronyssinus* e *C. dactylon*. A importância dos alérgenos *D. farinae* e *B. tropicalis* para cães brasileiros já foi demonstrada por Cunha et al. (2012), porém, a importância de *C. dactylon* ainda não foi comprovada em cães no Brasil, apesar de ser uma espécie bem adaptada às regiões quentes, ser considerada importante fonte de alérgenos para seres humanos, e estar presente em todo o território nacional (VIEIRA 2012).

Os antígenos dos ácaros *B. tropicalis*, *D. farinae*, *D. pteronyssinus*, foram testados em concentrações baseadas de acordo com limiar irritativo para cães proposto por Ferreira (2013), no entanto, para *C. dactylon* essa concentração ainda não foi determinada.

Os ácaros *Dermatophagoides* são mundialmente reconhecidos como os principais alérgenos relacionados à dermatite atópica em cães. De acordo com Thomas (2010) esse ácaro está presente em todos os continentes, sendo, portanto, expressiva sua positividade em diversos estudos em que se testou a sensibilidade em cães alérgicos, desde os mais antigos (STURE et al. 1995) até os mais recentes (FARMAKI et al. 2012). Saridomichelakis e colaboradores (1999) realizaram um estudo com 91 cães com dermatite atópica na Grécia, onde observaram 84,6% de positividade aos AD (*D. farinae* 70,3% e *A. sirus* 48,4%). Na Austrália, Mueller et al (2000) descreveram 34% de cães positivos ao *D. farinae*. Em 2002 na França, foi possível reforçar a importância de *D. farinae*, em 150 animais que realizaram IDT, 90% foram positivos, sendo 57% de MS, nesse estudo ainda foi possível observar que 30% dos cães apresentaram sensibilidade para *A. sirus* e *T. putrescentiae* (BENSIGNOR & CARLOTTI 2002). Na Tailândia, ao analisar os resultados positivos de 114 cães no IDT, 74% demonstraram sensibilidade ao *D. farinae* (CHANTHICK et al. 2008)

No Brasil, a importância de *D. farinae* foi demonstrada em 28% dos 25 cães testados no IDT, sendo que a maior positividade nesse estudo foi para *T. putrescentiae* e *L. destructor*, cada um com 40% de reações positivas, além de 12% para *D. pteronyssinus* e *B. tropicalis* (CUNHA et al. 2007).

O grande percentual de positividade ao ácaro de armazenagem *B. tropicalis* (48,5%), se deve provavelmente ao fato desse ácaro ser altamente prevalente em regiões de clima tropicais, Cunha et al. (2012) observaram por *immunoblotting* que esse alérgeno é reconhecido pelo soro de cães com dermatite atópica residentes no Rio de Janeiro.

De acordo com vários autores, a importância das reações aos ácaros domiciliares é bem demonstrada. No entanto, nesse estudo, foi possível observar que pelo menos 40% dos animais testados no IDT e ELISA foram positivos ao pólen de *C. dactylon*. No Brasil, essa gramínea está relacionada às reações alérgicas em humanos e sua sensibilização pode ocorrer de forma isolada ou em associação com sensibilização a outros alérgenos perenes, como os da poeira domiciliar (do gênero *Dermatophagoides*), fungos e epitélio animal ou de barata (TAKETOMI et al. 2006). Alergologistas humanos reforçam que, nos estados do Sul do Brasil, é de suma importância que extrato de *C. dactylon* componha o teste alérgico, para que seja possível a realização de imunoterapia específica em indivíduos positivos (ROSÁRIO FILHO, 2012).

Ambos os testes foram utilizados para que fosse possível traçar o perfil de sensibilidade dos 58 cães participantes do estudo. Quando se realizou a análise estatística de Kappa, não foi possível observar correlação significativa entre o IDT e o sorológico. Assim, como descrito na literatura, são testes distintos, onde o IDT avalia IgE ligada ao mastócito na pele e o sorológico avalia IgE livre no soro (FOSTER et al. 2003).

CONCLUSÃO

Ácaros domiciliares e de produtos de armazenagem, representados pelas espécies *D. farinae*, *D. pteronissinus* e *B. tropicalis*, são as principais fontes de alérgenos para cães com dermatite atópica na região central do Rio Grande do Sul.

O pólen da gramínea da espécie *Cynodon dactylon*, apresentou alto percentual de cães sensibilizados, para tanto, sugere-se que a concentração de seu antígeno seja determinada por teste de limiar irritativo e que se realize de novos estudos de sensibilização.

Não foi observada correlação estatística entre os testes intradérmico e sorológicos utilizados neste estudo.

REFERÊNCIAS

- Bensignor, E. & Carlotti, D.N. Sensitivity patterns to house dust mites and forage mites in atopic dogs: 150 cases. *Veterinary Dermatology*, v. 13, p. 39-44, 2002.
- Buckley, L. et al. Cross-reaction and co-sensitization among related and unrelated allergens in canine intradermal tests. *Veterinary Dermatology*, v. 24, p. 422-e92, 2013.
- Calderon, M.A. et al. Multiple-allergen and single-allergen immunotherapy strategies in polysensitized patients: Looking at the published evidence. *Jornal Allergy Clinic Immunology*, v. 129, n. 4, p. 929-934, 2012.
- Chanthick, C. et al. The prevalence of positive intradermal allergy tests in 114 dogs with atopic dermatitis in the Bangkok metropolis, Thailand. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 126, p. 256-262, 2008.
- Cunha, V.E.S.; Silva, M.H. & Faccini, J.L.H. Serological identification of house dust mite allergens in dogs with atopic dermatitis. *Pesq. Vet. Bras.*, v. 32, n. 9, p. 917-921, 2012.
- Cunha, V.E.S. et al. Evaluation of skin sensitivity in dogs bearing allergic dermatitis to standardized allergenic extract of house dust and storage mites. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 27, p. 341-344, 2007.
- Deboer, D.J. & Marsella, R. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XII): the relationship of cutaneous infections to the pathogenesis and clinical course of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 81, p. 239-249, 2001.
- Farmaki, R. et al. Dust mite species in the households of mite-sensitive dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v. 23, p. 222-e45, 2012.
- Favrot, C. et al. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology*, v. 21, p. 23-30, 2010.
- Ferreira, R. R. 2013. Avaliação de diferentes concentrações de histamina e extratos alergênicos em cães sadios submetidos a teste intradérmico. Tese de doutorado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 52p.
- Foster, A.P. et al. Comparison of intradermal and serum testing for allergen-specific IgE using a FcεR1α-based assay in atopic dogs in the UK. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 93, p. 51-60, 2003.
- Halliwell, R. Revised nomenclature for veterinary allergy. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 114, p. 207-208, 2006.
- 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.
- Mueller, R.S. et al. Aero-allergens in canine atopic dermatitis in southeastern Australia based on 1000 intradermal skin tests. *Australian Veterinary Journal*, v. 78, p. 392-399, 2000.
- Olivry, T. et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary Dermatology*, v. 21, p. 233-248, 2010.
- Olivry, T. et al. Evaluation of a point-of-care immunodot assay for predicting results of allergen-specific intradermal and immunoglobulin E serological tests. *Veterinary Dermatology*, v. 16, p. 117-120, 2005.
- Rosário Filho, N.A. Alergia ao pólen de gramíneas: "back to the future". *Rev. bras. alerg. imunopatol.*, v. 35, p. 82-84, 2012.
- Saridomichelakis, M.N. et al. Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v.69, p. 61-73, 1999.
- Scott, D.W.; Muller, J.R. W.H. & Griffin, C. E. Skin immune system and allergic skin diseases. In: _____. *Small animal dermatology*. 6.ed. Philadelphia: Elsevier, 2001. chap. 8, p. 543-666.
- SPSS Inc. Released 2007. SPSS for Windows, Version 17.0. Chicago, SPSS Inc.
- Sture, G.H. Canine atopic disease: 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.
- Taketomi, E.A. et al. Pollen allergic disease: pollens and its major allergens. *Rev Bras Otorrinolaringol*, v. 72, p. 562-567, 2006.
- Thomas, W.R. Geography of house dust mite allergens. *Asian Pac J Allergy Immunol*, v. 28, p. 211-224, 2010.
- Vieira, F.M. Gramíneas tropicais alergênicas: *Cynodon dactylon* e *Paspalum notatum* – uma visão para o trópico brasileiro. *Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.*, v. 35, n. 1, p. 40-41, 2012.

Tabela 1. Percentual de sensibilidade dos principais antígenos testados

Antígeno	IDT* n (%)	ELISA** n (%)
<i>D. pteronyssinus</i>	8/33 (24,2%)	11/37 (29,7%)
<i>D. farinae</i>	11/33 (33,3%)	32/37 (86,5%)
<i>B. tropicalis</i>	16/33 (48,5%)	18/37 (48,6%)
<i>T. putrescentiae</i>	-----	21/37 (56,8%)
<i>A. sirus</i>	-----	11/17 (64,7%)
<i>L. destructor</i>	-----	5/17 (29,4%)
<i>C. dactylon</i>	14/33 (42,4%)	7/17 (41,2%)
<i>P. notatum</i>	7/33 (21,2%)	-----

*Teste intradérmico; ** Teste sorológico.

Tabela 2. Análise de concordância Kappa entre antígenos os testados no teste intradérmico e sorológico

Antígeno	Kappa	Valor p
<i>D. pteronyssinus</i>	0.06	0.639
<i>D. farinae</i>	0.06	0.531
<i>B. tropicalis</i>	0.169	0.169
<i>C. dactylon</i>	-0.1	Não é interpretável e não se aplica teste de significância

3 CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível concluir que a dermatite atópica canina é uma dermatose comum, podendo acometer de cães de diversas raças e que sua patogênese é multifatorial, envolvendo principalmente reação exacerbada do sistema imunológico e alterações na barreira epidérmica.

Os principais antígenos envolvidos na resposta alérgica de cães com dermatite atópica na região central do Rio Grande Sul são os ácaros domiciliares e de produtos de armazenagem, representados pelas espécies *D. farinae*, *D. pteronissinus* e *B. tropicalis*.

O pólen da gramínea da espécie *Cynodon dactylon*, apresentou alto percentual de cães sensibilizados, para tanto, sugere-se que a concentração de seu antígeno seja determinada por teste de limiar irritativo e que se realize de novos estudos de sensibilização.

Não foi observada correlação estatística entre os testes intradérmico e sorológicos utilizados neste estudo.

REFERÊNCIAS

CARLOTTI, D. N. Clinical signs of canine atopic dermatitis and concurrent diseases. **Proceedings of the 7th World Congress of Veterinary Dermatology and the World Association for Veterinary Dermatology**, v. 1, p. 58-66, 2012.

COSGROVE et al., A blinded, randomized, placebo-controlled trial of the efficacy and safety of the Janus kinase inhibitor oclacitinib (Apoquel[®]) in client-owned dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 587–e142, 2014.

CUNHA, V. E. S.; SILVA, M. H.; FACCINI, J. L. H. Serological identification of house dust mite allergens in dogs with atopic dermatitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 9, p. 917-921, 2012.

DETHIOUX, F. A dermatite atópica canina, um desafio para o clínico. **Focus – edição especial**. Dezembro de 2006.

FAVROT, C. et al. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 23-30, 2010.

FERREIRA, R. R. 2013. **Avaliação de diferentes concentrações de histamina e extratos alergênicos em cães sadios submetidos a teste intradérmico**. Tese de doutorado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS. 52p.

GERSHWIN, L. J. Comparative Immunology of Allergic Responses. **Annu. Rev. Anim. Biosci.** 2015.3. Downloaded from www.annualreviews.org. Access provided by Universidade Federal da Santa Maria on 01/16/15. For personal use only.

HALLIWELL, R. Revised nomenclature for veterinary allergy. **Veterinary Immunology and immunopathology**, v. 114, p. 207–208, 2006.

HIGHTOWER, K.; MARSELLA, R.; FLYNN-LURIE, A. Effects of age and allergen exposure on transepidermal water loss in a house dust mite-sensitized beagle model of atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 1, p. 89-96, 2010.

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.

LAI-CHEONG, J. E.; MCGRATH, J. A. Avanços no entendimento da base genética de doenças hereditárias monogênicas da barreira epidérmica: novas pistas para os principais genes que podem estar envolvidos na patogênese da dermatite atópica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 81, n. 6, Dec. 2006 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S03655962006000600009&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 15 Jan. 2015.

MARSELLA, R.; SAMUELSON, D.; DOERR, K. Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 1, p. 81-88, 2009.

MARSELLA, R.; NICKLIN, C. F. Intradermal skin test reactivity to histamine and substance P is blunted in dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 12, n.1, p. 149-154, 2001.

MEDLEAU, L.; HNILICA, K.A. Reações de Hipersensibilidade. In: _____. **Dermatologia de pequenos animais: atlas colorido e guia terapêutico**. Trad. Gabriela Scuta Fagliari. São Paulo: Roca, 2009. cap. 17, p. 157-186.

MULLER, W. H.; GRIFFIN, C. E.; CAMPBELL, K. L. Hypersensitivity Disorders In: _____. **Muller & Kirk's Small Animal Dermatology**, 7th ed. St. Louis, Mo.: Elsevier/Saunders, 2013. chap. 8, p. 363-431.

NUTTALL, T. Management of atopic dermatitis. **Veterinary Focus**, v. 18, n. 1, p. 32-39, 2008.

OLIVRY, T. et al. Evidence-based guidelines for anti-allergic drug withdrawal times before allergen-specific intradermal and IgE serological tests in dogs. **Veterinary Dermatology**, v.24, p. 225-e49, 2013.

OLIVRY, T. et al. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 233-248, 2010.

OLIVRY, T. et al. Evaluation of a point-of-care immunodot assay for predicting results of allergen-specific intradermal and immunoglobulin E serological tests. **Veterinary Dermatology**, v. 16, p. 117-120, 2005.

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.

SANTORO, D. et al. Altered mRNA and protein expression of filaggrin in the skin of a canine animal model for atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v.24, p. 329–e73, 2013.

SCOTT, D. W.; MULLER, JR. W. H.; GRIFFIN, C. E. Skin immune system and allergic skin diseases. In: _____. **Small animal dermatology**. 6.ed. Philadelphia: Elsevier, 2001. chap. 8, p. 543-666.

WHO POSITION PAPER. **Allergens immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases**, 1997. Disponível em: <http://www.eaaci.net/attachments/208_Diagnostics%202004%20Report.pdf>. Acesso em: 22 abr. 2010.

ZANON, J. P. et al. Dermatite atópica canina. **Semina: Ciênc. Agr.**, Londrina, v. 29, n. 4, p. 905-920, 2008.

ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA.

Projeto de pesquisa: “PERFIL DE SENSIBILIZAÇÃO DE CÃES ATÓPICOS NO RIO GRANDE DO SUL FRENTE A ANTÍGENOS AMBIENTAIS”.

O teste de reação cutânea para avaliação de alergia em cães consiste na aplicação de doses mínimas (0,05 ml) na região lateral do tórax, bem superficial da pele (intradérmica) e posterior análise de reação local. Primeiramente os pelos da região do tórax serão removidos com auxílio de máquina de tosa. Posteriormente, proceder-se-ão aplicações na pele com agulhas de calibre muito pequeno (0,25mm x 6mm) acopladas a seringas de 0,3 ml (insulina). Este procedimento envolve dor mínima ao animal. Não há necessidade de anestesia ou sedação, apenas contenção manual cuidadosa dos cães por aproximadamente 3 minutos. Sete aplicações serão realizadas no total. Após realização das aplicações, será realizada coleta de 5 ml de sangue da veia jugular ou cefálica para armazenamento e posterior realização de teste sorológico. Após 15 minutos, outra contenção manual, de aproximadamente 3 minutos, necessitará ser feita para leitura do teste. Um aparelho, chamado paquímetro (medidor de precisão), é posicionado próximo a pele, sem causar lesão, para realização das medições das pápulas (bolinhas, pequenas elevações da pele) que poderão ser observadas nos locais de aplicação. Essas normalmente desaparecerão em, no máximo uma hora após as aplicações. Há raros relatos de ocorrência de irritação local. Evidências de reações maiores, sistêmicas, que possam ocorrer durante ou após a realização do teste são raríssimas. Esse exame, portanto, é muito seguro para ser realizado em seu cão. O animal ficará em observação pela médica veterinária, mestranda, responsável pelo projeto durante todo o procedimento e por até 20 minutos após a realização do teste. Se por uma eventualidade, ocorrer qualquer complicação, seu animal receberá todos os cuidados médicos possíveis, sem oneração. Esse exame será gratuito, portanto, não haverá custo algum para participar do projeto.

Orientador de projeto: Alexandre Krause CRMV/RS 11364

Médica Veterinária, Mestranda – Desydere Trindade Pereira - CRMV/RS 11168

End. Av. Roraima, 1000, Universidade Federal de Santa Maria.

Tel. (55) 99293836.

Eu, _____, portador de
Carteira de Identidade _____ e CPF:
_____, concordo em participar do projeto de pesquisa
“PERFIL DE SENSIBILIZAÇÃO EM CÃES ATÓPICOS NO RIO GRANDE DO SUL
FRENTE A ANTÍGENOS AMBIENTAIS” juntamente com meu cão de nome
_____, raça _____, sexo _____ e idade
_____, ciente da realização da técnica utilizada. Declaro estar informado de que
em qualquer momento (antes ou durante a realização do teste) poderei desistir de participar do
projeto de pesquisa e que essa decisão não prejudicará no acompanhamento do meu animal
pela médica veterinária mestranda responsável, caso venha a ocorrer qualquer complicação.
Estou ciente de que não haverá custo algum para mim em participar desse estudo. Autorizo
fotografar meu animal durante o experimento e veicular as fotos em futuras publicações do
trabalho em revistas científicas ou em aulas e palestras.

Assinado: _____

Santa Maria, _____ de _____ de 2014.

ANEXO II

NORMAS DO PERIÓDICO: PESQUISA VETERINÁRIA BRASILEIRA

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Os trabalhos para submissão devem ser enviados por via eletrônica, através do e-mail <jurgen.dobereiner@pvb.com.br>, com os arquivos de texto na versão mais recente do Word e formatados de acordo com o modelo de apresentação disponível no site da revista (www.pvb.com.br). Devem constituir-se de resultados de pesquisa ainda não publicados e não considerados para publicação em outra revista.

Para abreviar sua tramitação e aceitação, os trabalhos sempre devem ser submetidos conforme as normas de apresentação da revista (www.pvb.com.br) e o modelo em Word (PDF no site). Os originais submetidos fora das normas de apresentação, serão devolvidos aos autores para a devida adequação.

Apesar de não serem aceitas comunicações (*Short communications*) sob forma de "Notas Científicas", não há limite mínimo do número de páginas do trabalho enviado, que deve, porém, conter pormenores suficientes sobre os experimentos ou a metodologia empregada no estudo. Trabalhos sobre Anestesiologia e Cirurgia serão recebidos para submissão somente os da área de Animais Selvagens.

Embora sejam de responsabilidade dos autores as opiniões e conceitos emitidos nos trabalhos, o Conselho Editorial, com a assistência da Assessoria Científica, reserva-se o direito de sugerir ou solicitar modificações aconselháveis ou necessárias. Os trabalhos submetidos são aceitos através da aprovação pelos pares (*peer review*).

NOTE: Em complementação aos recursos para edição da revista (impressa e online) e distribuição via correio é cobrada taxa de publicação (*page charge*) no valor de R\$ 250,00 por página editorada e impressa, na ocasião do envio da prova final, ao autor para correspondência.

1. Os trabalhos devem ser organizados, sempre que possível, em Título, ABSTRACT, RESUMO, INTRODUÇÃO, MATERIAL E MÉTODOS, RESULTADOS, DISCUSSÃO, CONCLUSÕES (ou combinação destes dois últimos), Agradecimentos e REFERÊNCIAS:

a) o **Título** do artigo deve ser conciso e indicar o conteúdo do trabalho; pormenores de identificação científica devem ser colocados em MATERIAL E MÉTODOS.

b) O(s) **Autor(es)** deve(m) sistematicamente encurtar os nomes, tanto para facilitar sua identificação científica, como para as citações bibliográficas. Em muitos casos isto significa manter o primeiro nome e o último sobrenome e abreviar os demais sobrenomes:

Paulo Fernando de Vargas Peixoto escreve Paulo V. Peixoto ou Peixoto P.V.; Franklin Riet-Correa Amaral escreve Franklin Riet-Correa ou Riet-Correa F.; Silvana Maria Medeiros de Sousa Silva poderia usar Silvana M.M.S. Silva, inverso Silva S.M.M.S., ou Silvana M.M. Sousa-Silva, inverso, Sousa-Silva S.M.M., ou mais curto, Silvana M. Medeiros-Silva, e inverso, Medeiros-Silva S.M.; para facilitar, inclusive, a moderna indexação, recomenda-se que os trabalhos tenham o máximo de 8 autores;

c) o **ABSTRACT** deverá ser apresentado com os elementos constituintes do RESUMO em português, podendo ser mais explicativos para estrangeiros. Ambos devem ser seguidos de "INDEX TERMS" ou "TERMOS DE INDEXAÇÃO", respectivamente;

d) o **RESUMO** deve apresentar, de forma direta e no passado, o que foi feito e estudado, indicando a metodologia e dando os mais importantes resultados e conclusões. Nos trabalhos em inglês, o título em português deve constar em negrito e entre colchetes, logo após a palavra RESUMO;

e) a **INTRODUÇÃO** deve ser breve, com citação bibliográfica específica sem que a mesma assuma importância principal, e finalizar com a indicação do objetivo do trabalho;

f) em **MATERIAL E MÉTODOS** devem ser reunidos os dados que permitam a repetição do trabalho por outros pesquisadores. Na experimentação com animais, deve constar a aprovação do projeto pela Comissão de Ética local;

g) em **RESULTADOS** deve ser feita a apresentação concisa dos dados obtidos. Quadros devem ser preparados sem dados supérfluos, apresentando, sempre que indicado, médias de várias repetições. É conveniente, às vezes, expressar dados complexos por gráficos (Figuras), ao invés de apresentá-los em Quadros extensos;

h) na **DISCUSSÃO** devem ser discutidos os resultados diante da literatura. Não convém mencionar trabalhos em desenvolvimento ou planos futuros, de modo a evitar uma obrigação do autor e da revista de publicá-los;

i) as **CONCLUSÕES** devem basear-se somente nos resultados apresentados no trabalho;

j) **Agradecimentos** devem ser sucintos e não devem aparecer no texto ou em notas de rodapé;

k) a Lista de **REFERÊNCIAS**, que só incluirá a bibliografia citada no trabalho e a que tenha servido como fonte para consulta indireta, deverá ser ordenada alfabeticamente pelo sobrenome do primeiro autor, registrando-se os nomes de todos os autores, em caixa alta e baixa (colocando as referências em ordem cronológica quando houver mais de dois autores), o título de cada publicação e, abreviado ou por extenso (se tiver dúvida), o nome da revista ou obra, usando as instruções do "Style Manual for Biological

Journals" (American Institute for Biological Sciences), o "Bibliographic Guide for Editors and Authors" (American Chemical Society, Washington, DC) e exemplos de fascículos já publicados (www.pyb.com.br).

2. Na elaboração do texto deverão ser atendidas as seguintes normas:

a) os trabalhos devem ser submetidos **segundo o exemplo de apresentação de fascículos recentes da revista e do modelo constante do site sob "Instruções aos Autores" (www.pyb.com.br)**. A digitalização deve ser na fonte **Cambria, corpo 10, entrelinha simples**; a página deve ser **no formato A4, com 2cm de margens** (superior, inferior, esquerda e direita), o texto deve ser corrido e não deve ser formatado em duas colunas, com as legendas das figuras e os Quadros no final (logo após as REFERÊNCIAS). As Figuras (inclusive gráficos) devem ter seus arquivos fornecidos separados do texto. Quando incluídos no texto do trabalho, devem ser introduzidos através da ferramenta "Inserir" do Word; pois imagens copiadas e coladas perdem as informações do programa onde foram geradas, resultando, sempre, em má qualidade;

b) a redação dos trabalhos deve ser concisa, com a linguagem, tanto quanto possível, no passado e impessoal; no texto, os sinais de chamada para notas de rodapé serão números arábicos colocados em sobrescrito após a palavra ou frase que motivou a nota. Essa numeração será contínua por todo o trabalho; as notas serão lançadas ao pé da página em que estiver o respectivo sinal de chamada. Todos os Quadros e todas as Figuras serão mencionados no texto. Estas remissões serão feitas pelos respectivos números e, sempre que possível, na ordem crescente destes. ABSTRACT e RESUMO serão escritos corridamente em um só parágrafo e não deverão conter citações bibliográficas.

c) **no rodapé da primeira página deverá constar endereço profissional completo de todos os autores e o e-mail do autor para correspondência, bem como e-mails dos demais autores (para eventualidades e confirmação de endereço para envio do fascículo impresso)**;

d) siglas e abreviações dos nomes de instituições, ao aparecerem pela primeira vez no trabalho, serão colocadas entre parênteses e precedidas do nome por extenso;

e) citações bibliográficas serão feitas pelo sistema "autor e ano"; trabalhos de até três autores serão citados pelos nomes dos três, e com mais de três, pelo nome do primeiro, seguido de "et al.", mais o ano; se dois trabalhos não se distinguem por esses elementos, a diferenciação será feita através do acréscimo de letras minúsculas ao ano, em ambos. **Trabalhos não consultados na íntegra pelo(s) autor(es), devem ser diferenciados, colocando-se no final da respectiva referência, "(Resumo)" ou "(Apud Fulano e o ano.)"**; a referência do trabalho que serviu de fonte, será incluída na lista uma só vez. A menção de comunicação pessoal e de dados não publicados é feita no texto somente com citação de Nome e Ano, colocando-se na lista das Referências dados adicionais, como a Instituição de origem do(s) autor(es). Nas citações de trabalhos colocados entre parênteses, **não se usará vírgula entre o nome do autor e o ano, nem ponto-e-vírgula após cada ano**; a separação entre trabalhos, nesse caso, se fará apenas por vírgulas, exemplo: (Christian & Tryphonas 1971, Priester & Haves 1974, Lemos et al. 2004, Krametter-Froetcher et al. 2007);

f) a Lista das **REFERÊNCIAS** deverá ser apresentada **isenta do uso de caixa alta**, com os nomes científicos em itálico (grifo), e **sempre em conformidade com o padrão adotado nos últimos fascículos da revista**, inclusive quanto à ordenação de seus vários elementos.

3. As Figuras (gráficos, desenhos, mapas ou fotografias) **originais devem ser preferencialmente enviadas por via eletrônica**. Quando as fotos forem obtidas através de câmeras digitais (com extensão "jpg"), os arquivos deverão ser enviados como obtidos (sem tratamento ou alterações). Quando obtidas em papel ou outro suporte, deverão ser anexadas ao trabalho, mesmo se escaneadas pelo autor. Nesse caso, cada Figura será identificada na margem ou no verso, a traço leve de lápis, pelo respectivo número e o nome do autor; havendo possibilidade de dúvida, deve ser indicada a parte inferior da figura pela palavra "pé". Os gráficos devem ser produzidos em 2D, com colunas em branco, cinza e preto, sem fundo e sem linhas. A chave das convenções adotadas será incluída preferentemente, na área da Figura; evitar-se-á o uso de título ao alto da figura. Fotografias deverão ser apresentadas preferentemente em preto e branco, em papel brilhante, ou em diapositivos ("slides"). Para evitar danos por grampos, desenhos e fotografias deverão ser colocados em envelope.

Na versão online, fotos e gráficos poderão ser publicados em cores; na versão impressa, somente quando a cor for elemento primordial a impressão das figuras poderá ser em cores.

4. As legendas explicativas das Figuras conterão informações suficientes para que estas sejam compreensíveis, (até certo ponto autoexplicativas, com independência do texto) e **serão apresentadas no final do trabalho**.

5. Os Quadros deverão ser explicativos por si mesmos e **colocados no final do texto**. Cada um terá seu título completo e será caracterizado por dois traços longos, um acima e outro abaixo do cabeçalho das colunas; entre esses dois traços poderá haver outros mais curtos, para grupamento de colunas. **Não há traços verticais. Os sinais de chamada serão alfabéticos, recomeçando, se possível, com "a" em cada Quadro**; as notas serão lançadas logo abaixo do Quadro respectivo, do qual serão separadas por um traço curto à esquerda.