



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

“AVALIAÇÃO DE UMA NOVA TÉCNICA EM ALERGOLOGIA VETERINÁRIA:  
TESTES CUTÂNEOS POR PICADA EM CÃES”

DANIELA FERREIRA MATIAS

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela  
Doutor José Henrique Duarte Correia  
Doutora Ana Mafalda G. X. Félix Lourenço Martins  
Dr.<sup>a</sup> Joana Vidal Pontes

ORIENTADOR

Doutora Ana Mafalda G. X.  
Félix Lourenço Martins

CO-ORIENTADOR

Dr.<sup>a</sup> Joana Vidal Pontes

2013

LISBOA

---





UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA  
Faculdade de Medicina Veterinária

“AVALIAÇÃO DE UMA NOVA TÉCNICA EM ALERGOLOGIA VETERINÁRIA:  
TESTES CUTÂNEOS POR PICADA EM CÃES”

DANIELA FERREIRA MATIAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Doutora Ana Cristina Gaspar Nunes Lobo Vilela  
Doutor José Henrique Duarte Correia  
Doutora Ana Mafalda G. X. Félix Lourenço Martins  
Dr.<sup>a</sup> Joana Vidal Pontes

ORIENTADOR

Doutora Ana Mafalda G. X.  
Félix Lourenço Martins

CO-ORIENTADOR

Dr.<sup>a</sup> Joana Vidal Pontes

2013

LISBOA

---

Aos meus pais,  
que me ajudaram a enfrentar todos os “testes” da vida.



## AGRADECIMENTOS

---

*“As palavras de amizade e conforto podem ser curtas e sucintas, mas o seu eco é infindável.” (Madre Teresa de Calcutá)*

Foram várias as pessoas que, de uma forma ou de outra, me ajudaram a alcançar mais um patamar da vida. Não esquecerei nenhuma delas e a todas quero deixar os meus sinceros agradecimentos:

- À minha orientadora, Professora Ana Mafalda Lourenço Martins, por me ter alimentado o “vício” da Dermatologia, pela paciência, pelas palavras animadoras e, sobretudo, pela confiança que sempre teve em mim.
- À minha co-orientadora, Dr.<sup>a</sup> Joana Vidal Pontes, pelas horas em que me cedeu o lugar junto do ecógrafo e por ter sido, com toda a paciência, a minha “sonda” nestes seis meses de estágio.
- À Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica e ao seu presidente, Dr. Mário Morais de Almeida, pela sua colaboração, por ter sido um entusiasta impulsionador da ideia que deu origem a este projecto e pelo patrocínio dos extractos alergénicos sem os quais este trabalho não teria sido possível.
- À Professora Teresa Villa de Brito, pela recepção e ajuda preciosa no laboratório de Endocrinologia da FMV-UTL.
- Ao Professor Telmo Nunes, pela incansável prestação de todos os esclarecimentos estatísticos.
- À Professora Berta São Braz e à Professora Esmeralda Delgado por toda a disponibilidade e simpatia.
- À Engenheira Adriana Belas, pela ajuda na “maratona dos alergénios” e por aparecer sempre no local certo, à hora certa.
- À colega e pioneira deste projecto, Dr.<sup>a</sup> M.<sup>a</sup> Inês Rocha, pelos esclarecimentos e disponibilidade.
- Ao Sr. Álvaro Mendes, por toda a paciência e ajuda com os cães do canil.
- A todos os Médicos Veterinários do Hospital Escolar da FMV-UTL por todo o conhecimento transmitido e pela paciência infindável.
- A todos os Enfermeiros e Auxiliares do Hospital Escolar da FMV-UTL pela ajuda sem a qual teria sido impossível sobreviver.
- A todas as estagiárias, que comigo percorreram este caminho, pelos bons e maus momentos juntas, pela amizade e companheirismo.
- A todas as verdadeiras amigas que encontrei na FMV-UTL e que, de certo, “levarei para a vida”, por tantos e tantos motivos, impossíveis de aqui descrever.

- À FMV-UTL, a faculdade que fez dos sonhos realidade, pela formação e criação de bons profissionais, aos quais espero vir a pertencer.
- Aos meus pais, pelos excelentes educadores que sempre foram, pelo apoio e confiança intermináveis ...pelo amor incondicional.
- Ao meu irmão, pela amizade que me ajudou a crescer ...pelo exemplo de vida.
- Ao meu namorado, por todo o amor, compreensão e paciência ... por “esperares por mim”.

---

### AVALIAÇÃO DE UMA NOVA TÉCNICA EM ALERGOLOGIA VETERINÁRIA:

#### TESTES CUTÂNEOS POR PICADA EM CÃES

A dermatite atópica (DA), uma das doenças alérgicas mais comuns no cão, é uma doença pruriginosa e inflamatória resultante da interação de factores genéticos, ambientais e imunológicos. Dada a incidência crescente e o impacto na qualidade de vida dos pacientes, o seu diagnóstico deve ser uma prioridade. Este deve ser baseado na história e sinais clínicos dermatológicos, aos quais se seguem a exclusão dos diagnósticos diferenciais, como é o caso da sarna sarcóptica. O tratamento é, sempre que possível, etiológico, além de sintomático. A selecção dos alergénios relevantes para cada paciente deve ser fundamentada em provas de sensibilização. Estas incluem testes cutâneos e/ou serológicos, sendo o teste intradérmico (TID) normalmente eleito. Em alergologia humana, este foi, praticamente, substituído pelo teste cutâneo por picada (TCP) que, para além de mais específico, permite uma execução mais simples, rápida, segura, económica e confortável. O principal objectivo deste estudo é averiguar se estas vantagens também se verificam nos cães.

Numa primeira fase, 10 cães não atópicos foram testados pela técnica de picada com 21 extractos alergénicos de uso em alergologia humana (ALK-Abelló®). Concluiu-se que as concentrações utilizadas, não sendo responsáveis por reacções irritantes nestes cães, podem ser aplicadas naqueles com DA. Antes dos testes, os mesmos animais foram, aleatoriamente, divididos em dois grupos: sedados e não sedados. Nestes últimos, durante e após os TCP, foi adaptada a forma abreviada da escala de dor de Glasgow, confirmando-se que a técnica é pouco dolorosa. Em ambos os grupos, as concentrações séricas de cortisol, antes e após os TCP, ficaram dentro dos valores normais de referência, pelo que a validade da técnica não parece ser comprometida por activação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal. Numa segunda fase, 13 cães atópicos foram sujeitos a TID com 28 extractos alergénicos (Greer Laboratories®) e, na mesma sessão, a TCP com os extractos da fase anterior. Todos os cães com DA desenvolveram reacções positivas nos TCP.

Os TCP parecem ser seguros e de fácil execução mesmo em cães não sedados. Os níveis de cortisol permaneceram dentro dos limites normais, antes e após os TCP, comprovando indirectamente que a técnica é pouco dolorosa. Os extractos da ALK-Abelló® não provocam reacções irritantes no cão. A elevada especificidade desta técnica relativamente aos TID poderá vir a ser um dos seus grandes benefícios. Estudos adicionais deverão ser desenvolvidos de forma a encontrar as concentrações óptimas para a introdução dos TCP em alergologia veterinária, uma vez que as usadas podem ser demasiado baixas. No entanto, os resultados são bastante promissores.

**Palavras-chave:** Testes cutâneos por picada; testes intradérmicos; dermatite atópica; cão.





### EVALUATION OF A NEW TECHNIQUE IN VETERINARY ALLERGOLOGY:

#### SKIN PRICK TESTS IN DOGS

Atopic dermatitis, one of the most common allergic conditions in the dog, is a pruritic and inflammatory disease resulting from the interaction of genetic, environmental and immunological factors. Of increasing incidence and with great impact on the patient quality of life, its recognition and treatment are of extreme importance. Diagnosis is based on compatible history and clinical signs and exclusion of other pruritic diseases, such as scabies. Whenever possible, etiological treatment should be used in addition to symptomatic. This implies knowledge of patient individual sensitizations, which can be achieved by skin or serological tests. In veterinary medicine, the intradermal test (ITD) is usually used. In human allergology, it was largely replaced by skin prick test (SPT) because of its higher specificity and practical reasons such as being easier to perform, safer, quicker and less expensive. Also, patients report less discomfort. In this study we want to perform this technique and see if advantages reported for Man also occur in the dog.

Initially (stage one), 10 non-atopic dogs were tested by SPT with 21 allergenic extracts for use in human allergology (ALK-Abelló®). We concluded that the concentrations used are not responsible for irritants false positive reactions in these dogs. Therefore, it can be applied in atopic dogs. Before testing, the same animals were randomly divided into two groups: sedated and non-sedated dogs. Adapted form of the Glasgow composite pain scale was applied to non-sedated-group during and after the SPT. This technique was shown to be well tolerated. In both groups, serum cortisol levels were within the normal reference values before and after the SPT; thus, the validity of the technique does not appear to be compromised by activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. In a second stage, we perform IDT with 28 allergenic extracts (Greer Laboratories®) and SPT with the extracts from the preceding stage in 13 sedated atopic dogs. All dogs with atopic dermatitis had some positive reactions in SPT.

SPT appear to be safe and easy to perform even in non-sedated dogs. Cortisol levels remained within normal limits before and after the procedure, indirectly implying no significant pain or discomfort was experienced. ALK-Abelló® human extracts didn't cause irritant reactions. Higher specificity of SPT comparing to IDT could be in the future one of the great benefits of this technique. Further studies are needed, especially regarding optimal concentrations of the extracts to be used in veterinary, before SPT could be proposed for routine use in veterinary allergology. Results are nevertheless very promising.

**Key-words:** Skin prick tests; intradermal tests; atopic dermatitis; dog.



<b>I. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1. Actividades desenvolvidas na área clínica.....	1
1.1. Medicina Interna .....	1
1.2. Cirurgia .....	2
1.3. Imagiologia .....	2
1.4. Internamento.....	2
1.5. Dermatologia .....	3
2. Desenvolvimento do trabalho de projecto.....	3
<b>II. Revisão Bibliográfica</b> .....	<b>4</b>
1. O cão no “mundo das alergias” .....	4
2. Prevalência e incidência da dermatite atópica .....	4
3. Fisiopatologia da dermatite atópica .....	5
3.1. Factores genéticos.....	6
3.2. Factores imunológicos .....	7
3.2.1. Sistema imunitário inato da pele.....	7
3.2.1.1. A barreira cutânea e as suas alterações na DAh .....	7
3.2.1.2. As alterações da barreira cutânea na DAc .....	9
3.2.1.3. As células do sistema imunitário inato .....	10
3.2.1.4. Os péptidos antimicrobianos.....	12
3.2.2. Sistema imunitário adquirido da pele.....	13
3.2.2.1. As imunoglobulinas.....	13
3.2.2.2. As células T .....	14
3.2.2.3. As células T reguladoras.....	16
3.2.3. O papel dos mediadores inflamatórios na DA.....	16
3.3. Principais aeroalergénios envolvidos na DAc.....	17
3.3.1. O caso particular dos ácaros domésticos .....	18
3.3.2. Vias de estimulação alérgica .....	19
3.4. Factores perpetuantes .....	19
3.4.1. Auto-traumatismo .....	19
3.4.2. Stress.....	20
3.4.3. Auto-alergénios .....	20
3.4.4. Infecções bacterianas.....	20
3.4.5. Infecções fúngicas.....	21
4. Diagnóstico clínico da dermatite atópica canina .....	22
4.1. História progressa e Exame físico.....	22
4.1.1. Sexo.....	23
4.1.2. Raça.....	23
4.1.3. Ambiente .....	24
4.1.4. Idade e início dos sinais clínicos .....	24
4.1.5. Sazonalidade.....	25
4.1.6. Sinais clínicos.....	25
4.1.7. Grau e limiar de prurido.....	27
4.2. Critérios de diagnóstico.....	28
4.3. Diagnósticos diferenciais .....	29
5. Provas de sensibilização .....	29
5.1. Testes in vivo .....	29
5.1.1. Testes cutâneos .....	29
5.1.1.1. Testes Intradérmicos .....	30
5.1.1.1.1. Testes intradérmicos em Medicina Humana .....	30
5.1.1.1.2. Testes intradérmicos em Medicina Veterinária .....	30
5.1.1.2. Testes percutâneos .....	36
5.1.1.2.1. Testes cutâneos por picada em Medicina Humana .....	36
5.1.1.2.2. Testes cutâneos por picada em Medicina Veterinária.....	42
5.1.1.3. Testes epicutâneos.....	44

5.1.1.3.1. Testes de contacto em Medicina Humana .....	44
5.1.1.3.2. Testes de contacto em Medicina Veterinária .....	44
5.1.2. Testes de provocação .....	45
5.2. Testes in vitro.....	45
5.2.1. Quantificação de IgE sérica total .....	45
5.2.2. Quantificação de IgE alérgico-específica.....	46
5.3. Testes serológicos versus Testes cutâneos.....	47
6. Tratamento da dermatite atópica canina.....	47
6.1. Tratamento etiológico.....	49
6.1.1. Evicção alérgica .....	49
6.1.2. Imunoterapia alérgico-específica .....	50
6.2. Prevenção primária.....	52
<b>III. Testes cutâneos por picada em cães .....</b>	<b>54</b>
1. Objectivos do estudo .....	54
2. Material e Métodos .....	54
2.1. Fase I.....	54
2.1.1. Selecção dos animais em estudo .....	54
2.1.2. Avaliação prévia das concentrações dos extractos a usar nos TCP .....	55
2.1.3. Determinação do grau de dor .....	55
2.1.4. Doseamento dos níveis de cortisol sérico.....	55
2.1.5. Análise estatística.....	56
2.2. Fase II.....	56
2.2.1. Selecção dos animais em estudo .....	56
2.2.2. Comparação entre duas técnicas de sensibilização cutânea: TID e TCP. ....	58
2.2.3. Análise estatística.....	58
2.3. Procedimentos adoptados nas provas alergológicas cutâneas usadas nas fases I e II do estudo .....	59
2.3.1. Testes intradérmicos .....	59
2.3.2. Testes cutâneos por picada.....	60
3. Resultados .....	62
3.1. Fase I.....	62
3.1.1. Características dos animais em estudo .....	62
3.1.2. Avaliação prévia das concentrações dos extractos a usar nos TCP .....	62
3.1.3. Avaliação do grau de dor.....	63
3.1.4. Doseamento do cortisol sérico.....	63
3.2. Fase II.....	64
3.2.1. Características dos animais em estudo .....	64
3.2.2. Resultados dos TID e dos TCP efectuados nos cães atópicos.....	65
4. Discussão.....	70
4.1. Fase I.....	70
4.1.1. Avaliação das concentrações dos extractos usados nos TCP .....	70
4.1.2. Facilidade de execução e grau de dor da técnica de picada em cães .....	71
4.1.3. Doseamento do cortisol sérico.....	73
4.2. Fase II.....	76
5. Conclusão .....	85
<b>Bibliografia.....</b>	<b>86</b>
<b>Anexo A .....</b>	<b>106</b>
<b>Anexo B .....</b>	<b>109</b>
<b>Anexo C .....</b>	<b>111</b>

## LISTA DE FIGURAS

---

Figura 1 - Células dendríticas marcadas pelo anticorpo CD1c na pele lesionada de um cão atópico - ABP, Hematoxilina de Harris, x40, detalhes x400 (Fotografia gentilmente cedida pela Prof. <sup>a</sup> Doutora Ana Mafalda Lourenço Martins). .....	12
Figura 2 - Representação esquemática da fisiopatogenia da DAC (Esquema gentilmente cedido pela Prof. <sup>a</sup> Doutora Ana Mafalda Lourenço Martins).....	15
Figura 3 - Representação esquemática do padrão lesional típico da DAC (Esquema gentilmente cedido pela Prof. <sup>a</sup> Doutora Ana Mafalda Lourenço Martins).....	25
Figura 4 - Reacções cutâneas obtidas, num cão atópico, 15 minutos após a injeção intradérmica de extractos alergénicos (fotografia original). .....	33
Figura 5 - Soluções (controlos e alergénios) e técnicas utilizadas nos TID e nos TCP (fotografias originais). .....	61
Figura 6 - Reacções cutâneas (a) e pormenor da reacção ao controlo positivo (b) obtidos num cão não atópico por TCP (fotografias originais).....	63
Figura 7 - Resultados positivos a alergénios de ácaros domésticos nos TID realizados num cão atópico (fotografia original).....	66
Figura 8 - Distribuição das sensibilizações registadas nos TID por grupos de alergénios. ....	66
Figura 9 - Respostas cutâneas à inoculação do controlo positivo por TID e TCP. ....	67
Figura 10 - Curva ROC para o valor de <i>cut-off</i> (1 mm).....	67
Figura 11 - Várias gotas depositadas sobre a superfície cutânea antes das respectivas picadas (fotografia original).....	71
Figura 12 - Lanceta metálica com ponta de 1 mm de penetração da ALK-Abelló® (fotografia original).....	72
Figura 13 - Reacções cutâneas aos alergénios de ácaros domésticos obtidas nos TID e nos TCP num cão com DA (fotografia original).....	80
Figura 14 - Respostas cutâneas aos ácaros do pó nos TID e nos TCP efectuados em cães atópicos. ....	82

## LISTA DE TABELAS

---

Tabela 1 - Raças caninas com maior risco relativo de dermatite atópica. ....	24
Tabela 2 - Critérios de diagnóstico para a DAc propostos por Favrot et al. (2010).....	28
Tabela 3 - Períodos de privação farmacológica a cumprir antes da realização dos TID.....	32
Tabela 4 - Causas de reacções falso-positivas e falso-negativas nos TID. ....	35
Tabela 5 - Métodos de medição e respectivos limites de positividade para os TCP em MH. 39	
Tabela 6 - Factores que influenciam o resultado dos TCP em pessoas. ....	40
Tabela 7 - Critérios de inclusão no grupo de cães não atópicos. ....	54
Tabela 8 - Critérios de exclusão no grupo de cães não atópicos. ....	54
Tabela 9 - Características dos animais incluídos na fase I do estudo. ....	62
Tabela 10 - Avaliação comportamental dos cães não atópicos não sedados durante e após os TCP (adaptação da <i>Short form of the Glasgow Composite Pain Scale</i> ). ....	63
Tabela 11 - Doseamento do cortisol sérico antes (T0) e após (T1) a realização de TCP em cães não atópicos. ....	64
Tabela 12 - Características dos animais incluídos na fase II do estudo. ....	64
Tabela 13 - Análise estatística dos resultados obtidos por TCP para os ácaros domésticos ( <i>cut-off</i> de 1 mm).....	68
Tabela 14 - Resultados dos TID e dos TCP obtidos nos 12 cães atópicos estudados. ....	69
Tabela 15 - Valores preditivos dos TCP para diversos alergénios em pacientes humanos. .	82
Tabela 16 - Valores preditivos dos TID para diversos alergénios em pacientes humanos. ..	83

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

- A. - Atópico  
*Aca s* - *Acarus siro*  
ASCIA - *Australasian Society of Clinical Immunology and Allergy*  
AUC - *Area Under the Curve*  
CL - Células de Langerhans  
CLA - *Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen*  
DA - Dermatite Atópica  
DAc - Dermatite Atópica canina  
DAh - Dermatite Atópica humana  
DAPP - Dermatite Alérgica à Picada da Pulga  
*Der f* - *Dermatophagoides farinae*  
*Der p* - *Dermatophagoides pteronyssinus*  
EC - Estrato Córneo  
ELISA - *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*  
E.U.A. - Estados Unidos da América  
F - Fêmea  
FcεRI - Receptor FC épsilon tipo I  
FMV-UTL - Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa  
Fr - Nível de concordância fraco  
GC - Glucocorticóides  
IC - Intervalo de Confiança  
IFN-γ - *Interferon-γ*  
Ig - Imunoglobulina  
ITAE - Imunoterapia alergénio-específica  
ITFCAD - *International Task Force on Canine Atopic Dermatitis*  
K - Nível de concordância  
*Lep d* - *Lepidoglyphus destructor*  
M - Macho  
Mo - Nível de concordância moderado  
MH - Medicina Humana  
MHC - *Major Histocompatibility Complex*  
MV - Medicina Veterinária  
NA. - Não Atópico  
N/A - Não Aplicável  
OMS - Organização Mundial de Saúde  
ORVA - Obstrução Recorrente das Vias Aéreas



P - Nível de concordância pobre  
PNU/ml - *Protein Nitrogen Units / ml*  
PRR - *Pattern Recognition Receptors*  
PTEA - Perda Transepidérmica de Água  
QP - Nível de concordância quase perfeito  
R - Nível de concordância razoável  
RCAOA - Reações cutâneas adversas de origem alimentar  
ROC - *Receiver Operating Characteristic*  
RR - Risco Relativo  
S - Nível de concordância substancial  
Se - Sensibilidade  
Sp - Especificidade  
SPAIC - Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica  
TCP - Testes Cutâneos por Picada  
TGF- $\beta$  - *Transformation Growth Factor- $\beta$*   
Th - T *helper*  
TID - Testes intradérmicos  
TNF- $\alpha$  - *Tumor Necrosis Factor- $\alpha$*   
Treg - Células T reguladoras  
Tyr p - *Tyrophagus putrescentiae*  
VPN - Valor Preditivo Negativo  
VPP - Valor Preditivo Positivo  
W/V - *Weight / Volume*  
WHWT - West Highland White Terrier  
5-LO - Enzima 5-lipoxigenase

## INTRODUÇÃO

---

As actividades que aqui serão resumidamente descritas foram desenvolvidas no âmbito do estágio curricular incluído no plano de estudos do curso de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Este teve lugar no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Técnica de Lisboa (FMV-UTL), sob a orientação da Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço Martins e co-orientação da Dr.<sup>a</sup> Joana Vidal Pontes.

A componente prática deste estágio foi realizada em duas fases distintas: a primeira, decorrida entre o dia 1 de Setembro de 2011 e o dia 29 de Fevereiro de 2012, num total de 1310 horas, teve como objectivo a obtenção de conhecimentos na área de clínica dos animais de companhia; a segunda consistiu na participação e acompanhamento de alguns dos serviços prestados pela equipa de alergologia do hospital e simultânea recolha de dados para a elaboração do presente trabalho de projecto.

### 1. ACTIVIDADES DESENVOLVIDAS NA ÁREA CLÍNICA

Na área dos animais de companhia, o Hospital Escolar da FMV-UTL providencia consultas de primeira e de segunda opinião, consultas de referência, internamento, cirurgia e urgências. Paralelamente, são ainda disponibilizados outros serviços, como a imagiologia, a quimioterapia e o banco de sangue.

Assim, e de forma a retirar o máximo benefício das horas dispendidas no hospital, as actividades de estágio foram distribuídas, de acordo com as principais áreas clínicas prestadas, em: medicina interna, cirurgia, imagiologia e internamento. Adicionalmente, foi possibilitada a participação em consultas das diversas especialidades (animais exóticos, cardiologia, comportamento animal, dermatologia, endocrinologia, neurologia, oftalmologia, oncologia e ortopedia); destas, devido ao interesse particular na área, foram as consultas de dermatologia as mais frequentadas (Anexo A).

#### 1.1. Medicina Interna

O acompanhamento das consultas de Medicina Interna permitiu a obtenção de competências práticas na elaboração de uma história pregressa e exame físicos completos. Em sequência destes, os diagnósticos diferenciais mais relevantes em cada caso clínico, o respectivo plano de diagnóstico e as eventuais intervenções terapêuticas foram discutidos com o médico veterinário responsável. Durante as consultas, foi possível a realização de diversos procedimentos como são exemplo a preparação e administração de vacinas, a colocação de *microchip*, a cateterização venosa ou a medição da pressão arterial. A colaboração em colheitas de sangue, urina, pêlos ou outro tipo de amostras necessárias à realização de exames complementares de diagnóstico foi igualmente efectuada.

## **1.2. Cirurgia**

Durante o mês de Janeiro, as actividades de estágio decorreram na área da cirurgia dos animais de companhia. Estas incluíram a participação nos procedimentos efectuados desde a recepção dos pacientes, como sejam a cateterização venosa; o cálculo, preparação e administração da medicação pré-cirúrgica e do indutor anestésico; a entubação endotraqueal; e a preparação do campo cirúrgico. No decorrer das cirurgias propriamente ditas, foi desempenhado o papel de circulante, anestesista, instrumentista ou ajudante de cirurgião, tendo havido ainda a oportunidade de realização de pequenos procedimentos cirúrgicos, como castração de felídeos, suturas de pele ou destartarização. Em todos os casos, seguiu-se o acompanhamento do animal até ao internamento e a sua monitorização pós-cirúrgica. As consultas de seguimento pós-operatórias permitiram, por sua vez, a prática de desinfectação de suturas, remoção de pontos e mudança de pensos cirúrgicos.

## **1.3. Imagiologia**

O serviço de imagiologia encontra-se dividido em três áreas principais: a radiologia, a tomografia axial computadorizada e a ecografia. Na radiologia, foi possível a obtenção de competências práticas específicas como o posicionamento dos animais para obtenção de diferentes planos radiográficos, a selecção da cassete radiográfica mais adequada ou a colimação do feixe primário. As actividades desenvolvidas na área da tomografia axial computadorizada passaram pelos procedimentos pré-anestésicos e monitorização do paciente durante e após a anestesia. As aptidões relativas à ecografia, desde o posicionamento e tricotomia adequada dos animais à realização do próprio exame ecográfico, foram adquiridas sob a orientação da Dr.<sup>a</sup> Joana Vidal Pontes; nesta área, foi dada ainda a oportunidade de assistir a procedimentos ecoguiados, como colheitas de urina por cistocentese, punções aspirativas por agulha fina e biopsias ecoguiadas. Em todos os casos, com base no conhecimento da história clínica de cada paciente, as imagens obtidas e o diagnóstico mais provável foram discutidos com o médico veterinário responsável pelo respectivo exame imagiológico.

## **1.4. Internamento**

As actividades no serviço de internamento do hospital foram realizadas em turnos de 24 horas e incluíram o fornecimento de cuidados básicos de higiene, de alimentação e de fisioterapia, bem como a monitorização dos pacientes. Outros procedimentos como a preparação e administração de fármacos, a cateterização venosa, a medição da pressão arterial e a colheita de sangue, de urina (por colheita livre ou por algaliação) ou de outro tipo de amostras biológicas tornaram possível um acompanhamento mais próximo de cada animal e o seguimento dos casos clínicos.

## 1.5. Dermatologia

A participação nas consultas de referência de dermatologia foi efectuada sob orientação da Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço Martins. Em todas elas, foi adoptado o seguinte plano de actividades: (1) recolha da anamnese; (2) realização do exame dermatológico; (3) discussão do caso clínico com a médica veterinária responsável e delineamento dos exames complementares de diagnóstico mais adequados; (4) execução e interpretação dos exames complementares, nomeadamente, citologias auriculares e cutâneas, tricogramas, raspagens cutâneas, observações com lâmpada de Wood, punções aspirativas com agulha fina de nódulos cutâneos, biopsias cutâneas, vídeo-otoscopias e provas alergológicas cutâneas; (5) discussão do plano terapêutico com o clínico responsável; (6) elaboração do relatório da consulta e esclarecimento do proprietário. As características dos animais seguidos nas consultas de dermatologia, bem como a casuística acompanhada neste serviço, encontram-se representadas no Anexo A.

A possibilidade de assistir às aulas da disciplina opcional “Abordagem à dermatologia baseada na evidência”, leccionada na FMV-UTL, contribuiu para a sistematização dos conhecimentos já adquiridos nesta área e para a obtenção de outros que, por questões de casuística, foram menos abordados.

## 2. DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO DE PROJECTO

De um total de 86 animais seguidos nas consultas de dermatologia, 51 obtiveram um diagnóstico presuntivo de dermatite atópica canina, pelo que foi esta a entidade clínica que maior interesse suscitou ao longo do estágio curricular. A possibilidade de acompanhar, durante o estágio, o serviço de alergologia do hospital, colaborando na execução de 20 provas alergológicas cutâneas, abriu portas à realização do trabalho de projecto intitulado “Avaliação de uma nova técnica em alergologia veterinária: testes cutâneos por picada em cães” que surge no seguimento de um estudo realizado no mesmo âmbito (Rocha, 2012).

O desenvolvimento deste projecto só foi possível devido ao patrocínio dos extractos alergénicos (ALK-Abelló®, Madrid, Espanha) pela Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica (SPAIC), através do seu presidente, Dr. Mário Morais de Almeida. Dada a impossibilidade de obter estes extractos durante o período de estágio curricular, a componente prática deste estudo foi efectuada *a posteriori*, não deixando, contudo, de acompanhar o serviço de alergologia do hospital. Deste modo, após uma revisão da bibliografia existente na área da dermatite atópica canina, com especial destaque para as provas alergológicas cutâneas disponíveis, será apresentado o estudo avaliativo de uma nova técnica para a realização de testes cutâneos em cães, terminando com a discussão dos resultados obtidos.

### 1. O CÃO NO “MUNDO DAS ALERGIAS”

Embora o cão possa apresentar conjuntivite (Lourenço-Martins et al., 2011) ou rinite atópica, a manifestação clínica de atopia mais comum nesta espécie é a dermatite atópica (DA) (Olivry, DeBoer et al., 2001). A dermatite atópica canina (DAc) foi recentemente definida como “a doença dermatológica alérgica, pruriginosa e inflamatória, com predisposição genética e com características clínicas típicas associadas a anticorpos IgE, direccionados normalmente contra alérgenos ambientais” (Halliwell, 2006, p. 207, tradução livre).

As grandes semelhanças entre o Homem e os animais relativamente à DA têm permitido que estes sejam usados como modelos para melhor compreender a patogenia da doença nas pessoas (Marsella & Olivry, 2003). Embora o rato seja o modelo tipicamente utilizado, o cão poderá vir a desempenhar um papel complementar importante, pois, para além de ser geneticamente similar, a doença ocorre de forma espontânea e com um quadro clínico em tudo semelhante ao do Homem. A fisiopatologia e o tipo/distribuição das lesões cutâneas aproximam-se bastante entre ambas as espécies, permitindo que o estudo das próprias intervenções terapêuticas seja feito, praticamente, de forma paralela (Marsella & Girolomoni, 2009; Lourenço-Martins, Peleteiro, Correia & Morais-Almeida, 2010).

No Homem, as doenças alérgicas são tipicamente caracterizadas por uma sequência de manifestações clínicas que podem permanecer durante um determinado período da vida e evoluir para a remissão espontânea com a idade, denominando-se este percurso por “marcha alérgica” (Wahn, 2000). Muitas vezes, a DA constitui apenas a primeira fase desta sequência, à qual se podem seguir a asma, a rinite alérgica ou a alergia alimentar (Leung, Boguniewicz, Howell, Nomura & Hamid, 2004; De Benedetto, Kubo & Beck, 2012). No cão, mesmo estando presentes sinais graves de DA, o quadro clínico não evolui para a asma como pode acontecer no Homem, pelo que não se fala em “marcha alérgica” canina (Marsella & Girolomoni, 2009).

### 2. PREVALÊNCIA E INCIDÊNCIA DA DERMATITE ATÓPICA

A dermatite atópica humana (DAh) afecta cerca de 10 a 20% das crianças e 3 a 5% dos adultos (Ring, Belloni & Behrendt, 2009), registando-se uma prevalência crescente (Leung et al., 2004; Ring et al., 2009), sobretudo nos países industrializados (Leung et al., 2004). Tal facto é, muitas vezes, associado à intitulada “hipótese higiene”, postulada por Strachan (1989). Segundo esta teoria, a ocorrência de infecções numa fase precoce da vida previne o desenvolvimento de doenças alérgicas, pelo que o aumento da expressão destas pode ser explicado pela melhoria das condições de higiene registada nas últimas décadas (Strachan, 1989). Um papel semelhante parece ser desempenhado pelas infestações parasitárias (Holt,

2000), mas factores socioeconómicos, como o número de irmãos ou os hábitos alimentares, evidenciaram ser, igualmente, importantes para o aparecimento de alergias no Homem (von Mutius, 2000). Nos últimos anos, a teoria inicial da higiene sofreu alguns desenvolvimentos, defendendo-se, actualmente, a existência dos “velhos amigos”, proposta por Rook (Rook & Standford, 1998; Rook & Brunet, 2005). Segundo este autor, alguns microrganismos não patogénicos, com os quais o Homem partilhou a sua história evolutiva, promovem a activação de células dendríticas e células T reguladoras (T reg), permitindo o controlo de reacções inflamatórias inapropriadas, típicas das doenças alérgicas (Rook & Brunet, 2005). A verdadeira prevalência da DAc permanece ainda desconhecida. Alguns autores apontam para valores na ordem dos 3 a 15% (Reedy, Miller & Willemse, 1997) ou cerca de 10% (Scott, Miller & Griffin, 2001), apresentando-se como a segunda doença alérgica mais comum no cão (Reedy et al., 1997; Scott et al., 2001) em países endémicos para pulgas. Uma vez que, para o estudo da prevalência da doença, diferentes variáveis devem ser consideradas, nomeadamente a região geográfica, a população em estudo, o serviço veterinário (consultas de primeira opinião/ consultas de referência) ou os critérios de diagnóstico (Hillier & Griffin, 2001), é difícil determinar a verdadeira prevalência da DAc. Muitos dos cães atópicos apresentam sinais clínicos ligeiros ou mais difíceis de reconhecer, quer pelos donos quer pelos próprios médicos veterinários, como estando relacionados com a doença (Hillier & Griffin, 2001; Scott et al., 2001).

À semelhança do que se tem vindo a registar em Medicina Humana (MH), suspeita-se que também na população canina se tem assistido a um aumento na incidência da DA (Hillier & Griffin, 2001; Nødtvedt, Egenvall, Bergvall & Hedhammar, 2006; Marsella & Girolomoni, 2009). Desconhece-se, porém, se os valores mais elevados dos últimos anos retratam uma maior sensibilidade dos médicos veterinários para o diagnóstico da doença ou se se tratam de verdadeiras implicações do actual estilo de vida dos animais de companhia (Marsella & Girolomoni, 2009). Afinal, o “melhor amigo do Homem” tem vindo a acompanhá-lo também no caminho evolutivo da vida, surgindo lado a lado nas sociedades modernas que hoje conhecemos (Lourenço-Martins et al., 2010). Tal facto acaba por se reflectir na maior exposição a alérgenos de interior e no aumento das práticas de desparasitação e vacinação dos animais, as quais têm sido apontadas como causas importantes para o aumento da frequência do diagnóstico da DAc (Frick & Brooks, 1983; Hillier & Griffin, 2001).

### **3. FISIOPATOLOGIA DA DERMATITE ATÓPICA**

A DA é uma doença multifactorial que resulta da interacção de factores genéticos, imunológicos e ambientais (Marsella & Olivry, 2003; Leung et al., 2004; Dokmeci & Herrick, 2008; Bieber & Novak, 2009; Kubo, Nagao & Amagai, 2012). Apesar de amplamente estudada, alguns mecanismos fisiopatológicos da doença ainda não foram demonstrados na

população canina (DeBoer, 2004), pelo que alguns dos aspectos apresentados de seguida serão baseados em estudos efectuados em modelos humanos.

### 3.1. Factores genéticos

No Homem, a base genética da DA tem sido alvo de diversos estudos, quer ao nível dos defeitos da barreira cutânea como das alterações registadas nos mecanismos imunitários (Bieber & Novak, 2009). No cão, uma vez que certas raças apresentam uma maior predisposição para desenvolverem a doença e que esta se encontra, muitas vezes, associada a uma história familiar, os factores genéticos também parecem desempenhar um papel importante (Sousa & Marsella, 2001).

Em 1983, um estudo tentou criar uma colónia de cães atópicos com o objectivo de investigar a contribuição destes factores no desenvolvimento da doença. Contudo, a descendência foi analisada durante dois anos e apenas 32 dos 70 animais que a constituíram apresentaram resultados positivos nos testes intradérmicos (TID) e/ou sinais clínicos compatíveis (Schwartzman, Massicot, Sogn & Cohen, 1983). Já em 1997, foi possível verificar que a produção de elevados níveis de imunoglobulina (Ig) E, em cães experimentalmente sensibilizados para aerolergénios, é uma característica genética transmitida de forma dominante (De Weck, Mayer, Stumper, Schiessl & Pickart, 1997).

Num trabalho posterior, DeBoer e Hill (1999) dedicaram-se ao estudo de cachorros West Highland White Terrier (WHWT), uma das raças predispostas para desenvolver DA. A concentração total de IgE foi medida entre as 6 e as 12 semanas de idade e os sinais clínicos foram analisados até aos 3 anos. Algumas ninhadas registaram indícios de que a doença pode ser transmitida à descendência, havendo uma elevada prevalência de cães aparentemente atópicos, mas não foi possível demonstrar uma heritabilidade evidente. Porém, em 2004, um novo estudo, que analisou 429 cães (Golden e Labrador Retriever), permitiu determinar uma heritabilidade de 0.47, sugerindo que os factores genéticos contribuem com cerca de 50% para a variabilidade da atopia, sendo os restantes 50% da responsabilidade de factores ambientais. Segundo os autores, a heritabilidade estimada para a população em estudo poderá ser registada noutras raças se as condições ambientais forem semelhantes (Shaw, Wood, Freeman, Littlewood & Hannant, 2004).

Outros investigadores (Wood et al., 2009) tentaram quantificar a expressão de genes importantes na formação da barreira cutânea e na função imunitária, analisando a pele de cães saudáveis e atópicos. Vários genes, com funções pró-inflamatórias ou relacionadas com as células T, apresentaram correlação com os TID e com a gravidade dos sinais clínicos. Na verdade, há ainda um longo caminho a percorrer no estudo genómico da DA e novos artigos continuam a ser publicados nesta área com o intuito de localizar os principais *loci* implicados no desenvolvimento da doença (Salzmann et al., 2011; Mullin, Carter, Williams, McEwan & Nuttall, 2012; Roque et al., 2012).

## 3.2. Factores imunológicos

O sistema imunitário pode ser definido como o “exército” que defende o organismo de qualquer tipo de “ataque” externo, actuando através de duas frentes principais: o sistema imunitário inato e o sistema imunitário adquirido. Estes sucedem-se um ao outro e interagem entre si através de um conjunto complexo de mecanismos imunológicos (Bangert, Brunner & Stingl, 2011; Wollenberg, Rärer & Schaubert, 2011).

O sistema imunitário inato é o primeiro a “avançar”: actua rapidamente, com pouca discriminação e sem capacidade de memória, sobre os agentes patogénicos e repara os danos tecidulares (Wollenberg & Klein, 2007; Dockmeci & Herrick, 2008; De Benedetto, Agnihotri, McGirt, Bankova & Beck, 2009; Bangert et al., 2011; Wollenberg et al., 2011). O sistema imunitário adquirido é a segunda linha de defesa, demora mais tempo a actuar e necessita de recombinação somática, mas é altamente específico e tem capacidade de memória (Wollenberg & Klein, 2007; Bangert et al., 2011; Wollenberg et al., 2011).

### 3.2.1. SISTEMA IMUNITÁRIO INATO DA PELE

Na pele, o sistema imunitário inato é representado pela barreira cutânea, várias células e elementos segregados, como os péptidos antimicrobianos (De Benedetto et al., 2009).

É através dos receptores para reconhecimento de padrões (*Pattern Recognition Receptors*; PRR), expressos por diversas células da pele (Bieber & Novak, 2009), que o sistema imunitário inato reconhece as estruturas moleculares, denominadas padrões moleculares associados a patogénicos, expressas pelos agentes patogénicos (Bangert et al., 2011). A activação dos PRR desencadeia a síntese de citocinas, quimoquinas e péptidos antimicrobianos, bem como a activação de diversas células essenciais à resposta imunitária (De Benedetto et al., 2009; Wollenberg et al., 2011). De entre os PRR estudados, destacam-se os *Toll-like receptors* (De Benedetto et al., 2009; Bangert et al., 2011), essenciais na indução da inflamação e na maturação das células dendríticas (De Benedetto et al., 2009). Modificações genéticas ao nível deste tipo de receptores já foram encontradas em pacientes atópicos, o que poderá explicar a reduzida capacidade de defesa destes indivíduos contra infecções bacterianas (Bieber & Novak, 2009).

#### 3.2.1.1. A barreira cutânea e as suas alterações na DAh

A epiderme constitui uma barreira física, química e imunológica que protege o organismo contra agentes externos (Proksch, Brandner & Jensen, 2008; Bangert et al., 2011). Nesta sua importante função, o papel de protagonista é partilhado por 3 elementos fundamentais: o estrato córneo (EC), as *tight junctions* e as células de Langerhans (CL); juntos, constroem um sistema de defesa extremamente bem organizado (Kubo et al., 2012).

A integridade do EC é mantida pelos queratinócitos, corneodesossomas e lípidos intercelulares (Marsella & Samuelson, 2009). Em resultado do seu processo de



diferenciação, os queratinócitos dão origem aos corneócitos, células anucleadas ricas em filamentos de queratina e cobertas por um envelope cornificado (Proksch et al., 2008). Estas encontram-se ligadas entre si através dos corneodesmosomas, um tipo modificado de desmosomas (Cork et al., 2006). Por sua vez, os lípidos intercelulares, constituídos maioritariamente por ceramidas, ácidos gordos e colesterol, estão organizados num sistema multilamelar que garante a retenção de água do EC (Elias & Menon, 1991; Feingold, 2007). Há muito que são reconhecidos defeitos ao nível da epiderme dos pacientes atópicos. Inicialmente, tais defeitos eram considerados como sendo um resultado de alterações imunológicas primárias; a patogenia da DAh era, então, explicada tendo em vista uma teoria “*inside-outside*”. Com os trabalhos de Elias e outros investigadores, foi proposto que alterações primárias da barreira cutânea possam, também elas, levar ao desenvolvimento da doença, surgindo uma nova visão, conhecida como “*outside-inside*”. Assim, foi desenvolvido um corpo de evidência que defende que a inflamação cutânea que caracteriza a DAh resulta de defeitos primários ao nível da epiderme, os quais podem activar o sistema imunitário e este, por sua vez, comprometer a permeabilidade e função barreira da pele, completando-se o ciclo “*outside-inside-outside*” (Elias & Feingold, 2001; Elias & Steinhoff, 2008; Elias, Hatano & Williams, 2008; Elias & Schmuth, 2009).

As irregularidades na função barreira podem ter uma base genética ou adquirida (Elias et al., 2008; De Benedetto et al., 2009; Elias & Schmuth, 2009; De Benedetto et al., 2012) e a exacerbação de tais defeitos pode surgir devido à presença de determinados factores ambientais, facilitando o desenvolvimento de novas sensibilizações e infecções cutâneas (Bieber & Novak, 2009; De Benedetto et al., 2009; Kubo et al., 2012).

De facto, vários estudos têm evidenciado a base genética dos defeitos da barreira cutânea (Cork et al., 2006; De Benedetto et al., 2009; Ogg, 2009), muitos deles relacionados com mutações como as que ocorrem nos genes responsáveis pela expressão da filagrina (Palmer et al., 2006; Howell et al., 2007). Esta constitui o principal componente dos grânulos de hialina das camadas mais externas da epiderme (Elias & Schmuth, 2009) e a sua ausência ou redução altera a permeabilidade da pele, aumentando a perda transepidérmica de água (PTEA) (Elias et al., 2008; Elias & Schmuth, 2009), isto é, o movimento natural da água do EC para a atmosfera (Madison, 2003; Proksch et al., 2008). Contudo, tendo em conta que as mutações nos genes da filagrina não estão presentes na maioria dos pacientes atópicos e que nem todos os indivíduos com este tipo de mutações desenvolvem DAh, muito provavelmente outros factores genéticos desempenham papéis importantes ao nível da função barreira da pele (De Benedetto et al., 2012; Kubo et al., 2012).

Por outro lado, as anomalias na barreira cutânea também podem ser adquiridas. É o caso da deficiência em filagrina que surge em resultado da sobre-expressão de citoquinas produzidas pelas células T *helper* (Th) 2 (Howell et al., 2007). A excessiva descamação do EC foi, igualmente, associada a uma resposta imunitária do tipo Th2, na qual níveis

elevados de eosinófilos e de IgE se fazem acompanhar de sinais clínicos típicos de DA (De Benedetto et al., 2012). Qualquer dano provocado no EC pode diminuir o grau de hidratação deste e alterar as características das estruturas lipídicas que o constituem, interferindo no processo de descamação (Madison, 2003).

Outra das grandes áreas de investigação, com múltiplos estudos publicados desde a década de cinquenta, corresponde à avaliação do pH da superfície cutânea dos pacientes atópicos. A alcalinização da pele que ocorre na DA, para além de favorecer o crescimento bacteriano, tem uma grande influência nos processos enzimáticos inerentes ao metabolismo lipídico, contribuindo indirectamente para o agravamento dos defeitos da barreira cutânea (Rippke, Schreiner, Doering & Maibach, 2004).

Actualmente, sabe-se, porém, que as anomalias da pele atópica não ocorrem apenas ao nível do EC. Também nas *tight junctions*, junções intercelulares constituídas por complexos multiproteicos (De Benedetto et al., 2009), já foram encontradas algumas alterações, nomeadamente num dos seus maiores componentes, a claudina-1 (De Benedetto et al., 2012; Kubo et al., 2012). A reduzida expressão desta, verificada na epiderme dos pacientes atópicos, pode mesmo predispor a uma resposta Th2 (De Benedetto et al., 2011).

Independentemente da forma como surgem, os defeitos cutâneos facilitam a penetração de alergénios através do EC e desencadeiam a activação das CL e a conseqüente captura de alergénios (Cork et al., 2006; De Benedetto et al., 2012; Kubo et al., 2012). Trata-se, portanto, de um ciclo vicioso, pois a penetração dos alergénios na barreira cutânea alterada desencadeia inflamação, a qual, por sua vez, pode ser responsável por alterações na integridade da pele (Leung, 2000; Kubo et al., 2012). Contudo, não é só a permeabilidade cutânea que se encontra comprometida; também a barreira antimicrobiana pode estar alterada nos pacientes atópicos (Elias et al., 2008), favorecendo a ocorrência de infecções secundárias que agravam os defeitos cutâneos (Elias et al., 2008; Elias & Schmuth, 2009).

### **3.2.1.2. As alterações da barreira cutânea na DAc**

O conhecimento dos defeitos cutâneos registados nos pacientes atópicos caninos é ainda limitado, mas a utilização da microscopia electrónica de transmissão permitiu alguns avanços no estudo das alterações epidérmicas (Marsella & Samuelson, 2009) e, hoje, sabe-se que:

- A deposição das lamelas lipídicas presentes no EC é bastante mais heterogénea nos cães com DA (Inman, Olivry, Dunston, Monteiro-Riviere & Gatto, 2001; Marsella, Samuelson & Doerr, 2010; Popa et al., 2011), sendo a continuidade e espessura das mesmas lamelas significativamente menores comparativamente à pele normal (Inman et al., 2001).
- Os espaços intercelulares do EC dos cães atópicos encontram-se aumentados e com conteúdo lipídico, enquanto os corneócitos apresentam corpos lamelares no seu interior (Marsella et al., 2010).

- Parte das alterações da função barreira da pele pode ser explicada pelo aumento da PTEA; este está correlacionado com a reduzida quantidade de ceramidas intercelulares encontrada no EC dos cães atópicos (Shimada, Yoon, Yoshihara, Iwasaki & Nishifugi, 2009; Popa et al., 2011), inclusivamente na pele não lesionada (Reiter, Torres & Wertz, 2009).

- Níveis elevados de colesterol na composição do EC dos cães atópicos podem contribuir para as alterações da sua barreira lipídica (Reiter et al., 2009; Popa et al., 2011).

- Os defeitos na barreira lipídica da epiderme se devem, provavelmente, a uma disfunção de duas enzimas ( $\Delta$ -5 desaturase e  $\Delta$ -6 desaturase), cuja expressão genética demonstrou ser inferior na pele lesionada dos indivíduos com DAc (Schlotter et al., 2009).

- Alterações na expressão da filagrina são comuns na pele lesionada e não lesionada dos cães atópicos (Marsella, Samuelson & Harrington, 2009; Chervet et al., 2010; Roque, O'Leary, Kyaw-Tanner, Duffy & Shipstone, 2011). Adicionalmente, a reduzida expressão de mRNA para a filagrina (Roque et al., 2011) e a ausência do C terminal desta proteína (Chervet et al., 2010), verificadas em alguns dos animais afectados, sugerem que, também na população canina, a deficiência em filagrina se possa dever a mutações genéticas.

Assim, à semelhança do proposto para a DAh, a patogenia da DAc não é explicada apenas por alterações imunológicas primárias (*inside/outside*), incluindo também defeitos básicos na barreira cutânea (*outside/inside*) (Marsella & Samuelson, 2009). Actualmente, considera-se que as irregularidades cutâneas primárias são responsáveis pela perpetuação dos sinais clínicos, pois tais anomalias predispõem o animal a novas sensibilizações e a alterações na própria resposta imunitária (Marsella & Girolomoni, 2009; Marsella & Samuelson, 2009).

Em suma, a perda da função barreira da pele parece desempenhar, tal como acontece no Homem, um papel importantíssimo no desenvolvimento da doença no cão, contribuindo para o agravamento dos sinais clínicos da mesma. Aliás, a própria terapêutica tópica é usada por muitos dermatologistas em casos ligeiros a moderados de DAc, não só para remoção dos alergénios da pele como para restabelecimento da função barreira normal (DeBoer, 2004; Marsella & Samuelson, 2009). Infelizmente, o pêlo dos animais dificulta a utilização de emolientes tópicos, constituindo ainda um dos grandes desafios nesta área de investigação. O recente desenvolvimento de aplicadores *spot-on* contendo ceramidas, colesterol e ácidos gordos trouxe alguma esperança ao manejo clínico da DAc (Fujimura, Nakatsuji, Fujiwara, Rème & Gatto, 2011), mas a extensão dos seus benefícios continua por comprovar.

### 3.2.1.3. As células do sistema imunitário inato

Na DA, o número ou função das células cutâneas pertencentes ao sistema imunitário inato podem encontrar-se alterados. De entre as mais relevantes encontram-se os neutrófilos, as células *natural killer*, os mastócitos, os queratinócitos e as células apresentadoras de antígenos (De Benedetto et al., 2009).

Os neutrófilos são conhecidos pelo papel fundamental que desempenham na resposta imunitária inicial contra os agentes patogénicos. Porém, mesmo em casos de infecção cutânea ou de auto-traumatismo graves, surgem em pequenas quantidades na pele atópica lesionada, o que aumenta ainda mais a susceptibilidade dos pacientes atópicos para infecções cutâneas (De Benedetto et al., 2009). Níveis reduzidos destas células foram igualmente encontrados em cães atópicos (Olivry, Naydan & Moore, 1997).

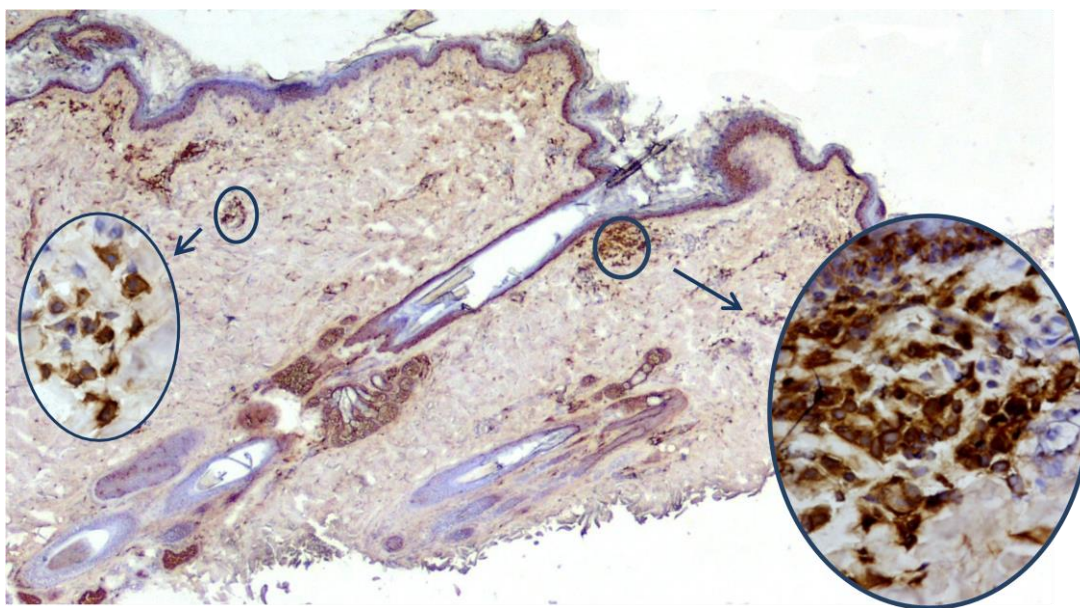
As células *natural killer* têm como principal função desencadear a lise das células do hospedeiro quando estas, ao serem infectadas por microrganismos, perdem as moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (*Major Histocompatibility Complex*; MHC) classe I (De Benedetto et al., 2009; Bangert et al., 2011). Permitem, ainda, direccionar a resposta imunitária, pois têm capacidade de induzir a maturação das células dendríticas (Dokmeci & Herrick, 2008). No paciente atópico, podem surgir em número reduzido ou com alterações na sua função (De Benedetto et al., 2009).

Os mastócitos têm um importante papel nas reacções de hipersensibilidade; a libertação do conteúdo dos seus grânulos surge após a ligação cruzada entre a IgE e os antigénios, à sua superfície (Bangert et al., 2011). Porém, a sua actividade parece ser relevante não só numa fase imediata, mas também numa fase tardia da resposta ao antigénio, pois a sua activação induz o aumento da permeabilidade vascular e a libertação de mediadores que favorecem o recrutamento de outras células inflamatórias (Becker, Chung, McDonald, Frick & Gold, 1988). Embora seja consensual a participação dos mastócitos nas reacções IgE mediadas, muitos dos aspectos relativos à sua associação com as doenças alérgicas caninas continuam por definir (De Mora, Puigdemont & Torres, 2006). Enquanto alguns autores afirmam que estas células se encontram em níveis mais elevados na pele dos indivíduos com DAc (Wilkie, Yager, Eyre & Parker, 1990), outros consideram que a densidade destas é aproximadamente igual entre atópicos e não atópicos (Welle, Olivry, Grimm & Suter, 1999; Lourenço-Martins, 2010), existindo apenas diferenças entre a pele lesionada e não lesionada de cães com DA (Lourenço-Martins, 2010). Aliás, aquilo que verdadeiramente parece distinguir os mastócitos dos cães com DA é a maior capacidade que possuem para libertação de histamina (De Mora, García, Puigdemont, Arboix & Ferrer, 1996; Jackson, Miller & Halliwell, 1996). Por outro lado, nos cães atópicos com piodermite concorrente, estas células revelaram-se significativamente aumentadas (Lourenço-Martins, 2010).

Os queratinócitos são células da epiderme que, para além de importantes constituintes da barreira física, são capazes de produzir péptidos antimicrobianos, componentes do complemento, quimoquinas, citoquinas, entre outros (Bangert et al., 2011). As citoquinas por eles produzidas permitem o recrutamento de células inflamatórias e activação das células apresentadoras de antigénios (DeBoer, 2004; De Benedetto et al., 2012), sendo, por isso, relevantes na manutenção da inflamação cutânea na DA (Barata, 1999).

Na pele, as células apresentadoras de antígenos incluem as CL (epiderme) e as células dendríticas dérmicas (derme), representadas na Figura 1. Ambas se caracterizam por um aumento da expressão do receptor FC épsilon tipo I (FcεRI), o receptor de alta afinidade para a IgE, o qual permite a captura dos alérgenos que penetram através da pele lesionada (Bonkobara et al., 2005). Após captura e fragmentação dos antígenos, estas células transferem os epítopos para a sua superfície e migram até ao linfonodo local onde apresentam os antígenos aos linfócitos T, desenvolvendo-se uma resposta antígeno-específica (Leung, 2000; Leung & Bieber, 2003; Novak, Bieber & Leung., 2003; DeBoer, 2004; Boguniewicz & Leung, 2006; Dokmeci & Herrick, 2008; Bangert et al., 2011; De Benedetto et al., 2012). A activação dos FcεRI é também responsável pela libertação de uma série de quimoquinas, que permitem o recrutamento de outras células inflamatórias (Novak et al., 2003; Dokmeci & Herrick, 2008). Nas lesões atópicas, as células apresentadoras de antígenos surgem em níveis elevados, aumentando assim a possibilidade de interacção com as células T (Olivry, Moore, Affolter & Naydan, 1996; Barata, 1999).

**Figura 1** - Células dendríticas marcadas pelo anticorpo CD1c na pele lesionada de um cão atópico - ABP, Hematoxilina de Harris, x40, detalhes x400 (Fotografia gentilmente cedida pela Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Mafalda Lourenço Martins).



#### 3.2.1.4. Os péptidos antimicrobianos

Os péptidos antimicrobianos (esfingosina, dermcidina, vitamina D, entre outros) permitem a destruição de bactérias, fungos e alguns vírus que consigam ultrapassar a superfície cutânea danificada (Wollenberg & Klein, 2007; De Benedetto et al., 2009). Contudo, certas proteases e toxinas produzidas por *Staphylococcus aureus* conseguem sobrepor-se à sua acção (De Benedetto et al., 2009). E, de facto, a elevada incidência deste tipo de infecções

nos pacientes humanos atópicos era, até há pouco tempo, explicada pela reduzida produção de péptidos antimicrobianos na pele destes indivíduos (Wollenberg & Klein, 2007). Porém, estudos recentes põem de lado esta hipótese e apelam à necessidade de uma investigação mais profunda nesta área (Gläser et al., 2009; Harder et al., 2010). De forma semelhante, também na população canina está instalada a controvérsia (van Damme, Willemse, van Dijk, Haagsman & Veldhuizen, 2009; Santoro, Marsella, Bunick, Graves & Campbell, 2011).

### **3.2.2. SISTEMA IMUNITÁRIO ADQUIRIDO DA PELE**

As células características do sistema imunitário adquirido são os linfócitos, cujas funções determinam dois tipos de resposta imunitária distintos: a resposta humoral, levada a cabo pelas células B (produção de imunoglobulinas); e a resposta celular, protagonizada pelas células T (reconhecimento de antígenos, produção de citocinas, citotoxicidade e interacção com outras células inflamatórias) (Hill & Olivry, 2001; Bangert et al., 2011).

#### **3.2.2.1. As imunoglobulinas**

Os anticorpos permitem a amplificação da resposta imunitária, quer pela captura e apresentação de antígenos às CL, como pela interacção com os alérgenos na superfície dos mastócitos e basófilos (Halliwell & DeBoer, 2001). De facto, a IgE, classicamente associada às reacções de hipersensibilidade tipo I, como é exemplo a DA (Scott et al., 2001), tem um papel importante na apresentação de antígenos ao nível da epiderme, contribuindo para o desenvolvimento de uma resposta imunitária anormal (Halliwell & DeBoer, 2001).

A maioria dos pacientes atópicos humanos possui níveis de IgE total elevados comparativamente aos indivíduos não atópicos, como consequência do desenvolvimento de uma resposta imunitária onde predominam as citocinas Th2, nomeadamente as interleucinas (IL) 4 e 13, responsáveis pela indução da síntese desta imunoglobulina (Dokmeci & Herrick, 2008). A IgE canina, embora antigenicamente semelhante à IgE humana (Halliwell, Schwartzman & Rockey, 1972), surge nos cães em níveis mais elevados do que no Homem, provavelmente devido à presença de IgE induzida por parasitas (Hill, Moriello & DeBoer, 1995). Por outro lado, não há diferenças significativas relativamente aos valores de IgE alérgeno-específica entre cães atópicos e não atópicos, isto é, na ausência de sinais clínicos típicos, concentrações elevadas de IgE não implicam, necessariamente, o diagnóstico de DAc (Jackson et al., 1996). Segundo alguns autores, tais achados devem-se apenas à heterogeneidade da IgE canina, havendo um subtipo implicado nas reacções alérgicas (Lian & Halliwell, 1998). E, de facto, não há dúvida que a IgE é importante na fisiopatologia da DAc, nomeadamente na apresentação e captura de antígenos, tendo sido demonstrada a sua ligação às CL (Olivry et al., 1996).

### 3.2.2.2. As células T

A resposta celular é, habitualmente, dividida em dois grupos de células, definidos com base na expressão das citocinas produzidas (Leung, 1999; Leung, 2000; Dokmeci & Herrick, 2008): as células Th1, associadas à produção de IL-2, interferão-gama (*Interferon-γ*; IFN-γ) e factor de necrose tumoral alfa (*Tumor Necrosis Factor-α*; TNF-α), estimulam a resposta celular; as células Th2, associadas à produção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 e IL-15, favorecem uma resposta predominantemente humoral (Dokmeci & Herrick, 2008; Bangert et al., 2011). As células Th1 desenvolvem-se na presença de IL-12; as Th2 surgem em resposta à IL-4 (Leung, 1999; Leung, 2000; Dokmeci & Herrick, 2008; Bangert et al., 2011).

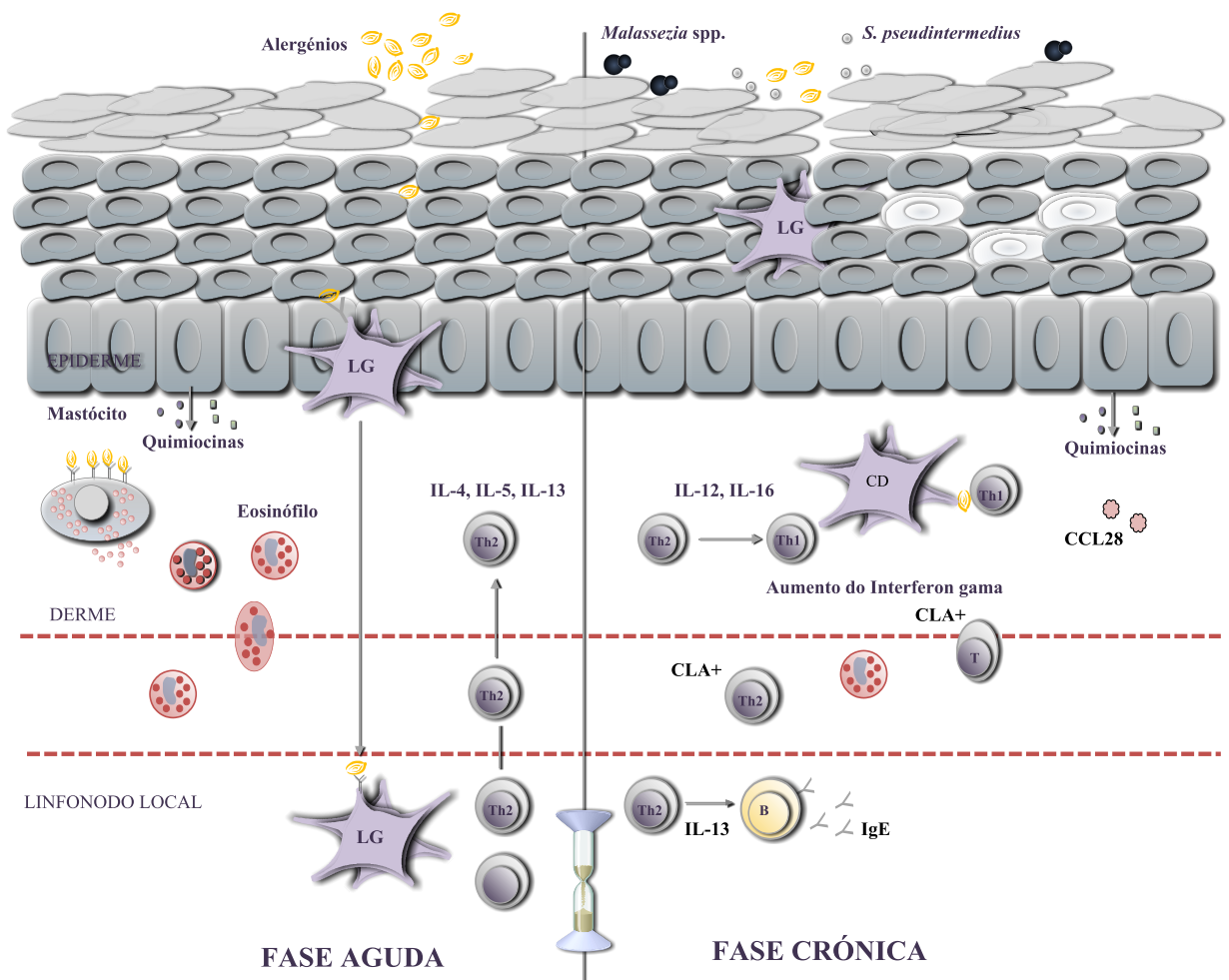
Na DA, o predomínio de um ou de outro tipo de células depende da cronicidade da doença. Na primeira exposição aos alérgenos (fase de sensibilização) é induzida uma resposta Th2, a qual é amplificada nas exposições seguintes (fase efectora). Este tipo de resposta imunitária caracteriza-se por produção de citocinas tipicamente Th2, produção e activação de eosinófilos e mastócitos e síntese de IgE alérgeno-específica (Novak et al., 2003; Dokmeci & Herrick, 2008; De Benedetto et al., 2012). Para além das células Th2, na fase aguda estão também presentes as células Th17, associadas à produção de IL-17A, IL-17F, IL-22 e IL-26 e cuja diferenciação pode ser inibida pelo IFN-γ e pela IL-4 (Bangert et al., 2011). Numa segunda fase, surge uma resposta Th1 (Novak et al., 2003; Dokmeci & Herrick, 2008).

Para que as células T façam parte do infiltrado lesional característico da DA, necessitam de migrar, através do epitélio vascular cutâneo, até à derme. A migração transendotelial só é, contudo, efectuada graças à interacção entre uma série de moléculas de adesão leucocitária e o antígeno associado aos linfócitos cutâneos (*Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen*; CLA) expresso pelas células T (Barata, 1999). Para a activação das moléculas de adesão na superfície das células endoteliais são essenciais mediadores pró-inflamatórios, como a IL-1 e o TNF-α, que resultam da resposta inflamatória (Santamaria-Babí, 2004). Na DA, a circulação das células T CLA<sup>+</sup>, úteis no reconhecimento dos alérgenos, correlaciona-se com o quadro clínico da doença (Santamaria-Babí, 2004), encontrando-se, normalmente, em níveis elevados no sangue dos pacientes atópicos (Leung, 2000; Dokmeci & Herrick, 2008). O CLA é, por isso, referido como o condutor das células T de memória para a pele (Novak et al., 2003; Santamaria-Babí, 2004; Dokmeci & Herrick, 2008).

Na pele dos cães com DA sabe-se que predominam, igualmente, as citocinas características de uma resposta do tipo Th2 (Olivry, Dean, Tompkins, Dow & Moore, 1999). Nos pacientes caninos foram, ainda, reportados níveis de IL-4, IL-2, IFN-γ e TNF-α significativamente superiores, enquanto a expressão de IL-6, IL-10 e IL-12 não apresentou diferenças significativas entre atópicos e não atópicos. Além disto, nos indivíduos com DAC os níveis do factor de crescimento transformante beta (*Transformation Growth Factor-β*; TGF-β) revelaram-se significativamente inferiores à sua expressão nos cães saudáveis, o

que fez com que os autores do estudo colocassem a hipótese de que nas fases iniciais da doença exista uma sobre-expressão de IL-4 e uma redução na expressão de TGF- $\beta$  (Nuttall, Knight, McAleese, Lamb & Hill, 2002). Num outro estudo, as quimoquinas tóxicas e reguladoras de activação revelaram ser altamente específicas da pele lesionada dos cães atópicos, sugerindo um papel importante na patogenia da DAC. A expressão destas demonstrou estar associada à expressão das citocinas inflamatórias IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . A IL-4 não foi, contudo, detectada em nenhuma das amostras deste estudo, o que se poderá ter devido à cronicidade das lesões utilizadas, sugerindo-se, uma vez mais, que o perfil de citocinas produzido possa ser alterado consoante a evolução das lesões, como aliás acontece nas lesões crónicas de dermatite atópica no homem (Maeda et al., 2002). Na Figura 2 encontram-se esquematizados os principais mecanismos fisiopatológicos ocorridos na DAC.

**Figura 2** - Representação esquemática da fisiopatogenia da DAC (Esquema gentilmente cedido pela Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Mafalda Lourenço Martins).



B - Linfócitos B; CD - Células dendríticas; CLA - *Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen*; LG - Células de Langerhans; IgE - Imunoglobulina E; IL – Interleucina; Th - Linfócitos T *helper*.



### **3.2.2.3. As células T reguladoras**

As células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, caracterizadas pela expressão do factor de transcrição Foxp3, desempenham um papel determinante na resposta imunitária. Para além da acção que desenvolvem contra os agentes patogénicos, são importantes na manutenção da homeostase do sistema imunitário, inibindo a acção das células T efectoras e a secreção das respectivas citoquinas. Embora produzidas no timo, têm capacidades migratórias e, uma vez nos tecidos inflamatórios, a sua função supressora é controlada por uma série de citoquinas e pequenas moléculas (Loser & Beissert, 2012).

No Homem, pensa-se que alterações ao nível das células Treg podem predispor ao desenvolvimento de doenças alérgicas (Ogg, 2009), nomeadamente a DA (Oiso, 2010; Loser & Beissert, 2012). Embora os níveis destas células no sangue periférico e na pele dos pacientes atópicos sejam algo controversos (Oiso, 2010; Loser & Beissert, 2012), a importância das células Treg na patogenia da DAh parece dever-se a um desequilíbrio entre estas e as células T efectoras (Oiso, 2010).

Em Beagles com elevados níveis de IgE, a exposição a aeroalergénios demonstrou ser responsável pela diminuição dos níveis de citoquinas reguladoras (IL-10 e TGF-β), sugerindo que alterações da função das células Treg possam ser, à semelhança do que sucede no Homem, uma peça importante na patogenia da DAc (Maeda, Tsuchida & Marsella, 2007). De facto, na fase crónica da DAc, além das células Th1 e Th2, foram encontradas células Treg, quer na pele lesionada como na não lesionada (Schlotter, Rutten, Riemers, Knol & Willemse, 2011).

### **3.2.3. O PAPEL DOS MEDIADORES INFLAMATÓRIOS NA DA**

Vários mediadores inflamatórios têm sido implicados na patogénese da DA. Embora se desconheça qual deles desempenha o principal papel no desenvolvimento das manifestações clínicas da doença, um dos mais estudados é, sem dúvida, a histamina. (Marsella & Olivry, 2001).

Em 1990, Wilkie e colaboradores verificaram que, embora a concentração de histamina plasmática não difira significativamente entre cães atópicos e não atópicos e não apresente correlação com a concentração total de IgE sérica, os valores de histamina cutânea apresentam-se mais elevados nos indivíduos com DAc (Wilkie et al., 1990). Depois destes, muitos outros investigadores dedicaram os seus trabalhos à quantificação da histamina nas reacções alérgicas do cão (De Mora et al., 1996; Jackson et al., 1996; Brazis, Queralt, De Mora, Ferrer & Puigdemont, 1998). Contudo, tal como no Homem (Leung, 2000; Bieber & Novak, 2009), é consensual que não é o único, e talvez nem seja o mais importante, mediador inflamatório responsável pelo prurido na DAc (Marsella & Olivry, 2001).

Os leucotrienos, moléculas sintetizadas através da acção da enzima 5-lipoxigenase (5-LO) durante o metabolismo do ácido araquidónico, são um dos grupos de mediadores

igualmente referidos. Apesar de desempenharem um papel relevante nas doenças alérgicas e, em particular, na DA no Homem (Ohnishi, Miyahara & Gelfand, 2008), a sua importância no cão é ainda controversa (Marsella, 2001; Marsella & Olivry, 2001). Marsella e Nicklin (2001) estudaram 16 cães saudáveis e 13 cães atópicos e não encontraram diferenças significativas na concentração de leucotrienos após sensibilização intradérmica entre ambos os grupos, sugerindo que, na pele, não existe uma correlação entre a IgE alérgénio-específica e estes mediadores. Além disso, a gravidade do prurido também não demonstrou estar correlacionada com os níveis de leucotrienos cutâneos encontrados. Por outro lado, embora já tenham sido encontrados níveis significativamente elevados da expressão da 5-LO na pele de cães atópicos (Scholtter, Riemers, Rutten, Knol & Willemse, 2010), os inibidores dos leucotrienos demonstraram ter uma baixa eficácia no tratamento da DAc (Olivry, Foster et al., 2010).

### **3.3. Principais aeroalergénios envolvidos na DAc**

É sabido que a reactividade contra alergénios ambientais desempenha um papel importantíssimo na fisiopatologia da DA, tanto no Homem (Leung, 2000; Novak et al., 2003; Ogg, 2009; De Benedetto et al., 2012) como no cão (Hill & DeBoer, 2001). Vários estudos têm permitido demonstrar os efeitos directos e indirectos dos alergénios ao nível da barreira e inflamação cutânea (Ogg, 2009).

No cão, os alergénios normalmente envolvidos na doença incluem os antigénios provenientes de: ácaros do pó e de armazenamento; pólenes de gramíneas, árvores e ervas daninhas; esporos de fungos; epiderme; e insectos (Hill & DeBoer, 2001; Hillier, 2002b). Porém, o seu papel na DAc é sugerido a partir de estudos bastante distintos. Muitos destes são baseados na reactividade (em TID ou testes serológicos) contra determinados antigénios, demonstrada em cães com sinais clínicos de DA; outros baseiam-se na melhoria desses sinais após a administração de imunoterapia com antigénios previamente seleccionados; outros ainda são extrapolados da MH, tendo em conta que a asma e a rinite alérgica envolvem alergénios semelhantes aos da DAc. Hill e DeBoer (2001) avaliaram todas estas discrepâncias e verificaram que são poucos os estudos que realmente evidenciam uma relação entre os sinais clínicos e alergénios específicos.

Apesar de tudo, parece haver evidência suficiente para considerar que os antigénios provenientes dos ácaros do pó e da epiderme tendem a ser relevantes tanto nos Estados Unidos da América (E.U.A.) como na Europa, enquanto os pólenes e os fungos são mais importantes no continente americano (Hill & DeBoer, 2001). Num estudo português, realizado em 138 cães atópicos provenientes da área metropolitana de Lisboa, os ácaros domésticos revelaram ser o grupo de alergénios com maior percentagem de sensibilizações (77%) também nesta região. Contudo, a sensibilização a pólenes foi igualmente destacada,

uma vez que 48% dos cães estudados se mostraram sensibilizados a, pelo menos, uma espécie polínica (Lourenço-Martins, 2010).

### 3.3.1. O CASO PARTICULAR DOS ÁCAROS DOMÉSTICOS

*Dermatophagoides farinae* (*Der f*) e *D. pteronyssinus* (*Der p*) são considerados os alergénios de interior mais comumente responsáveis por reacções de hipersensibilidade no cão (Hill & DeBoer, 2001; Nuttall, Hill, Bensignor & Willemse, 2006).

Recentemente, vários estudos têm sido realizados para quantificação dos ácaros do pó e seus alergénios no microambiente de cães saudáveis e atópicos. Num desses estudos, realizado em Ohio (E.U.A.), os alergénios de ácaros do pó foram detectados em todas as 50 casas analisadas e os próprios ácaros foram encontrados em 30% das mesmas habitações, verificando-se uma correlação significativa entre os alergénios analisados e a densidade dos ácaros em estudo. *Der f* demonstrou ser o ácaro do pó mais comum no microambiente dos cães. As caves, as casas sem ar condicionado e as camas dos cães adquiridas há mais de 1 ano apresentaram as maiores concentrações de alergénios destes ácaros, tendo sido considerados reservatórios potencialmente importantes e factores de risco para a sensibilização e desenvolvimento de DAc (Randall et al., 2003). Dois anos depois, os mesmos investigadores analisaram a pele e pêlo dos cães, verificando que os mesmos alergénios estavam presentes em 35% das 59 amostras estudadas, revelando que as concentrações dos alergénios no microambiente canino são factores determinantes para a transmissão e presença dos mesmos na pele e pêlo dos cães (Randall et al., 2005). Já em 2010, Farmaki e seus colaboradores decidiram comparar a densidade dos ácaros do pó e de armazenamento entre casas com cães clinicamente saudáveis, casas com cães atópicos com sensibilidade a esses ácaros e casas sem animais domésticos. Concluíram, assim, que a presença de tais ácaros é comum no microambiente dos cães sensibilizados, sendo a sua densidade superior nas áreas de dormida dos animais, sobretudo na população canina afectada (Farmaki et al., 2010).

De facto, também os ácaros de armazenamento são responsáveis pelo desenvolvimento de reacções de hipersensibilidade em muitos cães atópicos (Nuttall et al., 2006; Brazis, 2011). Estes ácaros, encontrados em alimentos secos ou como constituintes do pó doméstico, fazem parte das famílias *Glycyphagidae* e *Acaridae*, sendo os mais comuns os géneros *Tyrophagus*, *Acarus*, *Lepidoglyphus*, *Glycyphagus* e *Blomia* (Brazis, 2011). Muitos dos cães sensibilizados para os ácaros do pó encontram-se igualmente sensibilizados para este tipo de ácaros, o que levou alguns autores a propor a existência de reactividade cruzada entre eles (Bensignor & Carlotti, 2002; Saridomichelakis et al., 2008; Lourenço-Martins, 2010; Marsella & Saridomichelakis, 2010).

### **3.3.2. VIAS DE ESTIMULAÇÃO ALÉRGICA**

Inicialmente, pensava-se que era a via inalatória que permitia o acesso dos antígenos à pele: depois de inalados, a sua penetração no tracto respiratório permitiria que, através da circulação, pudessem atingir a pele. Actualmente, a evidência sugere que a absorção epicutânea seja a principal via de estimulação alérgica no cão: a inflamação cutânea inicia-se após a transferência directa de antígenos ambientais através do EC e das células apresentadoras de antígenos existentes na epiderme (Olivry & Hill, 2001).

O elevado número de CL, muitas vezes organizadas em aglomerados, presentes na pele lesionada de cães com DA, apoia a hipótese de que a captura de alérgenos seja, de facto, efectuada através da epiderme. A presença de IgE nas mesmas células sugere ainda que também a apresentação de antígenos pelas CL seja mediada pela IgE (Olivry et al., 1996).

Estudos recentes continuam a alimentar a controvérsia, revelando que várias vias de exposição (epicutânea, oral e inalatória) contribuem para a patogenia da DAc (Marsella, Nicklin & Lopez, 2006; Marsella & Saridomichelakis, 2010). Além disso, a distribuição das lesões não parece estar relacionada com a via de estimulação alérgica; é possível que existam áreas do corpo “pré-programadas” para o desenvolvimento da reacção inflamatória (por presença de células T de memória alérgeno-específicas), independentemente do local onde são capturados os alérgenos (Marsella, Nicklin & Lopez, 2005; Marsella, Nicklin et al., 2006). Apesar de tudo, a via epicutânea parece ser a mais importante na perpetuação dos sinais clínicos (Marsella, Nicklin et al., 2006; Pucheu-Haston, Jackson, Olivry, Dunston & Hammerberg, 2008), o que coincide com os resultados do estudo de Randall et al. (2005), no qual foram identificados alérgenos na pele e pêlo dos cães. Tal facto explica como este reservatório pode facilitar a transferência directa de aeroalérgenos, através do EC e das células apresentadoras de antígenos, contribuindo para a inflamação contínua da pele (Randall et al., 2005; Marsella, Nicklin et al., 2006).

### **3.4. Factores perpetuantes**

#### **3.4.1. AUTO-TRAUMATISMO**

O auto-traumatismo, resultante do prurido crónico característico da DA, é um factor importantíssimo na perpetuação da inflamação cutânea no Homem (Leung, 2000) e, muito provavelmente, no cão (Griffin & DeBoer, 2001). O prurido que surge em consequência do contacto com aeroalérgenos e do desenvolvimento de infecções secundárias, leva o paciente a coçar-se. A libertação de citocinas inflamatórias a partir dos queratinócitos e o agravamento dos defeitos da barreira cutânea assim originados facilitam, por sua vez, novas sensibilizações e a entrada de outros agentes patogénicos (Leung, 2000; Leung et al., 2004; Elias et al., 2008; Elias & Schmuth, 2009; Marsella & Samuelson, 2009).

### 3.4.2. STRESS

O próprio stress induz alterações imunológicas que, simultaneamente, com o auto-traumatismo, contribuem para o agravamento dos sinais clínicos (Leung et al., 2004). O aumento dos glucocorticóides (GC) endógenos predispõe a alterações na permeabilidade e integridade da barreira cutânea (Elias & Schmuth, 2009). Por outro lado, os neuropeptídeos produzidos podem desregular a síntese de citocinas inflamatórias, alterando a capacidade de defesa do organismo (Novak et al., 2003). Uma vez que a terapia comportamental pode, por vezes, ter efeitos positivos no controlo da doença no cão, a exacerbação da inflamação na DAC pode ser igualmente devida ao stress (Nuttall, 2008).

### 3.4.3. AUTO-ALERGÉNIOS

No Homem, a resposta imunitária mediada por IgE pode ser iniciada pela exposição a alergénios ambientais e perpetuada, nos casos mais graves, por anticorpos produzidos contra as próprias proteínas humanas (auto-alergénios) (Leung, 1999; Leung, 2000; Leung & Bieber, 2003; Novak & Bieber, 2003; Novak et al., 2003; Leung et al., 2004; Bieber & Novak, 2009; Boguniewicz & Leung, 2010). No cão, este tipo de anticorpos ainda não foi identificado, mas é possível que, estando presente, possa explicar o facto de alguns animais, mesmo com sinais clínicos de DAC, não permitirem a detecção de IgE específica para aeroalergénios através dos testes serológicos e TID convencionais (Olivry, Dunston, Pluchino, Porter & Hammerberg, 2008), os chamados cães com dermatite do tipo atópico (Halliwell, 2006).

### 3.4.4. INFECÇÕES BACTERIANAS

À semelhança do que se verifica em MH, em que 90% dos pacientes com DA se encontra colonizado por elevados níveis de *Staphylococcus aureus* (Leung & Bieber, 2003), os cães atópicos apresentam uma maior tendência para infecções bacterianas concomitantes (DeBoer, 2004; Griffin, 2008; Lund, 2011). *Staphylococcus pseudintermedius* (anteriormente referido como *S. intermedius*) é a bactéria tradicionalmente implicada na piodermite do cão (Fitzgerald, 2009). Embora a infecção, por si só, possa ser responsável pela inflamação e prurido cutâneos, os cães atópicos com piodermite concorrente apresentam, normalmente, um maior grau de desconforto, estando este associado a uma maior gravidade das lesões e a um nível de prurido superior (DeBoer & Marsella, 2001; Lourenço-Martins, 2010).

Ainda que possa ser encontrado na pele, no pêlo e nas zonas perianal e nasal dos cães saudáveis (Marsella & Olivry, 2003), *S. pseudintermedius* adere melhor aos queratinócitos dos indivíduos com DAC do que aos dos cães normais ou com outras doenças dermatológicas (McEwan, 2000; Simou, Thoday, Forsythe & Hill, 2005).

Por outro lado, níveis elevados de IgE anti-estafilocócica foram encontrados em cães atópicos com piodermite recorrente, sugerindo que esta bactéria possa desencadear uma

resposta IgE mediada actuando como alergénio (Morales, Schultz & DeBoer, 1994). Contudo, esta teoria ainda não foi comprovada e provavelmente não constitui o principal mecanismo alérgico (DeBoer, 2004).

No Homem, sabe-se que as exotoxinas estafilocócicas se comportam como superantigénios (Barata, 1999; Leung, 2000; Leung et al., 2004), isto é, moléculas com capacidade para ligar as moléculas do MHC classe II aos receptores de antigénios das células T, promovendo a activação policlonal destas sem necessidade de especificidade antigénica (DeBoer & Marsella, 2001; Scott et al., 2001). No cão, embora se pense que as exotoxinas estafilocócicas desempenhem o mesmo papel, contribuindo para a hipersensibilidade e para os sinais clínicos da DA, tal ainda não foi evidenciado (DeBoer & Marsella, 2001; Marsella & Olivry, 2003). Porém, a inflamação induzida por este tipo de superantigénios poderá explicar a redução da inflamação e do prurido, após administração de antibióticos, em cães atópicos que não apresentam sinais clínicos de infecção (Scott et al., 2001).

Uma das grandes preocupações actuais relativamente às infecções bacterianas no cão é o desenvolvimento de estirpes de *Staphylococcus* resistentes à meticilina. No ano de 2010, em Portugal, foi determinada uma prevalência de 7,1% destas estirpes em cães atópicos com piodermite concomitante e publicados os primeiros casos de infecção cutânea por *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina, nesta espécie, no nosso país (Lourenço-Martins, 2010).

#### 3.4.5. INFECÇÕES FÚNGICAS

*Malassezia pachydermatis* é um fungo lipofílico abordado em diversos estudos relativos à patogenia da DAC, na qual desempenha um importante papel (DeBoer & Marsella, 2001; Griffin, 2008). Embora a contagem destes microrganismos difira com a localização anatómica, sabe-se que fazem parte da microbiota cutânea dos cães saudáveis (Bond, Lamport e Lloyd, 2000). No entanto, quando os factores de virulência e as condições do microclima permitem vencer as defesas do hospedeiro, ocorre a sua proliferação (Nuttall, 2012). E, de facto, os cães atópicos têm maior propensão para dermatite por *Malassezia* (DeBoer & Marsella, 2001; Hillier, 2002b; Lund, 2011). Estes microrganismos podem ser isolados de áreas de pele sem lesões, mas as alterações do microambiente cutâneo associadas à DAC parecem favorecer a infecção, a qual poderá agravar os sinais clínicos dos pacientes atópicos (Nardoni, Dini, Taccini & Mancianti, 2007).

Tal como se pensa acontecer nas infecções por *S. pseudintermedius*, é possível o desenvolvimento de reacções de hipersensibilidade imediata a alergénios deste fungo (DeBoer & Marsella, 2001). Independentemente da presença de dermatite/otite por *Malassezia*, os cães atópicos demonstraram ter níveis de IgE e de IgG *Malassezia*-específicos mais elevados do que os cães não atópicos (Nuttall & Halliwell, 2001). E, em 2002, foi comprovado que, nos cães atópicos, a dermatite por *Malassezia* está associada a

uma resposta IgE mediada, sendo esta desenvolvida sobretudo contra as proteínas de peso molecular 45, 52, 56 e 63 kDa, as quais foram classificadas como alergénios *major* (Chen, Halliwell, Pemberton & Hill, 2002). Resultados de TID corroboram as conclusões destes estudos, tendo-se verificado que 16% da população canina com DA assim testada demonstrou estar sensibilizada para *M. pachydermatis* (Lourenço-Martins, 2010).

Para além de uma resposta humoral, também a resposta mediada por células contra estes microrganismos parece contribuir para a patogénese da DAc. Cães atópicos com dermatite por *Malassezia* concomitante revelaram maior resposta linfocítica a tais antigénios do que cães normais ou com otite por *Malassezia* (Morris, Clayton, Drobatz & Felsburg, 2002).

#### 4. DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA DERMATITE ATÓPICA CANINA

“A dermatite atópica não tem sinais clínicos patognomónicos que permitam um diagnóstico definitivo” (DeBoer & Hillier, 2001a, p.271, tradução livre). O diagnóstico da DAc deve ser baseado na história clínica, no exame físico, na exclusão dos diagnósticos diferenciais relevantes e no tratamento de doenças concomitantes. Posteriormente, a utilização de testes cutâneos e/ou laboratoriais ou a avaliação histopatológica de biopsias de pele podem facultar informações adicionais que, quando correlacionadas com a história, permitam chegar ao diagnóstico definitivo (Reedy et al., 1997; Ackerman, 1998; Nagata, 2000; DeBoer & Hillier, 2001a; Scott et al., 2001).

##### 4.1. História pregressa e Exame físico

Uma história pregressa completa é a parte mais importante do diagnóstico (Reedy et al., 1997; Hillier, 2002b). Esta deve ser baseada nas observações feitas pelo proprietário, nos registos médicos anteriores e no questionário realizado durante a consulta (Reedy et al., 1997). Nela devem constar todas as informações pertinentes, nomeadamente:

- identificação do animal (sexo, raça e idade);
- ambiente (urbano/rural, interior/exterior, contacto com outros animais, tipo de dieta, local onde dorme, desparasitações, etc.);
- idade de início dos sintomas dermatológicos;
- presença/ausência de *pruritus sine materia* (prurido sem outras lesões) numa fase inicial;
- duração e evolução dos problemas dermatológicos;
- presença/ausência de sazonalidade;
- natureza e distribuição das lesões;
- tratamentos efectuados e respectiva resposta do animal.

#### 4.1.1. SEXO

Relativamente à influência do sexo no desenvolvimento da DAc, existe ainda alguma controvérsia (Griffin & DeBoer, 2001; Griffin, 2008). Scott et al. (2001) referem que a doença é registada com maior frequência nas fêmeas e existem algumas teorias propostas para explicar esta hipótese, nomeadamente a possibilidade de ocorrência de alteações celulares como consequência dos elevados níveis intracelulares de guanosina monofosfato cíclico por influência dos estrogénios (Reedy et al., 1997); ou a possibilidade de as fêmeas apresentarem valores mais elevados de IgE comparativamente aos machos (Racine et al., 1999). No entanto, vários ensaios têm demonstrado não haver diferenças significativas na prevalência da DAc entre ambos os sexos (Sture et al., 1995; Saridomichelakis, Koutinas, Gioulekas & Leontidis, 1999; Zur, Ihrke, White & Kass, 2002; Shaw et al., 2004; Nødtvedt et al., 2006), enquanto um estudo recente (Lund, 2011) revelou mesmo que os machos apresentam um risco relativo de atopia ligeiramente superior (RR=1,2).

A maioria dos estudos até aqui publicados não faz qualquer distinção entre animais inteiros e castrados. Porém, a influência da esterilização começa a originar algum interesse por parte dos investigadores e, apesar dos resultados contraditórios (Lourenço-Martins, 2010; Lund, 2011), decerto que os efeitos hormonais no desenvolvimento da DAc constituirão áreas de trabalho promissoras (Lourenço-Martins, 2010).

#### 4.1.2. RAÇA

Certas raças parecem ser predispostas para o desenvolvimento de DAc. Contudo, é necessária precaução na interpretação dos dados relativos à prevalência da doença em algumas delas, pois o aumento da popularidade de uma raça específica pode fazer com que sejam diagnosticados mais casos de atopia nesses cães. Além disso, nem todos os estudos determinam a prevalência da doença para a população base da mesma região geográfica (Griffin & DeBoer, 2001; Griffin, 2008).

A partir da revisão de vários estudos que, embora provenientes de diferentes localizações, comparam o risco relativo de cada uma das raças com a população clínica das mesmas, alguns autores (Griffin & DeBoer, 2001; Jaeger et al., 2010; Lourenço-Martins, 2010) apontam certas raças (Tabela 1) como tendo uma maior predisposição para a DAc. Entre estas, encontra-se uma raça autóctone portuguesa, o cão Serra da Estrela (Lourenço-Martins, 2010). O conhecimento destas raças pode ser de extrema importância, pois uma das formas de prevenção da doença poderá passar por evitar a reprodução dos indivíduos com DAc e pertencentes às raças predispostas (Lourenço-Martins, 2010).



**Tabela 1 - Raças caninas com maior risco relativo de dermatite atópica.**

<b>Raças</b>		
Beauceron		Lhasa Apso
Bichon Frisé	English Setter	Miniature Schnauzer
Boston Terrier	Fox Terrier	Pug
Boxer	French Bulldog	Silky Terrier
Bull Terrier	German Shepherd Dog	Scottish Terrier
Cairn Terrier	Golden Retriever	Sealyham Terrier
Cavalier King Charles Spaniel	Great Dane	Serra da Estrela
Chinese Shar Pei	Irish Setter	Setter
Cocker Spaniel	Jack Russell Terrier	WHWT
Dalmatian	Labrador Retriever	Wire Haired Fox Terrier
English Bulldog	Labrit	Yorkshire Terrier

Adaptado de: Griffin & DeBoer (2001); Jaeger et al. (2010); Lourenço-Martins (2010).

#### **4.1.3. AMBIENTE**

Como revisto anteriormente, os factores ambientais revestem-se de bastante importância no que diz respeito ao desenvolvimento da DAc. Particularmente o ambiente no qual o animal habita pode ser determinante, visto que viver em meio urbano parece ser um factor de risco para a atopia nos cães (Nødtvedt et al., 2006; Lourenço-Martins, 2010). De facto, nas sociedades modernas, os animais passam cada vez mais tempo dentro de casa, o que pode influenciar o aparecimento da doença. Actualmente, o avanço registado nas técnicas de isolamento e a grande utilização de têxteis torna as casas um ambiente perfeito para o desenvolvimento de ácaros domésticos, favorecendo a exposição crescente a este tipo de alérgenos (Marsella & Samuelson, 2009; Lourenço-Martins et al., 2010). Não é, portanto, de estranhar que os cães que, no primeiro ano de vida, dormem na cama dos donos tenham maior propensão para se tornarem atópicos (Lourenço-Martins, 2010). Efectivamente, a DA é diagnosticada sobretudo em cães que vivem em ambiente interior (Favrot, Steffan, Seewald & Picco, 2010), enquanto “dormir no exterior” parece ser um factor protector para a atopia (Lourenço-Martins, 2010).

#### **4.1.4. IDADE E INÍCIO DOS SINAIS CLÍNICOS**

Mais importante do que a idade do animal quando este se apresenta à consulta é a idade em que surgem os primeiros sinais clínicos. Estes iniciam-se, na maioria dos cães atópicos, entre os 6 meses e os 3 anos de idade, podendo ocorrer, menos frequentemente, antes dos 6 meses e após os 7 anos (Reedy et al., 1997; Griffin & DeBoer, 2001; Scott et al., 2001; Hillier, 2002b; Zur et al., 2002; Griffin, 2008; Favrot et al., 2010). Antes do primeiro ano de vida, os sinais clínicos podem ser tão ligeiros que, não raras vezes, acabam por não ser

reconhecidos como relevantes pelos donos. Por outro lado, o começo da sintomatologia em cães idosos, cujo ambiente não sofreu modificações, pode dever-se a alterações no seu sistema imunitário (Reedy et al., 1997).

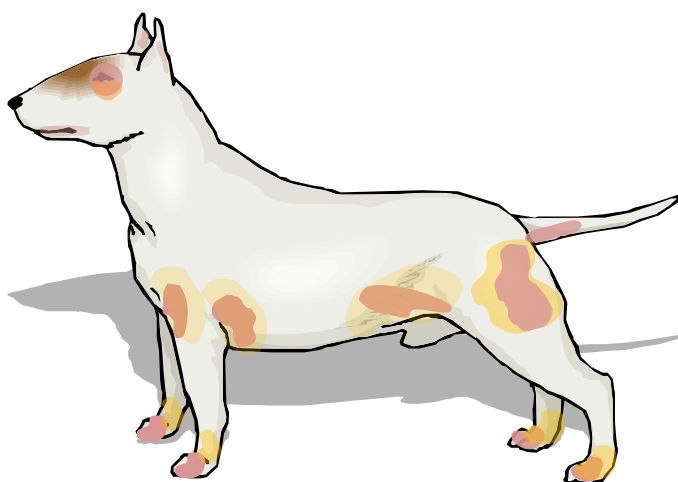
#### 4.1.5. SAZONALIDADE

Normalmente, a sazonalidade é característica das fases iniciais da doença (Hillier, 2002b; Nagata, 2000) e depende dos alérgenos em causa (Scott et al., 2001; Griffin, 2008). A região geográfica e os factores ambientais como humidade, vento e temperatura, bem como o grau de exposição aos próprios alérgenos podem ser responsáveis por variações no padrão sazonal do animal (Ackerman, 1998). A maioria dos cães atópicos tende a evoluir para uma apresentação não sazonal (Nagata, 2000; Hillier, 2002b; Griffin & DeBoer, 2001), com um aumento da gravidade e duração dos sintomas (Ackerman, 1998). Existem ainda aqueles que, embora apresentem sinais clínicos durante todo ano, pioram em determinadas estações, normalmente nos meses mais quentes (Hillier, 2002b).

#### 4.1.6. SINAIS CLÍNICOS

Tipicamente, um cão com DA apresenta prurido na face, nos pavilhões auriculares, nas extremidades dos membros e/ou no abdómen ventral, podendo afectar uma ou várias das localizações referidas, como esquematizado na Figura 3 (Nagata, 2000; Griffin & DeBoer, 2001; Scott et al., 2001; Griffin, 2008; Favrot et al., 2010; Jaeger et al., 2010). A colaboração dos donos é, também aqui, bastante importante, devendo ser elaboradas questões específicas, pois muitos proprietários só mencionam os locais onde o prurido é mais acentuado (Hillier, 2002b; Griffin, 2008).

**Figura 3** - Representação esquemática do padrão lesional típico da DAc (Esquema gentilmente cedido pela Prof.<sup>a</sup> Doutora Ana Mafalda Lourenço Martins).



Embora não haja grande consenso entre os diversos autores, a maioria parece concordar que não existem lesões primárias visíveis ou, se presentes, que estas sejam constituídas apenas por zonas eritematosas, não estando perfeitamente estabelecido que a DAc não complicada possa originar uma erupção primária (Griffin & DeBoer, 2001; Scott et al., 2001; Favrot et al., 2010). E, de facto, o prurido pode muitas vezes ser o primeiro sinal clínico observado (Griffin, 2008); Favrot et al. (2010) verificaram, no seu estudo, que 61% dos cães com DA, numa fase inicial, apresentavam prurido na ausência de lesões cutâneas.

Provavelmente, as lesões descritas como pápulas, pústulas e pápulas crostosas circulares surgem secundariamente à presença de infecções bacterianas/ fúngicas, ou como resultado de auto-traumatismo ou inflamação crónica. Para além dessas, podem surgir ainda zonas de coloração acastanhada do pêlo (por lambedura frequente), excoriações, alopecia auto-induzida, pêlo seco e sem brilho, hiperpigmentação e liquenificação (Nagata, 2000; Griffin & DeBoer, 2001; Scott et al., 2001; Griffin, 2008).

De forma a uniformizar a avaliação de todas estas lesões cutâneas, entre diferentes animais e ensaios clínicos, o denominado Grupo de Trabalho Internacional dedicado ao estudo da Dermatite Atópica Canina (*International Task Force on Canine Atopic Dermatitis*; ITFCAD) desenvolveu uma escala (CADESI-03 – *third version of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index*) que permite determinar a gravidade da doença e a eficácia das intervenções terapêuticas realizadas (Olivry, Marsella, Iwasaki & Mueller, 2007).

Para além dos sinais clínicos já descritos, outros há a sublinhar. A presença de otite externa, por exemplo, é um dos mais comuns, estando associada a eritema, edema, prurido auricular e exsudado ceruminoso ou, em fases mais avançadas, a estenose do ducto auricular externo e exsudação. O sobrecrecimento ou infecção por bactérias ou *Malassezia* são responsáveis pela exacerbação destes sinais (Reedy et al., 1997; Hillier, 2002b). Zur et al. (2002) revelaram que 60% dos cães atópicos incluídos no seu estudo apresentavam otite externa, sendo *Malassezia* o principal agente causal (77,5% dos casos). Mas, outros ensaios demonstram também uma elevada prevalência deste sinal (Saridomichelakis et al., 1999; Shaw et al., 2004; Favrot et al., 2010; Jaeger et al., 2010; Lund, 2011), revelando mesmo que pode surgir como única manifestação clínica de atopia nos cães (Saridomichelakis et al., 1999; Favrot et al., 2010). Algumas raças (Golden Retriever e Cocker Spaniel) são reportadas como tendo maior predisposição para o desenvolvimento de otite associada à DAc (Griffin, 2008).

Queilite, eritema facial e alteração da cor do pêlo na prega facial também podem ocorrer, embora apareçam igualmente noutras doenças (Reedy et al., 1997). A dermatite piotraumática aguda, os nódulos acrais pruriginosos e as pododermatites bacterianas estão também descritas (Reedy et al., 1997; Scott et al., 2001; Hillier, 2002b).

Os sinais não cutâneos não são frequentes nos cães atópicos, contudo estes podem surgir com conjuntivite (Lourenço-Martins et al., 2011), *reverse sneezing*, rinite e asma (Reedy et

al., 1997; Scott et al., 2001; Hillier, 2002b; Griffin, 2008; Marsella & Girolomoni, 2009). Uma avaliação oftalmológica cuidada deve fazer parte do exame físico realizado a todos os cães atópicos, pois os sinais de conjuntivite parecem estar subdiagnosticados. A hiperémia conjuntival demonstrou ser o mais comum, mas outros podem estar presentes em resultado do prurido ocular (Lourenço-Martins et al., 2011). A presença de *reverse sneezing* e rinorreia, com as lesões cutâneas perinasais correspondentes, podem, por sua vez, indicar o desenvolvimento de rinite alérgica (Olivry, DeBoer et al., 2010).

#### 4.1.7. GRAU E LIMIAR DE PRURIDO

Um cão normal pode coçar-se de forma esporádica, sem que isso interfira nas actividades normais do seu dia-a-dia (“prurido fisiológico”); um cão atópico pode demonstrar vários graus de prurido, chegando a interromper a refeição ou o sono para se coçar, rebolar, esfregar ou abanar. A elevada frequência deste tipo de manifestações pode ser classificada como “prurido patológico” (Reedy et al., 1997) e deve ser discutida com os proprietários, pois permitirá aceder à evolução do problema dermatológico (Reedy et al., 1997; Hillier, 2002b). A já validada escala de prurido para uso em cães, na qual o proprietário pode, em cada visita, classificar o grau de desconforto do animal de 0 (ausência de prurido) a 10 (prurido intenso), permite mesmo a monitorização da resposta à terapêutica anti-pruriginosa (Rybíček, Lau-Gillard, Harvey & Hill, 2009). A maioria dos cães atópicos apresenta um grau de prurido ligeiro a moderado, o que pode ser útil para diferenciar a DAC de outras doenças tipicamente mais pruriginosas, como a sarna sarcóptica (Hillier, 2002b; Rybíček et al., 2009). Outro conceito igualmente importante é o “limiar de prurido”, referido quando, estando presentes múltiplas causas de prurido, o seu somatório ultrapassa o nível tolerável pelo indivíduo, levando este a coçar-se. (Reedy et al., 1997; Marsella & Sousa, 2001). Nutrição, doenças sistémicas, alterações ambientais ou reacções alérgicas concomitantes são variáveis que tornam o limiar de prurido bastante individualizado. Também o temperamento dos animais pode ser importante, já que animais mais nervosos tendem a coçar-se mais cedo ou de forma mais intensa. De facto, quer o stress quer as doenças secundárias, como seborreia, foliculite ou dermatite por *Malassezia*, podem ser responsáveis pela exacerbação do prurido (Reedy et al., 1997). É, portanto, essencial que, no maneio da DAC, se tenha em consideração o controlo de alergias simultâneas, nomeadamente aos alimentos ou à picada da pulga, e de infecções secundárias, como forma de eliminar estímulos adicionais que possam contribuir para o desconforto do animal (Marsella & Sousa, 2001).

## 4.2. Critérios de diagnóstico

Os sinais clínicos mais frequentes podem ser analisados e agrupados em listas de critérios de diagnóstico para serem usadas como *checklists* fáceis de interpretar. No início da década de 1980, Hanifin e Rajka (1980) propuseram uma dessas listas para a DAh, que foi mais tarde revista por Williams et al. (1994). De forma semelhante, Willemse (1986) e Prélaud et al. (1998) elaboraram listas de critérios de diagnóstico para a DAc que pudessem vir a ser utilizadas pelos veterinários. Estes critérios foram recentemente avaliados numa população canina, geograficamente bem distribuída, constituída por 1096 cães, dos quais 843 atópicos e 253 com outras doenças pruriginosas (Favrot et al., 2010). Desta análise, resultaram valores de sensibilidade e de especificidade de 49,3% e 80,2%, respectivamente, para os critérios propostos por Willemse, e de 74,3% e 68,4%, respectivamente, para os critérios de Prélaud. No mesmo estudo, foi ainda analisada a correlação entre diversas características clínicas encontradas no diagnóstico da DAc, a partir das quais foram seleccionados dois grupos de critérios (Tabela 2). A satisfação de cinco dos critérios propostos no primeiro grupo permite atingir uma sensibilidade de 85,4% e uma especificidade de 79,1% na diferenciação de cães com e sem DA. Os autores recomendam a sua aplicação no contexto de um bom exame clínico e após a exclusão de diagnósticos diferenciais, como ectoparasitas e infecções bacterianas/fúngicas. Além disso, de forma a determinar a importância dos alérgenos de origem alimentar no quadro clínico do paciente, deve ser sempre realizada uma dieta de eliminação (Favrot et al., 2010).

**Tabela 2** - Critérios de diagnóstico para a DAc propostos por Favrot et al. (2010).

<b>Grupo de critérios 1</b>	<b>Grupo de critérios 2</b>
1. Início dos sinais clínicos < 3 anos	1. Início dos sinais clínicos < 3 anos
2. Sobretudo ambiente interior	2. Sobretudo ambiente interior
3. Prurido responsivo aos GC	3. Inicialmente, prurido sem lesões
4. Infecções fúngicas crónicas/ recorrentes	4. Membros anteriores afectados
5. Membros anteriores afectados	5. Pavilhões auriculares afectados
6. Pavilhões auriculares afectados	6. Margem das orelhas não afectadas
7. Margem das orelhas não afectadas	7. Área dorso-lombar não afectada
8. Área dorso-lombar não afectada	

Adaptado de: Favrot et al. (2010)

Embora realçando que não se tratam de critérios absolutos, a ITFCAD recomenda o seu uso, tanto na prática clínica como em futuros ensaios clínicos/laboratoriais, de forma a aumentar a homogeneidade da informação clínica e a melhorar a extrapolação dos resultados para a população canina com sinais semelhantes (Olivry, 2010).

Dada a grande variabilidade entre os pacientes, nenhuma *checklist* é completamente infalível; isto é, se um animal cumpre os critérios, é racional que a DAc seja um dos

principais diagnósticos diferenciais a ponderar, mas a não concordância com os mesmos não implica necessariamente que seja excluída da lista de diagnósticos. Independentemente dos critérios usados, se um cão manifesta as características clínicas iniciais de DA, outros diagnósticos diferenciais devem ser excluídos (DeBoer & Hillier, 2001a).

### **4.3. Diagnósticos diferenciais**

Apesar da lista de diagnósticos diferenciais depender dos sinais e lesões secundárias que possam estar presentes, normalmente destacam-se os seguintes: dermatite alérgica à picada da pulga (DAPP); reacções cutâneas adversas de origem alimentar (RCAOA); sarna sarcóptica; piodermite; dermatite por *Malassezia*; dermatite de contacto; hipersensibilidade a parasitas intestinais; e hipersensibilidade a insectos (Reedy et al., 1997; Nagata, 2000; DeBoer & Hillier, 2001a; Scott et al., 2001; Hillier, 2002b; Griffin, 2008; Olivry, DeBoer et al., 2010).

## **5. PROVAS DE SENSIBILIZAÇÃO**

As provas de sensibilização, vulgarmente denominadas “testes de alergia”, só devem ser realizadas se existir evidência clínica de alergia e após exclusão dos possíveis diagnósticos diferenciais. Embora a sua utilização permita aumentar a confiança quanto ao diagnóstico de DAC, a sua principal finalidade é a selecção dos antigénios a incluir na imunoterapia alérgico-específica (ITAE) e, em menor grau, a tomada de medidas de evicção alérgica fundamentadas (Reedy et al., 1997; DeBoer & Hillier, 2001a; Hillier, 2002a; Nuttall, 2008; Olivry, DeBoer et al., 2010). Podem ser igualmente úteis na diferenciação de cães com DA daqueles com dermatite do tipo atópico (Olivry, DeBoer et al., 2010), isto é, animais que, mesmo com sinais típicos de DAC, não permitem detectar uma resposta IgE alérgico-específica (Halliwell, 2006).

### **5.1. Testes *in vivo***

Em MH, os testes *in vivo* podem ser efectuados através da aplicação de alergénios na pele (testes cutâneos) ou sobre as mucosas nasal, conjuntival, brônquica, oral ou gastrointestinal (testes de provocação) (Gordon, 1998). Como será abordado de seguida, muitos deles estão já disponíveis em MV.

#### **5.1.1. TESTES CUTÂNEOS**

Os testes cutâneos podem ser classificados, de acordo com a profundidade da pele a que os alergénios são aplicados, em: testes intradérmicos, percutâneos (teste do arranhão e testes cutâneos por picada) e epicutâneos (teste de contacto) (King & Lockey, 2003).

### 5.1.1.1. Testes Intradérmicos

#### 5.1.1.1.1. Testes intradérmicos em Medicina Humana

Os TID permitem avaliar reacções de hipersensibilidade imediata mediada por IgE bem como reacções tardias. A sua aplicação em MH resume-se a situações de hipersensibilidade a veneno de insectos (*Hymenoptera*), anafilaxia por fármacos, nomeadamente beta-lactâmicos, e hipersensibilidade imediata a certas vacinas. O seu uso no Homem não é recomendado para aeroalergénios, nem para antigénios alimentares, pois as reacções sistémicas são mais comuns do que as registadas com outros testes cutâneos (Bernstein et al., 2008; Australasian Society of Clinical Immunology and Allergy [ASCIA], 2009).

#### 5.1.1.1.2. Testes intradérmicos em Medicina Veterinária

Os TID são os únicos testes alergológicos cutâneos usados, por rotina, em MV (Reedy et al., 1997; Hillier & DeBoer, 2001; Scott et al., 2001).

- Os extractos alergénicos: estabilidade, selecção e concentração

Os extractos alergénicos usados nos cães são aquosos e comumente obtidos através da diluição dos extractos concentrados disponíveis para uso na ITAE (Hillier & DeBoer, 2001). Como materiais biológicos que são, podem perder a sua potência dentro de semanas a meses, estando esta relacionada, não só com o tempo, mas também com as condições de temperatura, as concentrações de alergénio, os agentes preservativos adicionados e os componentes do plástico das seringas que os contêm. A acção das enzimas proteolíticas presentes nos próprios extractos ou introduzidas pela sua contaminação (fungos ou pólenes) são factores igualmente importantes (Reedy et al., 1997). Em MH, existem extractos padronizados e controlados internacionalmente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que servem como controlos para a padronização da potência dos extractos alergénicos e permitem comparar os extractos produzidos pelos diferentes fabricantes. Infelizmente, em MV tal ainda não é possível (Hillier & DeBoer, 2001).

Para uma boa preservação, os alergénios devem ser refrigerados a 4°C, permanecendo fora do frigorífico apenas durante o período de tempo suficiente para a realização dos TID (Hillier & DeBoer, 2001). É ainda recomendada a sua substituição, a cada 14 dias, quando armazenados em seringas de plástico (Reedy et al., 1997).

A selecção da bateria de alergénios a usar nos TID depende sobretudo da localização geográfica dos pacientes a testar, pois com esta variam as condições climáticas que definem, ainda, as áreas botânicas e as épocas polínicas. Esta informação pode ser obtida a partir dos veterinários com prática na área da alergologia, das faculdades de medicina veterinária, dos laboratórios que fornecem os alergénios ou que realizam as provas serológicas ou dos livros de texto dedicados à alergologia veterinária. Alternativamente, pode-se recorrer à informação existente para alergologia humana não esquecendo, porém,

que os alergénios relevantes no Homem não o são, necessariamente, no cão. Apesar das diferenças pontuais que possam existir, um bom painel para aplicação nos TID deve ser constituído por 25 a 30 alergénios, normalmente, seleccionados de entre diversos: pólenes (de árvores, gramíneas ou ervas), fungos, ácaros do pó e de armazenamento, insectos e epitélios (Reedy et al., 1997; Hillier & DeBoer, 2001).

A mistura de alergénios é, actualmente, desaconselhada (Hillier & DeBoer, 2001; Reedy et al., 1997; Scott et al., 2001). Num estudo realizado em 115 cães atópicos, o uso de extractos de pó doméstico e de uma mistura de ácaros do pó (*Der f* e *Der p*) resultou numa elevada percentagem de reacções falso-negativas nos TID (70% e 25%, respectivamente), demonstrando que este método não é tão preciso como a utilização de extractos individuais de *Der f* e *Der p*, quando se pretende determinar a hipersensibilidade dos animais aos ácaros do pó (Hillier, Kwochka & Pinchbeck, 2000). Hillier e DeBoer (2001) elaboraram uma revisão de vários estudos que, à semelhança deste, relacionam os resultados dos TID realizados com alergénios individuais e aqueles em que foram usadas misturas de alergénios, acabando por recomendar apenas o uso de extractos de alergénios individuais. Recomendações semelhantes são feitas por outros autores (Reedy et al., 1997; Scott et al., 2001), dado que testar misturas de alergénios pode resultar em reacções falso-negativas se determinados alergénios individuais se encontrarem, na mistura, em concentrações demasiado baixas para serem detectados (Reedy et al., 1997; Scott et al., 2001). Por outro lado, se o animal for sensível apenas a um ou a alguns dos alergénios da mistura testada, ao realizar uma ITAE com todos eles, a concentração dos alergénios realmente importantes será reduzida pela diluição criada pelas substâncias não reactivas (Reedy et al., 1997), para além do animal poder vir a desenvolver hipersensibilidade aos outros alergénios contidos na vacina (Scott et al., 2001).

Para determinar a diluição a utilizar nos TID para cada extracto de alergénio, estes devem ser usados até um limiar de concentração correspondente à maior concentração que não cause uma reacção irritante em animais não atópicos, ou seja uma reacção falso-positiva (Hillier & DeBoer, 2001). Este limiar deve ser estabelecido usando diluições seriadas em cães não atópicos e ajustando as concentrações, de forma a que não sejam registadas reacções falso-positivas em mais de 10% de cães normais (Reedy et al., 1997).

Existem diversas unidades para exprimir a concentração dos extractos, nomeadamente: *Protein Nitrogen Units / ml* (PNU/ml); *Weight / Volume (W/V)* e *Noon Units / ml* (NU/ml). Contudo, nenhum destes métodos permite determinar, de forma correcta, a sua potência biológica (Reedy et al., 1997). A concentração, tipicamente, recomendada para a maioria dos alergénios a testar era de 1000 PNU/ml (Reedy et al., 1997; Scott et al., 2001). Porém, já foi demonstrado que, para pólenes (de gramíneas, ervas daninhas e árvores), concentrações superiores a esta não provocam reacções irritantes em cães saudáveis não atópicos (Bauer, Hensel, Austel & Keys, 2010). Excepções à regra continuam a ser os



extractos do pó doméstico e os ácaros do pó, pois estes são conhecidos por ter um limiar de irritabilidade inferior, devendo ser aplicados numa concentração igual ou inferior a 250 PNU/ml (Reedy et al., 1997; Scott et al., 2001).

- Privação farmacológica

Muitos dos fármacos utilizados no tratamento da DAC (anti-inflamatórios ou imunossuppressores) podem interferir com a reactividade cutânea aos alérgenos injectados, sendo esta uma das principais causas de resultados falso-negativos nos TID. Por isso, dependendo da substância, da via e frequência de administração e da duração do tratamento efectuado, são tipicamente recomendados determinados períodos de privação farmacológica, encontrando-se os mais relevantes resumidos na Tabela 3. (Reedy et al., 1997; Hillier & DeBoer, 2001; Scott et al., 2001). Adicionalmente, é recomendado um período de privação de duas semanas para a aplicação do *spray* de aceponato de hidrocortisona a 0,0584% (Bizikova, Linder, Paps, & Olivry, 2010). Por seu turno, a ciclosporina A parece não ter influência nos resultados dos TID (Goldman, Rosser, Petersen, & Hauptman, 2010).

**Tabela 3** - Períodos de privação farmacológica a cumprir antes da realização dos TID.

<b>Fármacos</b>	<b>Períodos de privação farmacológica</b>
Anti-histamínicos	10 dias
Ácidos gordos ómega 3/ ómega 6	10 dias
Glucocorticóides orais e tópicos	3 semanas
Glucocorticóides injectáveis	8 semanas

Adaptado de: Reedy et al. (1997); Hillier & DeBoer (2001); Scott et al. (2001).

- A técnica

À bateria de alérgenos usada nos TID, deverão sempre ser adicionadas duas soluções controlo (positivo e negativo), de forma a determinar e comparar as reacções cutâneas provocadas pelos extractos alérgenos (Reedy et al., 1997; Hillier & DeBoer, 2001). A solução a empregar como controlo negativo deve ser a utilizada como diluidor dos alérgenos, a qual corresponde frequentemente ao *phosphate-buffered saline* (PBS) com fenol a 0,2 ou 0,4%. O controlo positivo utilizado pela maioria dos alergologistas veterinários é o fosfato de histamina, embora a concentração aplicada difira entre a Europa (0,01%) e os E.U.A. (1:100 000) (Reedy et al., 1997).

A realização de TID implica, na grande maioria das vezes, a sedação dos animais a testar, uma vez que estes não toleram a quantidade de injeções intradérmicas necessárias para aplicação das baterias de alérgenos normalmente utilizadas (Reedy et al., 1997; D. D. Martin & A. L. Martin, 2006). Frank, Kunkle e Beale (1992) verificaram um aumento

significativo nos níveis de cortisol após a realização de TID em cães não sedados. Contudo, não encontraram diferenças significativas na concentração de cortisol entre cães sedados e não sedados com resultados positivos ou falso-negativos, pelo que concluíram que o aumento do cortisol não é suficiente para afectar a resposta cutânea aos testes. Apesar de tudo, para conforto dos próprios pacientes e por uma questão de facilidade e rapidez na execução dos testes, a sedação dos cães continua a ser considerada a melhor opção aquando da realização desta técnica (Reedy et al., 1997; Hillier & DeBoer, 2001). Para os TID está contra-indicado o uso de agentes hipotensivos potentes, opióides e acepromazina, mas a xilazina, a medetomidina e a tiletamina-zolazepam não afectam a reactividade da pele, podendo ser utilizados como sedativos para a realização de TID nos cães (Reedy et al., 1997; D. D. Martin & A. L. Martin, 2006). O propofol, apesar de ser um agente anestésico bastante seguro e de grande utilização, parece aumentar a reactividade cutânea aos TID, o que poderia levar à utilização de antigénios irrelevantes na ITAE (Graham, Torres, Jessen, Horne & Hendrix, 2003).

Os procedimentos para a realização e interpretação dos TID devem seguir as indicações referidas na literatura (Reedy et al., 1997; Hillier & DeBoer, 2001; Scott et al., 2001).

- Leitura e interpretação

A aplicação intradérmica de alergénios resulta numa pápula eritematosa correspondente ao desenvolvimento de uma reacção imediata e mediada por anticorpos IgE, que surge em consequência da exposição a antigénios para os quais o animal se encontra sensibilizado (Figura 4). Contudo, a aparência da reacção obtida nos testes cutâneos difere significativamente daquela que surge na forma natural da doença, o que se pode dever a diferenças relativamente à dose e via de exposição dos alergénios (Hill, Hillier & Olivry, 2001).

**Figura 4** - Reacções cutâneas obtidas, num cão atópico, 15 minutos após a injeção intradérmica de extractos alergénicos (fotografia original).



Por vezes, surgem reacções cutâneas 6 horas, ou mesmo 24 a 48 horas após as injeções intradérmicas. Estas caracterizam-se, macroscopicamente, por eritema ligeiro a intenso e diversos graus de endurecimento, acompanhadas de prurido (Olivry, Dunston, Murphy & Moore, 2001; Hillier, Cole, Kwochka & McCall, 2002); microscopicamente, correspondem à migração de neutrófilos e eosinófilos, seguidos de linfócitos T e células dendríticas (Olivry, Dunston et al., 2001). Tratam-se das denominadas reacções de fase tardia (hipersensibilidade do tipo IV), as quais não são, normalmente, consideradas na interpretação dos TID, pois o seu significado ainda não está bem esclarecido (Hill et al., 2001; Scott et al., 2001). No entanto, visto este tipo de reacção se ter revelado importante na patogénese da DAc, alguns autores (Olivry, Dunston et al., 2001) recomendam que a avaliação dos TID compreenda também uma leitura 6 horas após a realização destes.

- Os factores que podem afectar os resultados dos TID

A presença de uma reacção positiva a determinado alergénio não significa, necessariamente, que o paciente desenvolva sinais clínicos de alergia devido a esse alergénio, mas sim que possui anticorpos específicos, bem como mastócitos que sofrem desgranulação após a exposição a esse alergénio, havendo uma resposta cutânea aos mediadores libertados. De igual forma, uma reacção negativa não permite classificar o paciente como não atópico, pelo que a interpretação dos TID deve ser sempre feita tendo em consideração a história clínica do animal (Scott et al., 2001).

As reacções falso-positivas são aquelas que, surgindo nos locais onde são feitas as injeções intradérmicas dos diferentes alergénios, se assemelham às reacções IgE-mediadas mas que, na verdade, não o são (Hillier & DeBoer, 2001). As justificações para este tipo de resultados são variadas e encontram-se listadas na Tabela 4.

Caso não se desenvolva nenhuma reacção no local do controlo positivo, deve-se suspeitar de alguma das situações que podem dar origem a um resultado falso-negativo, tais como as registadas na Tabela 4, e o teste deve ser considerado como inválido (Hillier & DeBoer, 2001).

**Tabela 4 - Causas de reacções falso-positivas e falso-negativas nos TID.**

<b>Reacções falso-positivas</b>	<b>Reacções falso-negativas</b>
Técnica incorrecta	Técnica incorrecta
Preparação incorrecta dos locais a testar	Injecção sub-cutânea
Distância insuficiente entre testes	Injecção de volume insuficiente
Injecção traumática	Leitura demasiado tardia
Injecção de bolhas de ar	Concentração de alergénios insuficiente
Injecção de volume excessivo	Misturas de antigénios
Extractos irritantes	Validade expirada
Contaminação (bactérias ou fungos)	Soluções demasiado diluídas
Concentrações demasiado elevadas	Seleccção incorrecta dos alergénios
Preservação com glicerina	Interferência de fármacos
Irritabilidade da pele/ Dermografismo(1)	Sazonalidade(2)
	Factores inerentes ao paciente
	Pigmentação cutânea
	Estro
	Pseudo-gestação
	Stress intenso(3)
	Idade(4)

Adaptado de: Reedy et al. (1997); Hillier & DeBoer (2001); Scott et al. (2001).

(1) Se o controlo negativo der origem a uma reacção positiva ou surgirem demasiadas reacções positivas aos alergénios tendo em conta a história clínica do paciente, deve-se suspeitar da veracidade dos resultados, repetindo os TID mais tarde (Reedy et al., 1997).

(2) Para evitar possíveis fases de anergia (por altas concentrações de pólenes) ou épocas do ano em que o animal possui níveis de IgE demasiado baixos para serem detectados, cães com sinais clínicos sazonais devem realizar TID no final do pico da reacção de hipersensibilidade ou até dois meses após a época da alergia. Cães sensíveis a alergénios de interior, geralmente, não revelam sazonalidade, podendo ser testados em qualquer época do ano; porém, o início da Primavera é preferível, já que no Inverno a exposição alergénica é superior (Reedy et al., 1997; Hillier & DeBoer, 2001; Hillier, 2002a).

(3) O stress induzido pela própria técnica aumenta a produção de cortisol plasmático (Frank et al., 1992). À semelhança do que está provado para a administração de GC exógenos (Temizel, Cihan, Akhtardanesh, & Aytug, 2011), é possível que os GC endógenos possam reduzir ou impedir a reactividade da pele (Reedy et al., 1997).

(4) Cães muito novos são, normalmente, pouco reactivos devido ao curto período de sensibilização vivido (Reedy et al., 1997). Podem reagir a um reduzido número de alergénios e mais tarde desenvolver reactividade contra outros, podendo ser necessário repetir os TID numa fase mais adiantada da doença (Hillier & DeBoer, 2001).

- As reacções adversas

No local dos TID é normal surgir algum grau de inflamação e prurido, que podem ser aliviados recorrendo a compressas frias ou a GC tópicos ou orais de curta acção. Em casos de urticária local ou generalizada podem ser administrados anti-histamínicos ou GC sistémicos. As reacções sistémicas (anafilaxia) são bastante raras, mas quando surgem requerem tratamento imediato, recomendando-se, nestes casos, a administração de adrenalina (Hillier & DeBoer, 2001; Scott et al., 2001).

#### 5.1.1.2. Testes percutâneos

Os testes percutâneos incluem o teste do arranhão (*scratch test*) e o teste cutâneo por picada (*prick test*). O primeiro consiste na realização de um arranhão na pele, antes ou após a deposição cutânea dos extractos de alérgenos (Oppenheimer & Nelson, 2006a), mas é mencionado, normalmente, apenas com interesse histórico, quer em MH (Gordon, 1998) como em MV (Reedy et al., 1997). O segundo representa uma importante ferramenta de diagnóstico das doenças alérgicas no Homem, sendo utilizado por muitos dos alergologistas da actualidade (Antunes, Borrego, Romeira & Pinto, 2009). No entanto, tem sido pouco estudado nos animais, havendo um único estudo realizado em cães (Ballauf, 1991) até há bem pouco tempo (Rocha, 2012).

##### 5.1.1.2.1. Testes cutâneos por picada em Medicina Humana

- A história dos testes cutâneos por picada e suas aplicações

Os testes cutâneos por picada (TCP) são, actualmente, os testes alérgicos mais utilizados em MH (Oppenheimer & Nelson, 2006b). Os testes cutâneos por picada foram aplicados, a primeira vez, em 1924 por Lewis e Grant (1924), mas o seu uso na prática clínica só foi generalizado cerca de 30 anos depois, com a técnica modificada proposta por Pepys (1975). Para além de pouco invasivos e facilmente quantificáveis, quando correctamente realizados, apresentam boa reproductibilidade e permitem a avaliação da resposta a vários alérgenos numa mesma sessão (Oppenheimer & Nelson, 2006a; Oppenheimer, Durham & Nelson, 2007). Apresentam, ainda, diversas vantagens relativamente à determinação da IgE alérgeno-específica: simplicidade; rapidez de *performance*; baixo custo; provocação de dor ligeira; obtenção de resultados visíveis pelos próprios pacientes; e elevada sensibilidade (Antunes et al., 2009; ASCIA, 2009).

A sua aplicação pode ser útil numa grande variedade de situações, incluindo casos de rinite alérgica, asma, eczema, alergia alimentar, alergia à picada de insectos, alergia a fármacos, doenças ocupacionais e anafilaxia (Oppenheimer et al., 2007). Tal como os restantes testes alérgicos, os TCP só devem ser realizados após a recolha dos dados clínicos relevantes do paciente. A história e exame físico são sempre essenciais, pelo que os testes cutâneos não devem nunca ser encarados como um substituto destes (Antunes et al., 2009; Bousquet et

al., 2012). Por outro lado, um resultado positivo pode indicar que o indivíduo possui anticorpos IgE específicos para esse alérgeno mas não significa, necessariamente, que esse alérgeno seja responsável pelos sinais clínicos por ele apresentados. O único teste que permite estabelecer este tipo de relação causa-efeito é o teste de provocação alérgica realizado em ambiente controlado (Høst & Halken, 2003).

- A técnica

Os TCP devem ser realizados de forma a obter o menor número de resultados falso-positivos e falso-negativos, provocando o mínimo de desconforto possível ao paciente (Antunes et al., 2009). Como controlo positivo, utiliza-se uma solução de 10 mg/ml de dihidroclorato de histamina e, como controlo negativo, a solução salina empregue como diluente dos extractos alérgicos (Bernstein et al., 2008).

Para as picadas propriamente ditas podem ser utilizados diversos tipos de dispositivos, nomeadamente: agulhas hipodérmicas, agulhas de calibre sólido, lancetas com ou sem ponta bifurcada e dispositivos de cabeça-múltipla (Bernstein et al., 2008), sendo as lancetas com ponta de 1 mm as normalmente recomendadas (Dreborg, 2001). Estas devem ser aplicadas, sempre com uma pressão semelhante, sobre a gota do extracto ou da solução controlo, de forma a prefazer um ângulo de 90° com a superfície cutânea, e a uma distância mínima de 2 cm do alérgeno adjacente (Dreborg, 2001; Antunes et al., 2009).

Geralmente, os dispositivos apresentam uma ponta afiada e um rebordo (0,9 a 1 mm) para evitar a excessiva penetração na pele (Bernstein et al., 2008), atingindo-se unicamente a epiderme e a derme superficial. Embora nas pessoas mais idosas, com pele mais fina, possa ser inevitável, a picada não deve provocar qualquer sangramento (ASCIA, 2009).

Muitos profissionais, por uma questão de economia de tempo, utilizavam o mesmo instrumento para vários testes, limpando-o entre cada picada, de forma a diminuir a possibilidade de transporte do alérgeno anteriormente usado. Contudo, já foi demonstrado que, embora o grau de retenção dos alérgenos no dispositivo possa variar um pouco consoante a viscosidade das soluções a testar, a utilização do mesmo instrumento para vários testes pode originar resultados falso-positivos, mesmo que seja limpo com algodão seco entre cada teste (Piette, Bourret, Bousquet & Demoly, 2002). Além disso, quando em 1995, a *Occupational Safety and Health Administration* dos E.U.A. considerou haver a possibilidade de exposição dos técnicos a patogéneos, se estes fossem acidentalmente picados durante a limpeza dos dispositivos entre diferentes testes, os alergologistas começaram a utilizar lancetas descartáveis (Oppenheimer & Nelson, 2006a; Bernstein et al., 2008). Deste modo, para evitar a contaminação entre diferentes extractos e a transmissão de doenças infecciosas via sanguínea, é recomendada a utilização de uma única lanceta por picada, devendo ser todas elas esterilizadas (Antunes et al., 2009).

- Os dispositivos

Como referido, vários dispositivos estão actualmente disponíveis para esta técnica. Alguns permitem mesmo aplicar a gota do extracto de alergénio sobre a pele e, simultaneamente, introduzi-la na epiderme; enquanto outros são desenhados para a aplicação de múltiplos alergénios numa única operação (Nelson, Lahr, Buchmeier & McCormick, 1998).

Em 1998, um estudo comparou a *performance* de várias técnicas e dispositivos usados nos TCP, revelando diferenças significativas entre o tamanho das reacções cutâneas obtidas. Os dispositivos que originam menor tamanho da pápula de histamina são os responsáveis por maior número de resultados falso-negativos, enquanto aqueles que produzem pápulas de histamina maiores podem dar origem a turgescência mesmo nos locais do controlo negativo (Nelson et al., 1998). De forma semelhante, outros investigadores decidiram comparar diferentes instrumentos. Contudo, estes encontraram poucas diferenças relativamente à sensibilidade e especificidade dos diferentes dispositivos, tendo verificado que os de cabeça única apresentavam sensibilidades superiores a 90% e especificidades de pelo menos 98%. Verificaram, ainda, que os TCP são, de um modo geral, um procedimento não doloroso, embora os dispositivos de cabeças múltiplas sejam mais dolorosos do que os de cabeça única (Carr, Martin, Howard, Cox & Borish, 2005).

Apesar dos vários estudos elaborados nesta área em MH, segundo Bernstein et al. (2008) nenhum dispositivo demonstrou, ainda, grande vantagem relativamente a outros, em parte porque o próprio dispositivo também induz um determinado grau de trauma na pele, levando assim a diferenças no tamanho das reacções positivas e podendo dar origem a resultados falso-positivos. De qualquer forma, se os técnicos possuírem formação e treino adequados com um determinado dispositivo, esperam-se óptimos resultados (Bernstein et al., 2008).

- A leitura

Uma vez que o pico da reacção da histamina ocorre aos 8 minutos e o dos alergénios aos 15 minutos (Oppenheimer & Nelson, 2006a), a *Global Allergy and Asthma European Network* propõe que as leituras sejam realizadas 15 minutos após as picadas (Bousquet et al., 2012). Porém, quando se utiliza uma grande bateria de testes, é importante ter em consideração a diferença temporal entre as primeiras e as últimas picadas no que diz respeito ao momento da leitura (ASCIA, 2009).

Para aceder à dimensão das reacções cutâneas, pode-se recorrer a diferentes métodos (Antunes et al., 2009). Estes e os respectivos limites de positividade encontram-se esquematizados na Tabela 5. No entanto, para que os testes possam ser considerados válidos, o diâmetro médio da pápula do controlo positivo deve ser superior a 3 mm (Antunes et al., 2009; Bousquet et al., 2012) e o da pápula do controlo negativo não deve exceder 3 mm, nem ter um diâmetro de eritema igual ou superior a 10 mm (Antunes et al., 2009).

**Tabela 5** - Métodos de medição e respectivos limites de positividade para os TCP em MH.

<b>Métodos de medição</b>	<b>Resultado positivo se:</b>
Diâmetro mínimo da pápula	superior a 3 mm
Diâmetro médio da pápula <sup>a</sup>	igual ou superior a 3 mm
Índice cutâneo <sup>b</sup>	superior a 0,6

a) Sumatório do diâmetro maior com o maior diâmetro ortogonal dividido por 2.

b) Rácio do diâmetro da pápula do alergénio dividido pelo diâmetro da pápula da histamina.

Adaptado de: Antunes et al., 2009.

Dos métodos de medição referidos, o mais comumente usado é o diâmetro médio da pápula (Antunes et al., 2009), mas, na verdade, o diâmetro maior, para além de mais fácil e rápido de medir, revelou ser um melhor método de leitura quando comparado com a média dos diâmetros ortogonais (Konstantinou, Bousquet, Zuberbier & Papadopoulos, 2010).

Contudo, muitos alergologistas optam apenas por uma leitura semi-quantitativa, registando unicamente os resultados como positivos ou negativos ou usando uma escala de 0 a +4, não indicando o tamanho das reacções (Oppenheimer et al., 2007). Curiosamente, da análise a um questionário realizado a 539 alergologistas a exercer a profissão nos E.U.A., apenas 28,2% afirma usar as medidas dos diâmetros ortogonais na leitura dos resultados (Oppenheimer & Nelson, 2006b).

Para uma avaliação mais correcta das áreas das pápulas, estas podem ser transferidas para computador de modo a diminuir erros de medição manual (Drebrog, 2001). A automatização dos TCP revelou ser um processo simples, sendo possível obter, através da fotografia, os dados necessários para a determinação do tamanho da pápula (Lamminen & Voipio, 2008).

Para além da dimensão das reacções dos controlos e dos diferentes alergénios, também a concentração dos extractos e a região do corpo onde são efectuados os testes devem ficar sempre arquivadas (Oppenheimer & Nelson, 2006a). O registo dos testes realizados é de grande importância não só para o técnico que os realiza, mas sobretudo para que outros profissionais possam aceder e interpretar os resultados sem que seja necessário a sua repetição (Oppenheimer & Nelson, 2006a; Oppenheimer et al., 2007).

- Os factores de variabilidade

Antunes et al. (2009) apontam uma série de factores, resumidos na Tabela 6, que podem ser responsáveis pela variabilidade dos resultados obtidos nos TCP. Alguns deles merecem particular atenção, pelo que serão desenvolvidos de seguida.



**Tabela 6** - Factores que influenciam o resultado dos TCP em pessoas.

	<b>Resultados falso-negativos</b>	<b>Resultados falso-positivos</b>
<b>Factores biológicos</b>	Sensibilização, sexo, raça, idade, localização anatómica	Dermografismo
<b>Factores externos</b>	Fármacos, radiação UV, outras doenças	Reactividade cruzada
<b>Factores técnicos</b>	Qualidade/concentração dos extractos, técnica incorrecta	Trauma, qualidade/pureza dos extractos
<b>Limitações do diagnóstico</b>	Hipersensibilidade não alérgica, reacções não mediadas por IgE	

Adaptado de: Antunes et al. (2009).

Não existe um limite de idade para a realização dos TCP, contudo as reacções cutâneas tendem a ser mais pequenas em idades muito jovens (<2 anos) e nos idosos (>65 anos), dificultando a interpretação dos resultados (ASCI, 2009; Bernstein et al., 2008). Embora os TCP sejam, também em idades mais avançadas, os testes alérgicos mais realizados, recomenda-se cuidado redobrado na sua interpretação, considerando as diversas variáveis que podem estar presentes nestes indivíduos, nomeadamente: as alterações nas condições da pele (atrofia cutânea, menos vasos sanguíneos e menor número de mastócitos e de células dendríticas na pele); o efeito da exposição solar, da toma de determinados fármacos, da pressão arterial e da temperatura das extremidades; ou a exposição a diferentes alergénios ao longo do tempo (King & Lockey, 2003; Bousquet et al., 2012).

Um estudo (Nelson, Knoetzer & Bucher, 1996) realizado para investigar o efeito da proximidade de reacções positivas na resposta à inoculação do controlo negativo em locais adjacentes, verificou que não houve aumento do número de reacções falso-positivas no intervalo de 2 a 5 cm de distância relativamente à posição da reacção positiva. Tal observação sugeriu que os resultados falso-positivos podem estar mais relacionados com o trauma causado pelo teste do que propriamente pelo efeito da presença de reacções positivas adjacentes. Assim, executando uma técnica não traumática, pode-se aplicar uma distância de 2 ou 3 cm entre testes. Os mesmos investigadores compararam ainda as reacções da histamina e dos alergénios em diferentes regiões do corpo (costas e antebraço) e verificaram haver maior reactividade nas costas.

De entre os fármacos que normalmente são referidos por afectarem a validade dos TCP incluem-se os anti-histamínicos, os antidepressivos tricíclicos e os GC, devendo ser respeitado, para cada tipo, um determinado período de privação farmacológica de forma a evitar resultados falso-negativos (Bernstein et al., 2008; Bousquet et al., 2012).

Os TCP não devem ser realizados em áreas de pele com dermatite activa nem em casos de dermatografismo grave (Bernstein et al., 2008; Bousquet et al., 2012). A formação de uma pápula com mais de 3 mm no local do controlo negativo pode indicar a presença deste, devendo o teste ser anulado (ASCIA, 2009).

- As limitações

A uniformização dos extractos comerciais constituiu um grande avanço na área da alergologia, já que a interpretação dos TCP deve ter em conta a alergenicidade, potência e estabilidade dos extractos dos alérgenos usados (Bernstein et al., 2008; Antunes et al., 2009). No entanto, algumas circunstâncias são, ainda, limitativas à sua realização, nomeadamente: doenças dermatológicas difusas; pacientes sob tratamentos supressores que não possam ser descontinuados; pacientes não cooperantes; e elevado risco de reacção anafilática. Nestes casos, os TCP podem ser substituídos por testes *in vitro* (IgE específica) (Antunes et al., 2009; ASCIA, 2009).

- As reacções adversas

Os TCP são considerados extremamente seguros, sendo as reacções adversas muito raras. Estas podem, contudo, ser divididas em reacções: (1) alérgicas; (2) não alérgicas; (3) inespecíficas; e (4) sistémicas. A reacção esperada (alérgica) resume-se ao aparecimento de uma pápula e eritema no local da picada. O prurido resultante pode persistir até cerca de 15 minutos após a realização das picadas. As reacções de fase tardia são bastante incomuns e traduzem-se por edema cutâneo localizado, por vezes um pouco sensível ou doloroso; raramente resultam num inchaço e desconforto mais marcado, contudo não costumam durar mais de 36 horas. As reacções não alérgicas referem-se à possibilidade de transmissão de infecções. As reacções inespecíficas são sobretudo a ocorrência de síncope vasovagais, relativamente frequentes (ASCIA, 2009).

Já as reacções sistémicas, que incluem as manifestações de anafilaxia, são bastante mais raras. Numa revisão de artigos publicados entre 1980 e 2005 sobre a ocorrência de anafilaxia ou outro tipo de reacções sistémicas após a realização de TCP, Liccardi et al. (2006) verificaram que existia o registo de apenas 2 mortes relacionadas com TCP. Uma destas ocorreu num indivíduo com rinite alérgica, asma moderada e alergia alimentar, ao qual foram aplicados 90 antigénios alimentares comerciais (Bernstein, Wanner, Borish & Liss, 2004). Algumas reacções graves não fatais, principalmente anafilaxia, foram descritas mas poucas delas referentes a aeroalérgenos. Embora os pacientes que já sofreram situações de anafilaxia, bem como aqueles com alto grau de reactividade ou as crianças muito jovens, apresentem um maior risco de reacções sistémicas, os TCP permanecem um meio de diagnóstico seguro. A taxa de reacções sistémicas é baixa e podem ser aplicadas várias medidas para minimizar o risco da sua ocorrência (Liccardi et al., 2006).

- TCP *versus* TID em Medicina Humana

É consensual que, embora os TID sejam mais reprodutíveis do que os TCP, estes últimos apresentam múltiplas vantagens: são menos invasivos e, portanto, menos desconfortáveis para os pacientes; permitem uma maior facilidade de execução; são mais económicos e seguros; e relacionam-se melhor com os sinais clínicos, sendo estes acedidos através dos dados da história clínica do paciente ou em testes de provocação nasal ou oral. Os TCP garantem, ainda, uma maior economia de tempo e permitem a utilização de extractos em glicerina 50%. Esta, para além de aumentar a estabilidade do extracto, não provoca as reacções falso-positivas por resposta irritativa que podem surgir nos TID (Oppenheimer & Nelson, 2006a; Oppenheimer et al., 2007; Bernstein et al., 2008).

Os TID são mais sensíveis do que os TCP, sendo necessário utilizar concentrações superiores nos TCP para obter uma resposta semelhante à injeção intradérmica com o mesmo alergénio (Oppenheimer et al., 2007; Bernstein et al., 2008; ASCIA, 2009). Apesar disso, os extractos potentes, habitualmente, usados nos TCP permitem atingir uma sensibilidade suficiente para o seu uso na prática clínica (Oppenheimer et al., 2007). Por outro lado, os TCP apresentam uma maior especificidade relativamente aos TID, permitindo reduzir o número de respostas falso-positivas que podem ocorrer nestes últimos como resultado de reacções irritantes (Bernstein et al., 2008).

Todavia, quando se pretende comparar diferentes testes cutâneos, podem surgir alguns problemas. Gordon (1998) refere alguns deles numa revisão dos diversos métodos de diagnóstico para a alergia no Homem. Um, prende-se com a determinação das doses de alergénios utilizadas, pois se não houver uniformização dos extractos, estes, ao serem produzidos por diferentes fabricantes, podem ser quantificados de diversas formas. Outro dos problemas está relacionado com o volume de solução de antigénio introduzido por cada teste: enquanto nos TID o volume a injectar pode ser pré-definido, nos TCP o volume depende da técnica aplicada, variando de acordo com o dispositivo utilizado, bem como com a profundidade que este penetra na pele. Além disto, quando se testam várias concentrações do mesmo antigénio, deve-se ter em consideração o número de testes realizados, bem como a pressão exercida em cada um deles, a qual poderá variar, quer com a técnica, quer com o profissional que a emprega (Gordon, 1998).

#### 5.1.1.2.2. Testes cutâneos por picada em Medicina Veterinária

Apesar das vantagens evidentes demonstradas em MH, os TCP têm sido pouco estudados em MV, sendo a sua aplicação nos animais praticamente desconhecida.

Em 2010, foi publicado pela primeira vez (Tilley, Luís & Ferreira, 2010) o uso destes testes em equinos com obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA). Depois da análise da história clínica, exame físico e exames complementares relevantes de 30 cavalos com ORVA e 10 controlos saudáveis, foi avaliada a sua resposta, através de TCP, a 16

aeroalergénios com importância na região (fungos, pólenes, ácaros e epitélios). Embora tenha sido necessário sedar os cavalos para a tricotomia do pescoço, a execução dos testes cutâneos revelou-se bem tolerada. Não existindo ainda valores *cut off* relativamente ao diâmetro das pápulas obtidas em equinos, os autores propuseram o valor de 1 cm, pois foi este que permitiu o melhor equilíbrio de valores de sensibilidade (98%), especificidade (73%) e valores preditivos negativo (73%) e positivo (98%). De acordo com os resultados dos testes para cada indivíduo, foram tomadas medidas de evicção ambiental adequadas. Tendo-se registado melhoras significativas nos sinais clínicos após a implementação destas, os autores concluíram que os TCP podem ser usados na identificação dos aeroalergénios responsáveis por afecções alérgicas nos cavalos, o que permitirá estabelecer medidas de evicção eficazes e, possivelmente, ITAE (Tilley et al., 2010).

Em canídeos, tanto quanto sabemos, o único estudo publicado nesta área foi desenvolvido há duas décadas. Ballauf (1991) tentou comparar os TCP com os TID, afirmando que, ao contrário destes últimos, com os TCP não foi possível obter reacções facilmente interpretáveis. Contudo, a população canina usada neste estudo não foi bem caracterizada e, para além de 15 animais com DAC, foram incluídos três cães com broncopneumonia eosinofílica. Por outro lado, os extractos alergénicos utilizados não tinham, decerto, a qualidade daqueles de que hoje dispomos. De forma semelhante, na bibliografia (Reedy et al., 1997) é referido um estudo piloto não publicado, realizado igualmente em cães, onde os autores sugerem que nos TCP são necessárias concentrações de alergénios bastante maiores para que seja possível comparar os resultados com aqueles obtidos nos TID. Hillier e DeBoer (2001) reflectem sobre as razões que possam justificar a não aplicação dos TCP em medicina canina, apontando como hipóteses: (1) a dificuldade em manter os pacientes sossegados antes da gota de alergénio, aplicada sobre a superfície cutânea, secar; (2) a reduzida espessura da pele dos cães; (3) e a possibilidade de ocorrência de reacções adversas.

Recentemente, um estudo preliminar em cães não atópicos (Rocha, 2012) demonstrou, porém, que os TCP, para além de executáveis na população canina, apresentam ainda vantagens sobre os TID, sendo “mais simples, mais rápidos, menos desconfortáveis e aparentemente menos dolorosos” comparativamente com estes últimos (Rocha, 2012, p.47, tradução livre). Utilizando 15 extractos de alergénios aquosos comercialmente disponíveis em MH, foram testados 22 cães saudáveis não-atópicos. Todos estes desenvolveram reacções cutâneas negativas para as concentrações de alergénios testadas, ou seja, não foram registadas reacções cutâneas irritantes (falso-positivas) em cães saudáveis. Adicionalmente, os TCP foram aplicados em 4 cães atópicos e, por comparação com os resultados dos TID efectuados nos mesmos animais, as reacções obtidas nos TCP revelaram-se bastante promissoras. Novos estudos são, contudo, necessários para determinar se os TCP podem vir a substituir os TID como sucedeu em MH (Rocha, 2012).

### 5.1.1.3. Testes epicutâneos

Os testes de contacto (*patch tests*), utilizados para detecção de reacções tardias, consistem na aplicação dos alergénios sobre a pele intacta do paciente, a qual é posteriormente coberta com compressas, permitindo o contacto com os mesmos durante minutos a dias (Gordon, 1998).

#### 5.1.1.3.1. Testes de contacto em Medicina Humana

Em MH, esta técnica é considerada o *gold standard* no diagnóstico da dermatite de contacto; é aplicada a substâncias variadas como cosméticos, medicamentos tópicos e plantas, existindo já *kits* específicos para alergias relacionadas com determinadas ocupações profissionais (Bernstein et al., 2008; ASCIA, 2009). Contudo, pode ser igualmente útil como meio de diagnóstico adjuvante na alergia a aeroalergénios, antigénios de origem alimentar e fármacos (Bernstein et al., 2008; Nosbaum, Hennino, Berard & Nicolas, 2010), sendo bastante utilizado em combinação com os TCP no diagnóstico de alergia alimentar em crianças com sinais clínicos de DA (Lipozenčić & Wolf, 2010). A aplicação epicutânea de aeroalergénios, como ácaros do pó, pêlo de gato e pólenes, induz reacções similares às lesões típicas do eczema atópico (Langeveld-Wildschut et al., 1996; Darsow, Vieluf & Ring, 1999; Nosbaum et al., 2010). Também o mecanismo fisiopatológico da aplicação epicutânea de alergénios se assemelha em muito com a forma natural da doença, pelo que a sua especificidade é superior àquela obtida nos testes serológicos ou por picada (Nosbaum et al., 2010). Assim, e na ausência de um teste *gold standard* para a provocação de aeroalergénios na DAh, o teste de contacto continua a ser utilizado para avaliar a importância clínica da sensibilidade a determinados antigénios deste tipo, sem que haja nenhum teste mais preciso com o qual possa ser comparado, como aliás existe para os alergénios de origem alimentar (Darsow et al., 1999; Lipozenčić & Wolf, 2010). Os valores relativos à sua *performance* variam de acordo com o tipo de substância a testar e, embora seja um teste não doloroso, pode provocar irritação cutânea ou reacções locais mais graves (Gordon, 1998; Bernstein et al., 2008).

#### 5.1.1.3.2. Testes de contacto em Medicina Veterinária

Os testes epicutâneos já foram aplicados em cães e os resultados mostraram-se bastante promissores em relação ao estudo da patogénese e tratamento da DAc (Marsella et al., 2005; Olivry, Deangelo, Dunston, Clarke & McCall, 2006). A aplicação epicutânea de alergénios relevantes em Beagles pré-sensibilizados originou reacções macroscópicas e microscópicas semelhantes às lesões agudas que surgem na forma natural da doença e as reacções positivas só foram verificadas nos cães com valores elevados de IgE específica para os alergénios testados (Olivry et al., 2006). As reacções macroscópicas (máculas eritematosas com ou sem pápulas) surgem 24 a 96 horas após o início do teste e uma maior

gravidade das lesões é registada às 48 horas (Marsella et al., 2005; Olivry et al., 2006). Este período é superior ao, geralmente, verificado para as lesões de fase tardia nos TID (Olivry, Dunston et al., 2001), o que provavelmente se deve ao maior tempo necessário para captura e resposta aos alérgenos quando aplicados à superfície da pele (Olivry et al., 2006).

### **5.1.2. TESTES DE PROVOCAÇÃO**

Os testes de provocação baseiam-se na exposição intencional do paciente a um alérgico que se suspeita ser clinicamente relevante. Em MH, os testes de provocação com aeroalérgenos são utilizados para clarificar o papel destes em órgãos específicos, como a mucosa nasal, brônquica e conjuntival ou a pele (Bernstein et al., 2008). Em MV, as RCOA (teste de eliminação-provocação alimentar) e a dermatite de contacto (teste de contacto) são as causas mais comuns da sua aplicação, não sendo referidos como meio de diagnóstico de rotina na DAc (Reedy et al., 1997).

Contudo, os trabalhos de investigação desenvolvidos na área da alergologia canina parecem seguir um rumo bem diferente. Como já referido, nos últimos anos, vários estudos têm sido elaborados com o objectivo de clarificar quais as vias de exposição alérgica implicadas na fisiopatologia da DAc; recorrendo a provas de provocação oral, nasal ou epicutânea com aeroalérgenos, os cães assim testados surgiram com sinais clínicos, histopatológicos e imunológicos muito similares àqueles encontrados na forma natural da doença (Marsella, Nicklin et al., 2006; Marsella, Olivry, Nicklin & Lopez, 2006; Marsella & Saridomichelakis, 2010). Por sua vez, num estudo realizado em Portugal (Lourenço-Martins et al., 2011), o teste de provocação conjuntival demonstrou ser uma prova de diagnóstico que, para além de fácil execução, apresenta elevados valores de sensibilidade e de especificidade para os alérgenos testados (*Der f* e *Der p*), revelando-se uma ferramenta promissora no que diz respeito à identificação dos alérgenos responsáveis pelo desenvolvimento da conjuntivite alérgica associada à DAc.

## **5.2. Testes *in vitro***

Os testes *in vitro* utilizados no diagnóstico da DAc são testes serológicos, os quais permitem medir a quantidade de anticorpos IgE presente no soro dos pacientes (Reedy et al., 1997).

### **5.2.1. QUANTIFICAÇÃO DE IGE SÉRICA TOTAL**

A determinação da concentração total da IgE sérica é uma das ferramentas de diagnóstico utilizadas em MH para distinguir indivíduos atópicos de não atópicos, sendo útil sobretudo na população mais jovem. No entanto, em MV não parece ser de grande utilidade, uma vez que se registam variações de acordo com uma série de factores, nomeadamente: genética, ambiente, parasitismo e vacinação (DeBoer & Hillier, 2001b). Vários estudos já demonstraram não existir diferenças significativas na concentração total de IgE sérica entre

cães atópicos e não atópicos (Wilkie et al., 1990; Olivry et al., 1996; Hill et al., 1995; DeBoer & Hill, 1999; Jackson et al., 1996), sugerindo que a quantificação de IgE não é útil para a avaliação clínica de casos suspeitos de atopia canina.

### 5.2.2. QUANTIFICAÇÃO DE IGE ALERGÉNIO-ESPECÍFICA

Apesar das múltiplas variações comercialmente disponíveis, os testes que permitem quantificar a IgE alergénio-específica baseiam-se no mesmo princípio fundamental. O soro do paciente contacta com o extracto de um alergénio, o qual se encontra ligado a um suporte sólido ou, por vezes, numa fase líquida. Os anticorpos que não reagem são lavados e, de seguida, os complexos formados (IgE ligada aos alergénios) são detectados através da utilização de um reagente específico para a IgE, que se encontra acoplado a uma enzima (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*; ELISA) ou a um radioisotopo (*Radioallergosorbent Test*; RAST). A quantidade de IgE específica é, então, determinada usando métodos colorimétricos, fluorométricos ou radiométricos (DeBoer & Hillier, 2001b).

Os testes actualmente utilizados para este fim apresentam grandes diferenças entre si, criando alguns problemas (DeBoer & Hillier, 2001b). Um dos que mais tem incomodado a comunidade científica é o reagente utilizado, em ELISA, para detectar a IgE, pois alguns deles apresentam um grau significativo de reactividade cruzada com a IgG, afectando deste modo a especificidade do teste. Na tentativa de contornar este obstáculo foram desenvolvidos sistemas de detecção que utilizam ou anticorpos monoclonais anti-IgE ou o receptor de alta afinidade para a IgE recombinante humano (Wassom & Grieve, 1998; Stedman et al., 2001; Lee et al., 2009) e, recentemente, o receptor de alta afinidade para a IgE recombinante canino (Tsukui et al., 2012).

Os resultados dos testes serológicos devem ser analisados com precaução, pois normalmente são comparados com os dos TID, considerando os resultados positivos destes últimos como verdadeiros-positivos. Porém, embora considerados como *gold standard* para a determinação dos alergénios relevantes, os TID também não são infalíveis, tornando os valores reportados para os testes *in vitro* pouco significativos (DeBoer & Hillier, 2001b).

Tendo em conta que muitos dos testes comercialmente disponíveis medem os anticorpos IgE contra um determinado grupo de alergénios, caso se obtenha um resultado positivo este pode significar que o paciente é sensível a cada um deles ou a um só alergénio, sendo difícil a sua interpretação e a escolha dos antígenos a incluir na ITAE (Reedy et al., 1997). Nos cães sabe-se, ainda, que podem existir variações sazonais na determinação da IgE específica, pelo que é recomendada a realização de múltiplos testes ao longo do ano em animais cujos sinais clínicos apontem para a presença de sazonalidade. Também a administração de GC pode afectar os resultados (DeBoer & Hillier, 2001b), devendo ser evitada a sua administração nas 3 semanas anteriores aos testes (Reedy et al., 1997).

### 5.3. Testes serológicos *versus* Testes cutâneos

Múltiplos estudos têm sido elaborados com o objectivo de comparar os TID com os testes serológicos, mas as variações nas metodologias e a ausência de padronização origina resultados distintos, dificultando a sua interpretação (DeBoer & Hillier, 2001b).

Os testes *in vitro* podem apresentar algumas vantagens sobre os testes *in vivo*. No entanto, os testes serológicos, para além de ficarem mais dispendiosos do que os testes cutâneos por cada antigénio, originam maior número de resultados positivos que clinicamente não são significativos (Reedy et al., 1997; Scott et al., 2001). Não estando os testes cutâneos disponíveis para todos os pacientes, os testes serológicos podem ser uma alternativa para a determinação dos antigénios a incluir na ITAE (Tarpataki, Bigler, Vajdovich & Vörös, 2008). Contudo, os TID continuam a ser considerados o *gold standard* para a identificação dos alergénios relevantes nos pacientes caninos atópicos (Hillier & DeBoer, 2001), dando-se particular ênfase à possibilidade de observar a resposta da pele, a qual representa, afinal, o órgão alvo da alergia no cão.

## 6. TRATAMENTO DA DERMATITE ATÓPICA CANINA

O principal objectivo da terapêutica aplicada na DAc é a redução do prurido e desconforto do animal, tendo em vista a melhoria da sua qualidade de vida. A diminuição da inflamação e o controlo das infecções secundárias devem fazer, igualmente, parte do plano de tratamento. Normalmente, este passa por uma combinação de intervenções e terapêuticas, as quais deverão ser adequadas a cada paciente e bem discutidas com o proprietário (Olivry & Sousa, 2001; Scott et al., 2001; Olivry, DeBoer et al., 2010).

Através da análise de diversos estudos e revisões sistemáticas publicados nos últimos anos sobre as opções terapêuticas existentes para a DAc, a ITFCAD elaborou um conjunto de recomendações, específicas para episódios agudos e crónicos, que deverão servir de base para o maneio de qualquer cão atópico (Olivry, DeBoer et al., 2010). Estas foram traduzidas para várias línguas, encontrando-se já disponíveis na língua portuguesa. De seguida, encontra-se o resumo das *guidelines* proposto por este grupo de trabalho:

#### 1. Tratamento das crises agudas de DAc:

a. Identificação e evicção dos factores que desencadeiam as crises:

i. Identificação e eliminação, sempre que exequível, dos factores alergénicos que desencadeiam as crises (pulgas, alergénios alimentares e ambientais)

ii. Avaliação da utilização de terapêutica antimicrobiana caso estejam presentes sinais clínicos de infecção ou de colonização bacteriana ou por leveduras na pele ou nos ouvidos



- b. Otimização da higiene e condição da pele e do pêlo:
  - i. Banhos com champôs não irritantes
- c. Redução do prurido e das lesões cutâneas com agentes farmacológicos:
  - i. Tratamento com GC tópicos, especialmente para lesões localizadas, conforme o necessário para controlar os sinais clínicos
  - ii. Tratamento com GC orais, especialmente para lesões generalizadas ou graves, conforme o necessário para controlar os sinais clínicos

## 2. Tratamento da DAc crónica:

- a. Identificação e evicção dos factores que desencadeiam as crises:
  - i. Realização de dietas de eliminação, seguidas de testes de provocação, em cães com sinais não sazonais
  - ii. Implementação de um regime de controlo das pulgas eficaz em áreas onde estes parasitas são endémicos
  - iii. Realização de TID alérgico-específicos e /ou serológicos, para pesquisa de IgE de modo a identificar alérgenos ambientais como possíveis factores de desencadeamento de crises
  - iv. Possível implementação de medidas de controlo dos ácaros do pó da casa, se relevantes e exequíveis
  - v. Avaliação da utilização de terapêutica antimicrobiana caso estejam presentes sinais clínicos de infecção ou de colonização bacteriana ou por leveduras na pele ou nos ouvidos
- b. Otimização da higiene e condição da pele e do pêlo:
  - i. Banhos com champôs não irritantes ou com champôs anti-seborreicos/antimicrobianos, dependendo das lesões cutâneas observadas
  - ii. Suplementação alimentar com ácidos gordos essenciais
- c. Redução do prurido e das lesões cutâneas com agentes farmacológicos:
  - i. Tratamento com formulações tópicas de GC ou de tacrolimus, principalmente no caso de lesões localizadas, conforme o necessário para controlar os sinais
  - ii. Tratamento com GC orais, ciclosporina ou interferão subcutâneo, principalmente no caso de lesões generalizadas ou graves, conforme o necessário para controlar os sinais. Normalmente estes agentes não devem ser utilizados em conjunto.
  - iii. Utilização de agentes poupadores de esteróides, tais como os ácidos gordos essenciais, as preparações à base de plantas chinesas e os anti-histamínicos, se os GC forem utilizados como opção de tratamento a longo prazo.
- d. Implementação de estratégias para prevenir a recorrência dos sinais clínicos
  - i. Evicção dos factores reconhecidamente responsáveis pelas crises, tal como foi identificado acima

ii. Considerar a utilização de farmacoterapia preventiva, caso seja exequível e relevante

iii. Implementação de ITAE, caso seja exequível. Esta opção pode ser utilizada em conjunto com todas as opções de tratamento acima descritas numa tentativa de proporcionar melhorias da resposta imunitária anómala a longo prazo.

## 6.1. Tratamento etiológico

A evicção alérgica e a ITAE são as únicas formas de tratamento que permitem alterar o curso natural da alergia (Bousquet et al., 1998). Para pôr em prática qualquer um destes planos de tratamento é, contudo, indispensável a identificação dos alergénios relevantes para o paciente através da história clínica e de testes de alergia (Reedy et al., 1997; Griffin & Hillier, 2001; Scott et al., 2001).

### 6.1.1. EVICÇÃO ALÉRGICA

A evicção alérgica consiste em limitar ao máximo a exposição do animal aos alergénios envolvidos na sua doença. Porém, nem sempre é eficaz e a evicção total, embora possível na alergia de contacto, é difícil de atingir para aeroalergénios (Reedy et al., 1997; Scott et al., 2001).

De facto, a exposição a fungos e pólenes é, praticamente, impossível de evitar. O contacto com fungos pode ser diminuído removendo determinadas plantas ou evitando zonas mais húmidas da casa. Por sua vez, manter o animal em ambiente interior pode permitir reduzir a exposição aos pólenes, sobretudo quando estes se encontram em quantidades mais elevadas (Scott et al., 2001). Perante um animal hipersensibilizado a determinados pólenes, pode ser útil a consulta do boletim polínico da região na qual ele habita; a divulgação semanal dos níveis de pólenes presentes na atmosfera encontra-se, normalmente, disponível *on-line*, como é exemplo o boletim polínico disponibilizado pela SPAIC (SPAIC, 2012). Banhos frequentes, sobretudo após saídas à rua, também podem ser benéficos, uma vez que permitem a remoção dos alergénios retidos no pêlo (Olivry & Sousa, 2001).

Várias medidas têm sido, igualmente, propostas para reduzir a exposição aos ácaros do pó, nomeadamente: tentar que o cão passe mais tempo no ambiente exterior, aplicar acaricidas na casa, usar coberturas impermeáveis nos locais habitualmente ocupados pelo animal, lavar e aspirar frequentemente a casa, ... (Scott et al., 2001; Olivry, DeBoer et al., 2010). Num estudo aberto não controlado, a aplicação de um *spray* contendo benzoato de benzilo no ambiente doméstico de cães com hipersensibilidade aos ácaros do pó permitiu a redução da quantidade desses ácaros nas casas e a diminuição dos sinais clínicos nos cães atópicos que nelas habitavam (Swinnen & Vroom, 2004). Porém, continua por comprovar a eficácia deste tipo de acções e, havendo algum benefício na sua aplicação, os efeitos podem

demorar a surgir, visto que os alérgenos dos ácaros do pó podem permanecer longos períodos no ambiente (Olivry, DeBoer et al., 2010).

### 6.1.2. IMUNOTERAPIA ALERGÉNIO-ESPECÍFICA

Segundo a OMS, a ITAE pode ser definida como “a prática de administrar quantidades gradualmente mais elevadas de um extracto alérgico a um indivíduo alérgico de forma a melhorar os sintomas associados com a exposição subsequente aos alérgenos causais” (Bousquet et al., 1998, p.401, tradução livre). À semelhança do que se verifica em MH no tratamento da rinite e conjuntivite alérgicas, asma e hipersensibilidade a picadas de insectos (Bousquet et al., 1998), também em MV se considera a ITAE como uma importante opção terapêutica da DAc (Griffin & Hillier, 2001). E, de facto, apresenta várias vantagens comparativamente a outras: é a única que permite evitar o aparecimento de novas alergias e a remissão dos sintomas sem necessidade de fármacos anti-inflamatórios adicionais; é mais económica; implica uma frequência de administração reduzida; e tem poucas reacções adversas reportadas (Griffin & Hillier, 2001; Olivry & Sousa, 2001; Hillier, 2002a).

Em MV, os mecanismos de acção da ITAE não estão tão bem conhecidos como em MH, mas alguns trabalhos já surgiram nesta área de investigação (Loewenstein & Mueller, 2009). Sabe-se, por exemplo, que, nos cães atópicos, a aplicação da ITAE é responsável por um aumento na expressão de IFN- $\gamma$ , o que resulta na alteração do perfil de citocinas, de maioritariamente Th2 para Th1 (Shida et al., 2004). Cães atópicos tratados com ITAE e, em particular, aqueles que, com esta forma terapêutica, obtiveram melhorias clínicas mais evidentes mostraram ter níveis significativamente mais elevados de células Treg no sangue periférico, bem como maiores concentrações séricas de IL-10 (Keppel et al., 2008). O aumento da produção de IgG, que funcionaria como anticorpo bloqueador ao competir com a IgE para a ligação aos alérgenos, é, por sua vez, uma teoria que continua por confirmar, havendo resultados contraditórios (Hou, Nuttall, Day, & Hill, 2004; Hou, Griffin & Hill, 2008).

A ITAE está indicada em todos os cães com diagnóstico de DA cujos alérgenos relevantes, identificados por testes de alergia, não possam ser evitados. Sempre que o tratamento com anti-inflamatórios não seja eficaz ou se torne impraticável, por exemplo devido aos efeitos secundários, a ITAE é igualmente recomendada. Também a disponibilidade do proprietário constitui um factor importante devendo, por isso, ser informado relativamente ao custo e tempo da terapêutica, hipóteses de sucesso e possível necessidade de formas de tratamento concomitantes (Reedy et al., 1997; Griffin & Hillier, 2001; Hillier, 2002a).

A ITAE deve incluir unicamente os alérgenos relevantes para o paciente, sendo a selecção destes um factor importantíssimo para o sucesso da terapêutica (Loewenstein & Mueller, 2009). Durante a escolha deve ser considerada, ainda, a possibilidade de reactividade cruzada e os efeitos da combinação de alérgenos, pois a mistura destes pode ser responsável pela diluição excessiva e pela diminuição da alergenidade resultante da

actividade enzimática de determinados alergénios (Reedy et al., 1997; Griffin & Hillier, 2001; Scott et al., 2001). Exemplo disto mesmo é o efeito das proteases fúngicas sobre os pólenes (Rosenbaum, Esch, Schwartzman, 1996), sendo, por isso, aconselhado separar os extractos de fungos daqueles obtidos dos pólenes (Schnabl, Bettenay, Dow & Mueller, 2006).

O número de alergénios a incluir na ITAE é, também, algo bastante controverso (Griffin & Hillier, 2001; Loewenstein & Mueller, 2009), mas geralmente usam-se vacinas com 10 a 12 alergénios (Hillier, 2002a). Quando os animais apresentam hipersensibilidades múltiplas (30 ou mais), os alergénios devem ser seleccionados de acordo com a história clínica e com a probabilidade e duração da sua exposição aos mesmos (Scott et al., 2001). Nestes casos, alguns alergologistas optam por distribuir os alergénios em dois frascos (Reedy et al., 1997). Tipicamente, usa-se a via subcutânea para a administração das vacinas, devido à facilidade, rapidez e segurança que permite (Reedy et al., 1997; Griffin & Hillier, 2001; Scott et al., 2001; Loewenstein & Mueller, 2009). Podem, assim, ser administradas pelo proprietário devidamente informado e treinado pelo médico veterinário. Alternativamente, podem ser aplicadas na clínica, o que permite evitar os problemas resultantes da má administração e facultar acompanhamento médico imediato em caso de reacção adversa (Reedy et al., 1997; Hillier, 2002a). Estudos recentes avaliaram a eficácia da imunoterapia sub-lingual em cães (DeBoer, Verbrugge & Morris, 2010; Marsella, 2010), encontrando-se esta nova via de administração já disponível para a população canina (Morris & DeBoer, 2012).

Em MH, as doses de alergénios são determinadas para os alergénios padronizados (Loewenstein & Mueller, 2009). Não estando estes disponíveis em MV, normalmente, opta-se por obter um frasco com 10000 a 20000 PNU/ml (dose de manutenção), a partir do qual são feitas as diluições (de base 10) para outros dois frascos (Reedy et al., 1997; Hillier, 2002a).

Embora exista uma multiplicidade de protocolos, todos eles são constituídos por 3 fases: dose inicial, aumento da dose e dose de manutenção (Reedy et al., 1997). Porém, estes devem servir apenas como guia, pelo que a frequência de injeções e a dose de extractos não necessitam de ser cumpridos de forma rígida, devendo ser ajustados a cada paciente de acordo com os sinais apresentados (Reedy et al., 1997; Loewenstein & Mueller, 2009).

Apesar do reduzido número de estudos aleatórios existentes, a ITAE com extractos aquosos parece ser eficaz no tratamento da DAc (Griffin & Hillier, 2001; Loewenstein & Mueller, 2009); 60 a 80% dos cães apresentam uma melhoria nos sinais clínicos superior a 50% (Nuttall, 2008). E, embora o início dos seus benefícios possa ser bastante variável, a maioria dos animais responde à terapêutica antes dos 9 a 12 meses (Reedy et al., 1997; Hillier, 2002a; Nuttall, 2008; Olivry, DeBoer et al., 2010). Pode-se, assim, considerar que há uma falha terapêutica quando o animal não demonstra uma diminuição dos sintomas dentro de um ano de tratamento, devendo, neste caso, ser descontinuada a ITAE. Infelizmente, alguns pacientes não respondem a esta forma terapêutica sendo a única solução recorrer ao tratamento sintomático (Reedy et al., 1997). A remissão total dos sinais clínicos é possível

de alcançar em alguns animais recorrendo à ITAE, mas esta deve ser encarada como uma terapêutica para toda a vida (Griffin & Hillier, 2001; Scott et al., 2001).

Como a resposta à ITAE não é imediata, no início, os sinais clínicos podem ser controlados recorrendo a anti-inflamatórios (Reedy et al., 1997; Scott et al., 2001; Hillier, 2002a; Olivry, DeBoer et al., 2010). Contudo, é normal que estes fármacos possam mascarar a resposta clínica do paciente à ITAE, podendo mesmo encobrir possíveis reacções adversas desta (Griffin & Hillier, 2001; Loewenstein & Mueller, 2009). Para ser possível identificar estas reacções, determinar a eficácia da ITAE e fazer ajustamentos no protocolo, deve-se evitar a administração de terapias sintomáticas (Reedy et al., 1997; Scott et al., 2001; Hillier, 2002a). Ainda assim, não existe evidência de que estes fármacos possam alterar o efeito benéfico da ITAE (Loewenstein & Mueller, 2009; Olivry, DeBoer et al., 2010).

Caso ocorra um agravamento dos sinais clínicos durante o tratamento, deve-se sempre excluir a presença de pulgas, infecções bacterianas/fúngicas e outro tipo de alergias antes de considerar a repetição dos testes de alergia, pois embora seja possível o aparecimento de novas sensibilizações, tal situação é bastante mais rara (Reedy et al., 1997). Por outro lado, se o animal foi testado em idade precoce ou se a ITAE nunca originou uma boa resposta, deve-se repetir os testes e reformular o protocolo (Nuttal, 2008).

A monitorização regular dos sintomas ao longo do tratamento é importantíssima, pois permite avaliar a eficácia deste, assegurar a *compliance* por parte do dono e detectar possíveis efeitos secundários (Griffin & Hillier, 2001; Hillier, 2002a). As reacções adversas são raras nos cães, sendo a mais comum o agravamento dos sinais clínicos e do prurido. Estes podem surgir imediatamente após a administração ou 1 a 2 dias depois e, geralmente, são sinónimo de que a dose máxima tolerada foi ultrapassada, devendo, assim, ser reduzida para a dose admitida imediatamente abaixo (Reedy et al., 1997; Griffin & Hillier, 2001; Scott et al., 2001; Nuttal, 2008; Loewenstein & Mueller, 2009). No local da injeção podem surgir eritema, edema, prurido ou nódulos subcutâneos. Reacções sistémicas (depressão, vômito, diarreia, urticária generalizada e angioedema) podem também ocorrer. A anafilaxia é bastante rara, mas pode resultar em morte, devendo o animal ficar em observação 30 a 60 minutos após a injeção (Reedy et al., 1997; Scott et al., 2001; Hillier, 2002a).

## 6.2. Prevenção primária

A análise da influência dos factores ambientais no desenvolvimento da DAc pode ser útil no contexto da sua prevenção primária; evitar que os cães durmam no quarto dos donos, permitir que co-habitem com outros animais no seu primeiro ano de vida e a existência de aquecimento em casa parecem ser medidas protectoras (Lourenço-Martins, 2010).

Também o uso de probióticos, em Beagles com elevada predisposição para o desenvolvimento de DAc, tem vindo a revelar resultados promissores no campo da prevenção primária da atopia. Os cachorros submetidos à administração de *Lactobacillus*

*rhamnosus GG* apresentaram, comparativamente à ninhada controlo, níveis séricos de IgE alérgico-específica mais reduzidos e menor reactividade após injeção intradérmica (Marsella, 2009). Três anos depois da interrupção dos probióticos, os mesmos animais surgiram, após estimulação alérgica, com sinais clínicos de menor gravidade e uma quantificação de IL-10 no sangue periférico significativamente mais baixa (Marsella, Santoro & Ahrens, 2012).

## TESTES CUTÂNEOS POR PICADA EM CÃES

---

### 1. OBJECTIVOS DO ESTUDO

O presente estudo apresenta os seguintes objectivos, divididos em duas fases:

#### Fase I

- Confirmar que as concentrações dos extractos alergénicos comercialmente disponíveis para a realização de TCP em MH não originam reacções falso-positivas em cães;
- Determinar o grau de dor/desconforto que possa ser provocado pelos TCP em cães;
- Verificar se existem alterações significativas na cortisolémia que possam resultar da realização dos TCP em cães.

#### Fase II

- Comparar os resultados dos TCP com os dos TID em cães atópicos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Fase I

#### 2.1.1. SELECÇÃO DOS ANIMAIS EM ESTUDO

A fase I do estudo foi realizada recorrendo a um grupo de cães não atópicos. Estes foram gentilmente cedidos pelo canil da FMV-UTL, após devida autorização do comité de ética da mesma instituição. Depois de analisada a história clínica e de efectuado um cuidadoso exame físico, foram seleccionados os animais cumpridores dos critérios apresentados nas Tabelas 7 e 8.

**Tabela 7** - Critérios de inclusão no grupo de cães não atópicos.

---

<b>Critérios de inclusão</b>
✓ Bom exame de estado geral;
✓ Sem história de prurido ou outros sinais clínicos típicos de DAC;
✓ Sem alterações dignas de registo ao exame dermatológico.

---

**Tabela 8** - Critérios de exclusão no grupo de cães não atópicos.

---

<b>Critérios de exclusão</b>
✗ Doença grave diagnosticada ou alterações significativas ao exame de estado geral;
✗ História de sinais clínicos típicos de DAC;
✗ Com lesões cutâneas visíveis no exame dermatológico;
✗ Fêmeas gestantes/ lactantes/ em estro há menos de 3 semanas;
✗ Administração recente de anti-histamínicos (10 dias) e/ou de GC tópicos/orais (3 semanas) ou injectáveis (8 semanas).

---

### **2.1.2. AVALIAÇÃO PRÉVIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRACTOS A USAR NOS TCP**

Não são fabricados extractos alergénicos para a realização de provas alergológicas cutâneas pela técnica de picada para MV. Assim, e de forma a evitar a utilização de extractos demasiado concentrados que pudessem vir a ser responsáveis por respostas falso-positivas em cães atópicos, começou-se por testar um grupo de cães não atópicos. Estes foram, então, testados com um conjunto de extractos de alergénios, comercialmente disponíveis para a realização de TCP em alergologia humana (ALK-Abelló®, Madrid, Espanha). No Anexo B encontram-se listados os extractos utilizados e as respectivas concentrações.

### **2.1.3. DETERMINAÇÃO DO GRAU DE DOR**

Os cães não atópicos estudados foram divididos em dois grupos: sedados e não sedados. Para uma avaliação, o mais objectiva possível, do grau de desconforto que possa advir da realização dos TCP em cães não sedados, foi feita uma adaptação de uma das escalas comportamentais validadas para avaliação de dor em cães. Depois de contactar os respectivos autores, foi aplicada a forma abreviada da escala de dor proposta pela Universidade de Glasgow (Reid et al., 2007), que figura no Anexo C. De forma a manter a validade desta escala, não foram efectuadas alterações significativas, mantendo-se as cinco categorias comportamentais da escala original (vocalização, atenção dada ao foco de desconforto, resposta ao toque, atitude e postura/actividade), que foram, contudo, divididas apenas em duas secções: “A-Durante o procedimento” e “B-Imediatamente após o procedimento”. À semelhança do que é proposto pelos próprios autores (em casos de franca dificuldade de locomoção), neste estudo não foi avaliada a mobilidade, visto que a execução deste tipo de testes não condiciona, à partida, a capacidade locomotiva do cão em estudo. Após observação de cada animal, durante e após a realização dos TCP, foi assinalada, em cada categoria, a opção que melhor descrevia o seu comportamento. De modo a reduzir a variabilidade inter-observadores, todas as avaliações foram efectuadas pela mesma pessoa. O grau de desconforto de cada animal foi, então, aferido através da soma das classificações obtidas em cada uma das categorias comportamentais, considerando 20 a pontuação total máxima e 5/20 o ponto de decisão para recorrer à analgesia (Reid et al., 2007).

### **2.1.4. DOSEAMENTO DOS NÍVEIS DE CORTISOL SÉRICO**

Uma vez que valores de cortisol acima daqueles, normalmente, considerados como fisiológicos podem influenciar os resultados dos testes cutâneos, é necessário averiguar se, em ambos os grupos de cães (sedados e não sedados), a sua concentração sérica se mantém, durante a execução dos TCP, abaixo desse limiar. No grupo de cães sedados, após o cumprimento de um período de jejum de sólidos e líquidos de 12 horas, a sedação foi realizada recorrendo-se à administração de 30 µg/kg de medetomidina (Domitor®; Pfizer)



e revertida, no final do procedimento, com 150 µg/kg de cloridrato de atipamezol (Antisedan®; Pfizer), ambos por via endovenosa.

A colheita de sangue foi efectuada em dois tempos: imediatamente antes (T0) e uma hora após (T1) a execução dos TCP. As amostras foram colocadas em tubos secos e armazenadas à temperatura ambiente até completa coagulação. Posteriormente, foram centrifugadas a uma velocidade de 3.000 rotações por minuto, durante 10 minutos. O soro assim obtido foi armazenado em tubos de *ependorf* à temperatura de -20°C até respectivo processamento (Behrend, Kemppainen & Young, 1998).

Por fim, as amostras foram, simultaneamente, analisadas recorrendo a um sistema de imunoensaio quimioluminescente (IMMULITE® *Immunoassay system*, Siemens®).

### 2.1.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nesta fase do estudo, recorreu-se essencialmente a métodos de estatística descritiva.

Adicionalmente, de forma a comparar a dimensão média das pápulas, resultantes da inoculação do controlo positivo pela técnica de picada, entre cães sedados (n=5) e não sedados (n=5), recorreu-se ao teste não paramétrico de Wilcoxon para comparação de duas amostras independentes, considerando um nível de significância de  $p < 0,05$ .

Para a análise dos dados foi utilizado o *software* estatístico R, versão 2.15.1.

## 2.2. Fase II

### 2.2.1. SELECÇÃO DOS ANIMAIS EM ESTUDO

Para a execução da fase II, foram admitidos todos os animais atópicos que, depois de apresentados à consulta de Dermatologia do Hospital Escolar da FMV-UTL, foram aconselhados a realizar TID e cujos donos autorizaram a sua inclusão no presente estudo. O diagnóstico clínico de DAC foi efectuada com base nos “critérios de Favrot” (Favrot et al., 2010), actualmente recomendados pela ITFCAD (Olivry, 2010), tendo em consideração os dados recolhidos na história clínica e exame físico, bem como a exclusão dos principais diagnósticos diferenciais e o controlo de possíveis infecções secundárias (Reedy e tal., 1997; DeBoer & Hillier, 2001a; Scott et al., 2001; Favrot et al., 2010), conforme descrito de seguida:

- De forma a excluir os ectoparasitas como causa de prurido, todos os cães foram sujeitos a raspagens cutâneas e/ou a uma rigorosa desparasitação externa, recorrendo à administração de ectoparasiticidas autorizados, como imidaclopride + moxidectina (Advocate®) ou selamectina (Stronghold®), quinzenalmente, durante um período mínimo de 6 semanas. O ambiente e os animais com os quais estes pacientes co-habitam foram igualmente sujeitos a um programa de controlo de pulgas (*European Scientific Counsel Companion Animal Parasites [ESCCAP]*, 2012).

- A possibilidade de RCAOA foi excluída na totalidade dos pacientes através do fornecimento de uma dieta de eliminação, em exclusividade, durante pelo menos 6 a 8 semanas. De acordo com a disponibilidade e preferência de cada proprietário, esta consistiu numa alimentação comercial ou caseira (Olivry, DeBoer et al., 2010). Dietas comerciais contendo proteínas hidrolisadas (Hill's z/d ultra®, Purina HA® ou Royal canin hypoallergenic®) foram prescritas na maior parte das vezes. Sempre que possível, foi recomendada uma dieta caseira constituída por uma fonte de proteínas e carboidratos com a qual o animal nunca tivesse contactado, como é geralmente o caso da carne de avestruz ou de cavalo e a abóbora ou a batata doce. Sempre que registadas melhoras significativas depois de iniciada a dieta de eliminação, os animais foram sujeitos a uma prova de provocação, retomando a dieta original, e o diagnóstico definitivo de RCAOA foi obtido caso os sinais dermatológicos voltassem a surgir (Olivry, DeBoer, Prélaud & Bensignor, 2007). Neste estudo, foram excluídos os cães que responderam totalmente à dieta de eliminação.
- As infecções cutâneas foram excluídas através da realização de citologias, cuja técnica de execução (recurso a zaragatoa, citologia por aposição ou “técnica da fita-cola”) foi seleccionada de acordo com o aspecto das lesões. As citologias assim obtidas foram coradas pelo método modificado de Romanowsky (Diff-Quick®) e observadas ao microscópio óptico (Olympus® Cx 21) (Noli & Morris, 2012; Nuttall, 2012). A presença, nas citologias cutâneas, de bactérias no interior de células inflamatórias foi classificada como piodermite e tratada com antibacterianos tópicos ou sistémicos. A antibioterapia empírica (amoxicilina + ácido clavulânico) foi prescrita na generalidade dos animais. Excepção a esta regra foram os casos não responsivos ao antibiótico de primeira escolha e aqueles em que a citologia cutânea revelou a presença de bastonetes intracelulares; nestes, a selecção do antibiótico foi efectuada com base na cultura bacteriana e no teste de susceptibilidade a antibióticos (Noli & Morris, 2012). A presença de dermatite por *Malassezia*, considerada aquando da observação de 4 ou mais microrganismos de *Malassezia* por campo microscópico (1000x), foi controlada através de banhos com um champô antifúngico, contendo nitrato de miconazol + gluconato de clorhexidina (Malaseb®) e antifúngicos sistémicos, nomeadamente o itraconazol (Negre, Bensignor & Guillot, 2009). Lesões localizadas foram tratadas recorrendo a antifúngicos tópicos, como o clotrimazol. No presente estudo só foram incluídos os animais nos quais a terapia antimicrobiana não permitiu a resolução total dos sinais dermatológicos.
- As fêmeas inteiras só foram sujeitas aos testes cutâneos, no mínimo, 3 semanas após o fim do estro.
- Depois de efectuado o diagnóstico clínico de DAC, todos os pacientes incluídos no estudo cumpriram os períodos de privação farmacológica, já referidos na fase I.

### 2.2.2. COMPARAÇÃO ENTRE DUAS TÉCNICAS DE SENSIBILIZAÇÃO CUTÂNEA: TID E TCP.

Os pacientes incluídos no grupo de cães atópicos foram sujeitos a provas alergológicas cutâneas no contexto do já existente serviço de alergologia do Hospital Escolar da FMV-UTL. De forma a comparar as duas técnicas, todos os animais deste grupo foram submetidos a TID, já praticados por este serviço hospitalar, e a TCP.

A bateria de alergénios utilizada nos TID, composta por um total de 28 extractos comerciais de alergénios da Greer Laboratories® (Lenoir, Carolina do Norte, E.U.A.), foi seleccionada com base no painel mínimo proposto para o cão na área metropolitana de Lisboa (Lourenço-Martins, 2010). As concentrações utilizadas no presente estudo foram as recomendadas na literatura e já aplicadas anteriormente em cães provenientes desta região (Lourenço-Martins, 2010), com a excepção dos extractos polínicos cujas concentrações foram actualizadas de acordo com os dados mais recentes da literatura (Bauer et al., 2010).

Para os TCP foram empregues 21 extractos alergénicos da ALK-Abelló® (Madrid, Espanha) comercialmente disponíveis para a realização dos mesmos testes em alergologia humana. No Anexo B encontram-se registadas as potências/concentrações dos extractos utilizadas na técnica de picada.

Dada a pouca tolerância dos animais à execução de injeções intradérmicas, após um período de jejum de sólidos e líquidos de 12 horas, recorreu-se à sedação dos mesmos utilizando 30 µg/kg de medetomidina (Domitor®; Pfizer) por via endovenosa, a qual foi revertida, no final do procedimento, com 150 µg/kg de cloridrato de atipamezol (Antisedan®; Pfizer), pela mesma via de administração. Ambas as técnicas de sensibilização cutânea foram realizadas durante a mesma sedação.

### 2.2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A estatística descritiva foi utilizada para análise dos resultados de sensibilização encontrados nos TID.

Para comparar a dimensão média das pápulas de histamina obidas nos TCP, entre cães atópicos (fase II) e não atópicos (fase I) recorreu-se ao teste não paramétrico de Wilcoxon para comparação de amostras independentes, considerando um nível de significância de  $p < 0,05$ .

Com o objectivo de determinar um valor de *cut-off* para os TCP em cães, considerou-se como referência os TID efectuados nos mesmos animais e utilizou-se a análise ROC (*Receiver Operating Characteristic*), com um intervalo de confiança de 95%, recorrendo ao pacote pROC (Rubin et al., 2011) do *software* estatístico R, versão 2.15.1. A sensibilidade (Se), a especificidade (Sp), o valor preditivo positivo (VPP) e o valor preditivo negativo (VPN) encontrados para esse *cut-off* tiveram em conta as seguintes fórmulas:

- Verdadeiro-positivo (VP)
- Falso-positivo (FP)

- Verdadeiro-negativo (VN)
- Falso-negativo (FN)
- Sensibilidade (Se) =  $VP/(VP+FN)100$
- Especificidade (Sp) =  $VN/(VN+FP)100$
- Valor preditivo positivo (VPP) =  $(VP \times 100)/(VP+FP)$
- Valor preditivo negativo (VPN) =  $(VN \times 100)/(VN+FN)$

	TID +	TID -
TCP +	VP	FP
TCP -	FN	VN

De forma a avaliar a capacidade dos TCP em distinguir sensibilizações positivas de negativas, utilizou-se o mesmo pacote estatístico para determinação da área sob a curva (*Area Under the Curve*; AUC), considerando-se que quando a área é de 0,5 o teste não permite fazer essa distinção e que uma área de 1 está associada a um teste com perfeita capacidade discriminatória.

Para determinar o índice de concordância entre os resultados obtidos pelos dois tipos de técnicas aplicadas (TID e TCP), foi calculado o coeficiente de k, considerando os seguintes níveis: P- pobre ( $\leq 0$ ); Fr - fraco (0,01-0,20); R - razoável (0,21-0,40); Mo - moderado (0,41-0,60); S - substancial (0,61-0,80); e QP - quase perfeito (0,81-1,00) (Landis & Koch, 1977).

O teste de McNemar foi utilizado para averiguar se existem diferenças significativas entre os resultados obtidos com os TID e com os TCP, tendo em conta um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 2.3. Procedimentos adoptados nas provas alergológicas cutâneas usadas nas fases I e II do estudo

### 2.3.1. TESTES INTRADÉRMICOS

Os TID foram executados de acordo com a técnica recomendada em alergologia veterinária (Reedy et al., 1997; Hillier & DeBoer, 2001; Scott et al., 2001). Assim, e de forma sucinta:

1. Após colocação do animal em decúbito lateral, procedeu-se à tricotomia cuidadosa de uma área rectangular com cerca de 20 cm x 10 cm na zona lateral do tórax, evitando-se zonas de pele lesionada.
2. A posição de cada um dos alergénios foi assinalada com um marcador, cumprindo uma distância de 2 cm entre alergénios adjacentes.
3. Como controlo positivo foi utilizada uma solução de histamina (0,0275 mg/dl) e como controlo negativo uma solução salina.
4. As injeções intradérmicas foram realizadas com o auxílio de seringas de 1,0 ml e de agulhas de 27 Gauge; após rejeição das bolhas de ar contidas nas seringas, injectou-se um volume de 0,05 ml de cada uma das soluções dos controlos e dos alergénios (Figura 5).
5. A leitura das reacções imediatas foi feita 15 minutos após as injeções, recorrendo-se a um método subjectivo que teve em consideração a avaliação do tamanho e turgidez da pápula bem como a dimensão do eritema. Cada reacção cutânea foi

classificada numa escala de 0 a 4, em que o “0” corresponde a uma resposta igual à do controlo negativo e o “4” a uma reacção igual à do controlo positivo, considerando-se como positivas todas as reacções com classificação igual ou superior “2”. Adicionalmente, de forma a ser possível a correcta medição das suas dimensões, todas as pápulas foram devidamente contornadas com um marcador e transferidas com uma fita transparente para uma folha de registo.

6. Apenas foram considerados válidos os testes cujo local de injeção da histamina formou uma pápula de turgidez e eritema visíveis e cujo local de inoculação do controlo negativo não revelou qualquer reacção.

### **2.3.2. TESTES CUTÂNEOS POR PICADA**

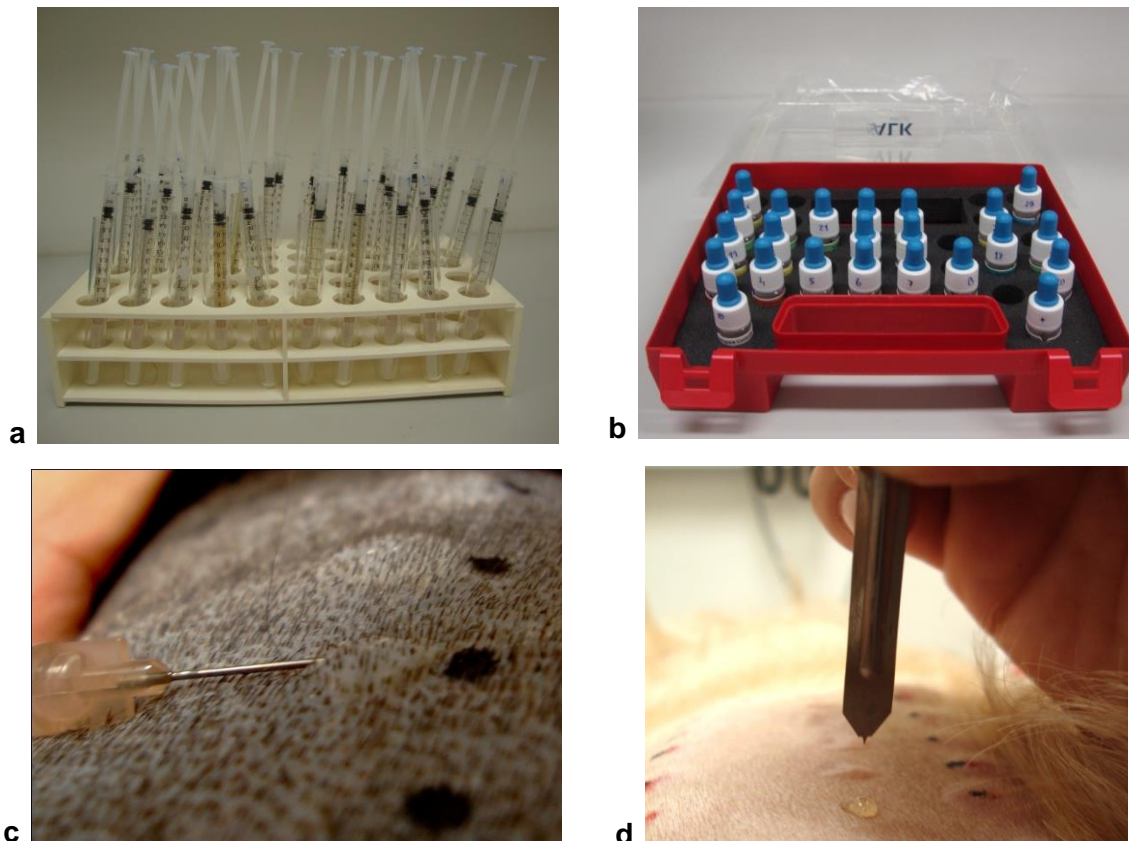
Não existindo, actualmente, uma técnica padronizada para a realização de TCP em cães, esta foi baseada nas recomendações encontradas na literatura para testes cutâneos com aeroalergénios em MH (Bernstein et al., 2008; Antunes et al., 2009; ASCIA, 2009; Bousquet et al., 2012). Sumariamente:

1. Procedeu-se à contenção adequada do animal colocando-o em decúbito lateral.
2. Numa área rectangular (20 cm x 10 cm) da região lateral do tórax foi realizada a tricotomia cuidadosa, evitando-se zonas de pele lesionada.
3. As posições de cada teste foram identificadas, a uma distância de 2 cm entre alergénios adjacentes, com um marcador.
4. Uma solução salina e uma solução de histamina (10 mg/ml) foram utilizadas como controlo negativo e positivo, respectivamente.
5. Os controlos e os alergénios foram colocados ligeiramente acima dos pontos previamente marcados na pele, com o auxílio de conta-gotas fornecidos pelo fabricante dos extractos alergénicos (ALK-Abelló®, Madrid, Espanha), tocando apenas com a gota sobre a pele de forma a facilitar a transferência de líquido. Para evitar o escorrimento das gotas e a possível contaminação dos alergénios adjacentes, as gotas foram depositadas em grupos de 5 a 10 alergénios, procedendo-se de imediato às respectivas picadas.
6. As picadas foram feitas através da aplicação de lancetas com ponta de 1 mm fornecidas pelo mesmo fabricante. Estas foram aplicadas sobre cada gota de forma a prefazer um ângulo de 90° com a superfície da pele (Figura 5).
7. Para cada picada foi utilizada uma nova lanceta esterilizada, de forma a evitar possíveis contaminações entre extractos.
8. A leitura das reacções foi realizada 15 minutos após a realização dos testes e arquivada de forma permanente, contornando cada uma das pápulas com um marcador e transferida, de seguida, com o auxílio de uma fita transparente, para uma

folha de registos. Sempre que necessário, foi utilizada uma fonte de luz oblíqua para uma melhor visualização das pápulas formadas.

9. Foram considerados válidos os testes cujo local de inoculação do controlo positivo formou uma pápula de turgidez e eritema visíveis e cujo local de inoculação do controlo negativo não revelou qualquer reacção.
10. A partir da folha de registos, foi feita a medição do diâmetro maior de cada uma das pápulas formadas.

**Figura 5** - Soluções (controlos e alergénios) e técnicas utilizadas nos TID e nos TCP (fotografias originais).



- a) Soluções (controlos e alergénios) contidas em seringas para injeção intradérmica (TID).
- b) Soluções (controlos e alergénios) contidas em frascos conta-gotas para inoculação por picada (TCP).
- c) Técnica usada na injeção intradérmica (TID).
- d) Técnica usada na inoculação por picada (TCP).

### 3. RESULTADOS

#### 3.1. Fase I

##### 3.1.1. CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS EM ESTUDO

Na fase I foram seleccionados 10 cães não atópicos, todos eles de raça indefinida. Estes foram, posteriormente, divididos de forma aleatória em dois grupos: cães não sedados (n=5) e cães sedados (n=5), ambos constituídos por 3 machos e 2 fêmeas. A média dos pesos foi de 20,9 Kg e de 18,9 Kg, respectivamente para os cães não sedados e para os cães sedados. As idades médias registadas foram de 7,8 anos para os cães não sedados e de 5,6 anos para os cães sedados (Tabela 9).

**Tabela 9** - Características dos animais incluídos na fase I do estudo.

Animal	Raça	Sexo	Peso (Kg)	Idade (anos)	Sedação
NA.1	Indefinida	F	21,7	8	x
NA.2	Indefinida	M	14,5	6	x
NA.3	Indefinida	M	17,0	12	x
NA.4	Indefinida	M	27,4	7	x
NA.5	Indefinida	F	23,7	6	x
NA.6	Indefinida	M	27,1	2	✓
NA.7	Indefinida	M	23,8	6	✓
NA.8	Indefinida	M	11,2	12	✓
NA.9	Indefinida	F	15,0	1	✓
NA.10	Indefinida	F	17,5	7	✓

NA. – Não Atópico. F – Fêmea. M – Macho.

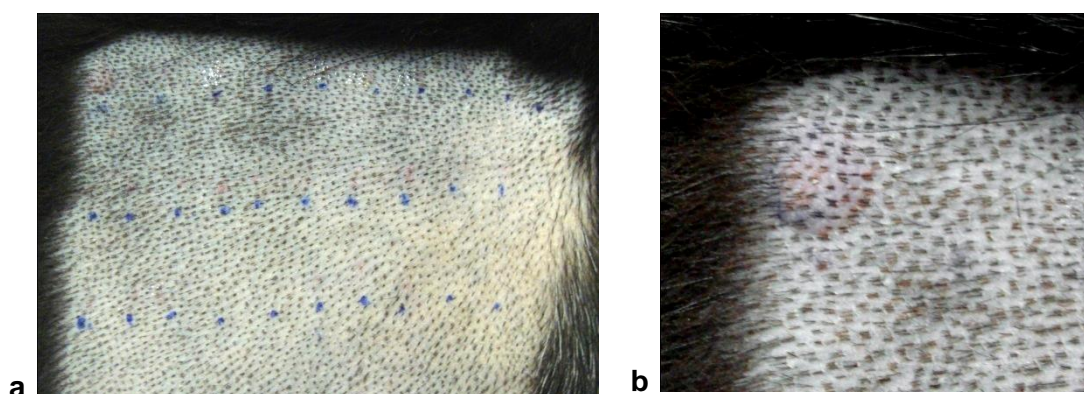
##### 3.1.2. AVALIAÇÃO PRÉVIA DAS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRACTOS A USAR NOS TCP

Na fase I, todos os animais sujeitos a TCP com os extractos alergénicos da ALK-Abelló® obtiveram testes válidos, isto é, apresentaram uma pápula túrgida e eritematosa no local de inoculação da histamina, correspondendo esta a uma reacção positiva, e não obtiveram qualquer reacção ao controlo negativo (Figura 6).

Nos cães não atópicos, as pápulas de histamina (controlo positivo) revelaram uma dimensão média de 6,8 mm ( $\sigma=1,55$  mm), não tendo sido registadas diferenças significativas entre o grupo de cães sedados e não sedados ( $p=0,1461$ ). As soluções dos extractos alergénicos utilizados não deram origem a qualquer reacção positiva nos cães testados nesta fase do estudo (Figura 6).

Para além da reacção local esperada, correspondente à turgidez e eritema na zona de inoculação da solução de histamina, eventualmente associado a uma baixo grau de prurido nos primeiros minutos após as picadas, não foram registadas quaisquer reacções adversas.

**Figura 6** - Reacções cutâneas (a) e pormenor da reacção ao controlo positivo (b) obtidos num cão não atópico por TCP (fotografias originais).



### 3.1.3. AVALIAÇÃO DO GRAU DE DOR

Dos 5 cães não sedados sujeitos a TCP, dois obtiveram uma pontuação total de 1 e os restantes foram classificados com 0 em todas as categorias comportamentais avaliadas (Tabela 10).

**Tabela 10** - Avaliação comportamental dos cães não atópicos não sedados durante e após os TCP (adaptação da *Short form of the Glasgow Composite Pain Scale*).

Animal	Categorias comportamentais					Total
	(i)	(ii)	(iii)	(iv)	(v)	
NA.1	0	0	0	0	0	0
NA.2	0	0	0	0	0	0
NA.3	0	0	0	1	0	1
NA.4	0	0	0	1	0	1
NA.5	0	0	0	0	0	0

NA. – Não Atópico. Categorias comportamentais: (i) Vocalização; (ii) Atenção dada ao foco de dor; (iii) Resposta ao toque; (iv) Atitude; (v) Postura/actividade.

### 3.1.4. DOSEAMENTO DO CORTISOL SÉRICO

Os níveis séricos de cortisol da população não atópica em estudo, antes (T0) e após (T1) a aplicação dos TCP, encontram-se registados na Tabela 11. Pela análise desta, é possível verificar que todas as determinações se encontram dentro dos valores fisiológicos de referência para o cão - 0,5 a 6,0 µg/dl (Feldman & Nelson, 2004). A concentração máxima obtida foi de 3,7 µg/dl para os cães não sedados e de 2,7 µg/dl para os cães sedados. Em 2 dos 5 animais não sujeitos a sedação, os níveis de cortisol após a realização dos TCP foram ligeiramente superiores aos níveis encontrados antes do procedimento; por outro lado, no grupo de animais sedados, o aumento da concentração de cortisol após os TCP só se verificou num dos indivíduos.



**Tabela 11** - Doseamento do cortisol sérico antes (T0) e após (T1) a realização de TCP em cães não atópicos.

<b>Animal</b>	<b>Sedação</b>	<b>T0 (µg/dl)</b>	<b>T1 (µg/dl)</b>
NA.1	x	<1	1,1
NA.2	x	1,9	3,7
NA.3	x	1,1	<1
NA.4	x	2,5	2,4
NA.5	x	2,1	1,1
NA.6	✓	2,3	1,4
NA.7	✓	3,4	2,1
NA.8	✓	2,6	2,2
NA.9	✓	1,2	<1
NA.10	✓	1,4	2,7

NA. - Não Atópico.

## 3.2. Fase II

### 3.2.1. CARACTERÍSTICAS DOS ANIMAIS EM ESTUDO

Para a realização das provas alergológicas cutâneas na fase II foram seleccionados 13 cães atópicos, 4 machos e 9 fêmeas, e destes apenas 4 são cães de raça indefinida. Estes animais apresentam uma média de 4,5 anos e um peso médio de 24,8 kg. Todos os cães atópicos incluídos nesta fase pertencem à área metropolitana de Lisboa; 6 vivem apenas em ambiente interior e os restantes habitam tanto no interior como no exterior (Tabela 12).

**Tabela 12** - Características dos animais incluídos na fase II do estudo.

<b>Animal</b>	<b>Raça</b>	<b>Sexo</b>	<b>Peso (Kg)</b>	<b>Idade (Anos)</b>	<b>Ambiente</b>
A.1	Bulldog Inglês	M	30,2	4	Interior
A.2	Indefinida	F	29,0	5	Interior e exterior
A.3	Indefinida	M	20,3	1	Interior
A.4	Indefinida	F	20,6	9	Interior e exterior
A.5	Bulldog Inglês	F	17,2	4	Interior e exterior
A.6	WHWT	F	8,9	8	Interior e exterior
A.7	Indefinida	F	39,0	5	Interior e exterior
A.8	Pastor Alemão	M	42,9	8	Interior e exterior
A.9	Labrador Retriever	M	29,4	2	Interior
A.10	Indefinida	F	10,8	5	Interior e exterior
A.11	Braco Alemão	F	21,5	1	Interior
A.12	Labrador Retriever	F	28,8	3	Interior
A.13	Weimaraner	F	23,9	3	Interior

A. - Atópico. F - Fêmea. M - Macho.

### 3.2.2. RESULTADOS DOS TID E DOS TCP EFECTUADOS NOS CÃES ATÓPICOS.

Na segunda fase do presente estudo não foram registadas quaisquer reacções adversas sistémicas, tendo-se verificado apenas algum grau de prurido associado às pápulas túrgidas e eritematosas típicas dos testes cutâneos, o qual foi controlado, em todos os casos, através da administração de GC tópicos após a sessão.

Os TID efectuados nos cães atópicos foram considerados válidos na sua totalidade, uma vez que, em todos eles, a injeção da solução correspondente ao controlo positivo deu origem a uma reacção positiva (pápula túrgida e eritematosa) e a injeção da solução do controlo negativo não provocou qualquer reacção cutânea visível. Contudo, um destes cães (A.9) não obteve resultados válidos nos TCP, pois a inoculação do controlo negativo deu origem a uma pequena pápula visível, pelo que foi excluído do estudo.

Das 336 injeções intradérmicas realizadas com extractos alergénicos nesta fase do estudo, resultaram 83 reacções positivas e 253 negativas. O diâmetro médio das pápulas de histamina obtidas nos TID foi de 2,07 cm ( $\sigma=0,43$  cm), enquanto os alergénios positivos nos mesmos testes deram origem a pápulas com 1,0 a 2,0 cm de diâmetro médio (48,4 a 96,8% da pápula do controlo positivo).

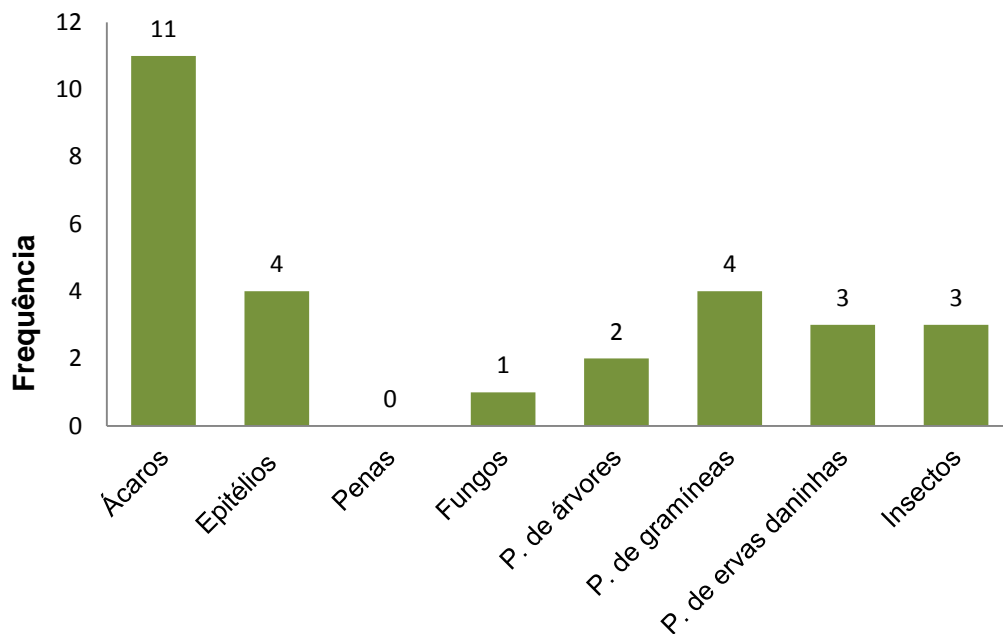
Os resultados mais relevantes obtidos pela aplicação de TID nos 12 cães atópicos, cujos testes foram considerados válidos nesta fase do estudo, são os seguintes:

- Apenas um animal (A.1) não reagiu à injeção intradérmica dos extractos alergénicos; o seu diagnóstico foi, assim, classificado como Dermatite do tipo atópico (Halliwell, 2006). Os restantes animais (n=11) testados demonstraram-se sensibilizados, no mínimo, a 5 alergénios diferentes.
- O grupo de aeroalergénios que originou mais respostas positivas nos TID foi o dos ácaros (11/12) (Figura 7), seguindo-se os grupos dos epitélios (4/12), dos pólenes de gramíneas (4/12), dos pólenes de ervas daninhas (3/12), dos insectos (3/12), dos pólenes de árvores (2/12) e, por fim, o grupo dos fungos (1/12). As penas não revelaram qualquer reacção nos animais testados (Figura 8).
- Individualmente, os alergénios com maior número de sensibilizações foram o ácaro do pó *Dermatophagoides farinae* (10/12) e os ácaros de armazenamento *Acarus siro* (10/11), *Tyrophagus putrescentiae* (10/12) e *Lepidoglyphus destructor* (10/12), logo seguidos do ácaro do pó *Dermatophagoides pteronyssinus* (9/12), como é possível verificar na Tabela 14.

**Figura 7** - Resultados positivos a alergénios de ácaros domésticos nos TID realizados num cão atópico (fotografia original).



**Figura 8** - Distribuição das sensibilizações registadas nos TID por grupos de alergénios.



Nos cães atópicos, as pápulas obtidas pela inoculação de histamina através da técnica de picada (Figura 9) apresentaram um diâmetro médio de 8 mm ( $\sigma=2,05$  mm). Não foram, contudo, registadas diferenças significativas entre a dimensão destas e a das pápulas de histamina obtidas nos cães não atópicos estudados na fase I do presente estudo ( $p=0.1051$ ).

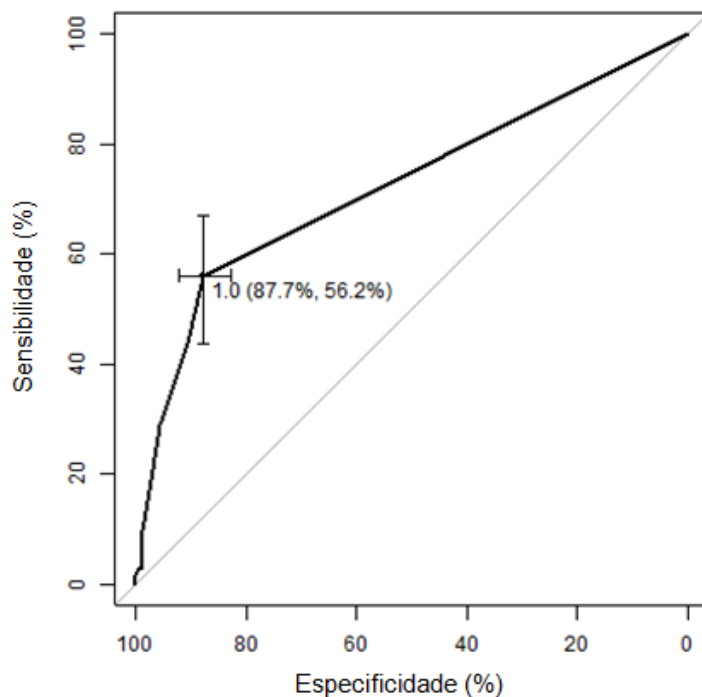
**Figura 9** - Respostas cutâneas à inoculação do controlo positivo por TID e TCP.



Seta azul – Reacção cutânea ao controlo positivo obtida por TID. Seta verde - Reacção cutânea ao controlo positivo obtida por TCP.

Da análise ROC efectuada, resultou um valor de *cut-off* para a positividade dos TCP de 1 mm. Utilizando este limiar, encontrou-se uma sensibilidade de 0,562 (IC 95% 0,452-0,671), uma especificidade de 0,877 (IC 95% 0,827-0,922), um VPP de 0,651 (IC 95% 0,520-0,767) e um VPN de 0,831 (IC 95% 0,769-0,881). A área estimada sob a curva ROC foi de 0,724 (Figura 10).

**Figura 10** - Curva ROC para o valor de *cut-off* (1 mm).



Visto não terem sido registadas pápulas com diâmetro inferior a 1 mm, considerou-se que qualquer pápula visível no local de inoculação de um alergénio correspondeu, efectivamente, a um resultado positivo. Assim, das 252 picadas de alergénios aplicadas nesta fase, resultaram 63 reacções positivas e 189 respostas negativas. Os alergénios positivos deram origem a pápulas com dimensões médias de 3 a 5 mm (30,3 a 64,6% da pápula de histamina). Na Tabela 13 apresentam-se os resultados da análise estatística efectuada para o grupo dos ácaros e individualmente para cada alergénio desse mesmo grupo. Os restantes grupos não foram avaliados, dado o reduzido número de sensibilizações registado.

**Tabela 13** - Análise estatística dos resultados obtidos por TCP para os ácaros domésticos (*cut-off* de 1 mm).

<b>Alergénios</b>	<b>Se (IC 95%)</b>	<b>Sp (IC 95%)</b>	<b>VPP% (IC 95%)</b>	<b>VPN (IC 95%)</b>
<i>Der f</i>	0.700 (0.348 - 0.933)	1.000 (0.158 - 1.000)	1.000 (0.590 - 1.000)	0.400 (0.053 - 0.853)
<i>Der p</i>	0.778 (0.340 - 0.972)	1.000 (0.292 - 1.000)	1.000 (0.590 - 1.000)	0.600 (0.147 - 0.947)
<i>Aca s</i>	0.200 (0.025 - 0.556)	0.500 (0.013 - 0.987)	0.667 (0.094 - 0.991)	0.111 (0.003 - 0.483)
<i>Tyr p</i>	0.800 (0.444 - 0.975)	0.500 (0.013 - 0.987)	0.889 (0.517 - 0.997)	0.333 (0.008 - 0.906)
<i>Lep d</i>	0.600 (0.263 - 0.878)	0.500 (0.013 - 0.987)	0.857 (0.421 - 0.996)	0.200 (0.005 - 0.717)
<b>Ácaros</b>	0.612 (0.462 - 0.748)	0.727 (0.391 - 0.940)	0.909 (0.757 - 0.981)	0.296 (0.137 - 0.502)

*Der f* - *Dermatophagoides farinae*; *Der p* - *Dermatophagoides pteronyssinus*; *Aca s* - *Acarus siro*; *Tyr p* - *Tyrophagus putrescentiae*; *Lep d* - *Lepidoglyphus destructor*. Se - Sensibilidade; Sp - Especificidade; VPP - Valor preditivo positivo; VPN - Valor preditivo negativo; IC - Intervalo de confiança a 95%

Na Tabela 14 encontram-se registados, para cada alergénio, o número de respostas positivas e negativas obtidas em cada uma das técnicas aplicadas e o respectivo valor de k. De uma forma geral, obteve-se um nível de concordância moderado (k=0,46).

Apenas um (*Acarus siro*) dos alergénios testados revelou diferenças significativas entre os resultados dos dois testes (TID e TCP) pelo teste de McNemar (p=0.0455).

Tabela 14 - Resultados dos TID e dos TCP obtidos nos 12 cães atópicos estudados.

Grupo	N.º	Alergénios Nome	TID		TCP		Concordância (k)		
			Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Individual	Grupo	
Ácaros	3	<i>Dermatophagoides farinae</i>	10	2	7	5	0,44	Mo	0,22 R
	4	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	9	3	7	5	0,64	S	
	5	<i>Acarus siro</i>	10	2	3	9	-0,13	P	
	6	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	10	2	9	3	0,25	R	
	7	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	10	2	7	5	0,06	P	
Epitélios	8	<i>Felis catus</i>	4	8	2	10	0,57	Mo	0,57 Mo
Penas	10	Mistura de penas	0	12	2	10	0,00	P	0,00 P
Fungos	11	<i>Alternaria alternata</i>	0	12	0	12	N/A		0,00 P
	12	<i>Cladosporium herbarum</i>	0	12	1	11	0,00	P	
Pólenes de árvores	14	<i>Platanus occidentalis</i>	1	11	2	10	0,63	S	0,21 R
	15	<i>Cupressus arizonica</i>	0	12	1	11	0,00	P	
	17	<i>Olea Europa</i>	2	10	1	11	-0,13	P	
Pólenes de gramíneas	18	<i>Dactylis glomerata</i>	2	10	1	11	0,63	S	0,18 Fr
	19	<i>Festuca pratensis</i>	3	9	2	10	0,25	R	
	20	<i>Poa pratensis</i>	2	10	2	10	-0,20	P	
	21	<i>Lolium perenne</i>	0	12	3	9	0,00	P	
	22	<i>Cynodon dactylon</i>	1	11	4	8	0,31	R	
Pólenes de ervas daninhas	23	<i>Phleum pratense</i>	2	10	3	9	0,25	R	0,49 Mo
	25	<i>Artemisia vulgaris</i>	2	10	2	10	0,40	Mo	
	26	<i>Chenopodium album</i>	3	9	3	9	0,56	Mo	
Insectos	28	<i>Periplaneta a./ Blatella germânica</i>	2	10	1	11	0,63	S	0,63 S

N/A – Não aplicável

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Fase I

Tal como será posteriormente discutido, na primeira fase do presente estudo, verificámos que a técnica de picada em cães:

- pode ser efectuada recorrendo aos extractos alergénicos da ALK-Abelló® utilizados sem que sejam esperadas reacções irritantes falso-positivas;
- é de fácil execução e praticamente indolor;
- mantém os níveis de cortisol sérico dentro dos valores fisiológicos.

#### 4.1.1. AVALIAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS EXTRACTOS USADOS NOS TCP

Tendo em conta que todos os cães não atópicos obtiveram testes válidos sem qualquer reacção positiva aos alergénios, é possível considerar que as concentrações dos extractos usados na fase I deste estudo podem ser aplicadas em cães atópicos sem que sejam esperadas reacções falso-positivas devidas a este factor.

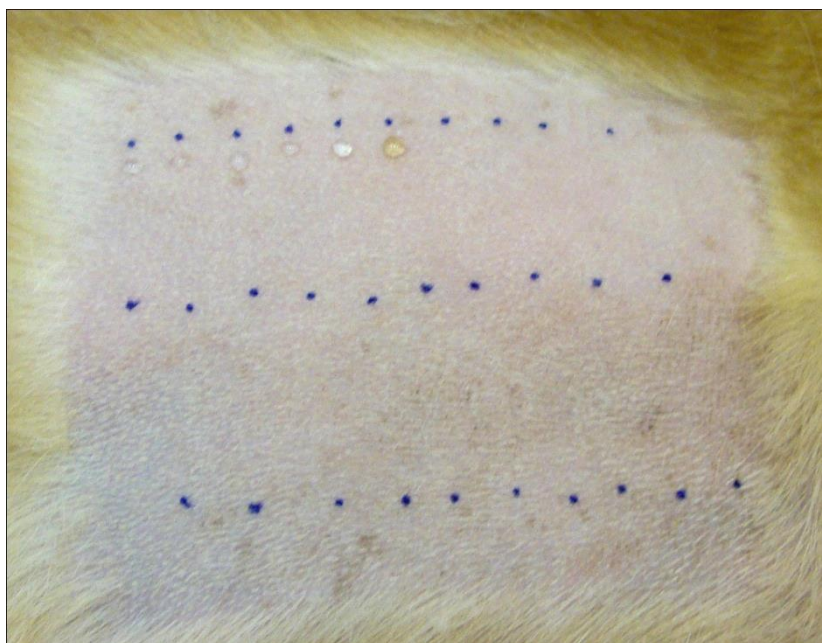
À semelhança do que é referido na literatura no que diz respeito aos TID (Reedy et al., 1997; Hillier & DeBoer, 2001), também nos TCP os extractos alergénicos devem ser usados na concentração máxima disponível que não provoque reacções irritantes em mais de 10% dos animais não atópicos estudados. Assim, de forma a garantir que as concentrações dos extractos alergénicos da ALK-Abelló®, normalmente utilizados em alergologia humana, não provocam reacções falso-positivas em cães atópicos, começou-se por testar esses mesmos extractos em 10 cães clinicamente não atópicos.

Estes resultados estão de acordo com o estudo preliminar anteriormente realizado em cães não atópicos (Rocha, 2012), no qual foi aplicada uma série de extractos semelhantes àqueles aqui utilizados, confirmando-se, agora, a resposta negativa a um maior número de alergénios, o que, à partida, já nos indica que este tipo de teste terá uma boa especificidade. No presente trabalho, o valor médio dos diâmetros da pápula de histamina obtido em cães não atópicos (6,8 mm) foi significativamente superior (Teste de Wilcoxon,  $p < 0,05$ ) à média encontrada no estudo anterior (4,9 mm) (Rocha, 2012). Ambos os ensaios utilizaram soluções de histamina provenientes do mesmo fabricante (ALK-Abelló®), com igual composição e potência, pelo que as diferenças registadas se podem dever apenas a variações na pressão exercida durante as picadas (Dreborg, 2001). A pressão realizada é difícil de uniformizar entre pessoas e mesmo entre picadas efectuadas pela mesma pessoa; por isso, segundo Dreborg (2001), em MH é recomendado que o tamanho da pápula obtida para o controlo positivo (dihidroclorato de histamina a 10 mg/ml) seja de 6 mm para a maioria dos indivíduos, o que foi conseguido nos pacientes caninos testados nesta fase do estudo.

#### 4.1.2. FACILIDADE DE EXECUÇÃO E GRAU DE DOR DA TÉCNICA DE PICADA EM CÃES

Corroborando os resultados do estudo preliminar (Rocha, 2012), foi possível confirmar a facilidade e rapidez de execução do método de picada mesmo em cães não sedados. Tal como em alergologia humana, a execução dos TCP não exige tanta experiência por parte do operador como os TID (ASCIA, 2009) e uma única pessoa foi suficiente para a aplicação de uma simples técnica de contenção, semelhante àquela necessária para a realização de procedimentos médicos básicos, como o corte de unhas. Efectivamente, evitar que as gotas, depositadas sobre a superfície cutânea, escorressem não foi um obstáculo à execução destes testes, afastando assim um dos receios previamente apontados (Hillier & DeBoer, 2001). Aliás, à semelhança do que se pratica em pacientes humanos (ASCIA, 2009), foi possível aplicar várias gotas de alergénios antes de efectuar as respectivas picadas (Figura 11). Naturalmente, em cães menos cooperantes, este procedimento poderá ser realizado para cada alergénio individualmente, o que não invalida, contudo, a sua possibilidade de execução. Nestes casos, uma boa opção poderá ser ainda a utilização de dispositivos de cabeça múltipla, em substituição das lancetas individuais, uma vez que, ao permitirem a inoculação de vários extractos ao mesmo tempo, tornam a técnica mais rápida (Nelson et al., 1998).

**Figura 11** - Várias gotas depositadas sobre a superfície cutânea antes das respectivas picadas (fotografia original).



Independentemente do temperamento do animal a testar, é da responsabilidade do médico veterinário procurar a técnica que, para além de bom meio de diagnóstico, seja também a menos dolorosa. Em MH, o tipo de dispositivo utilizado neste tipo de testes é um dos factores que mais influência tem no grau de dor manifestado pelos pacientes (Oppenheimer



& Nelson, 2006a; Antunes et al., 2009). No presente estudo foram utilizadas lancetas metálicas com ponta de 1 mm da ALK-Abelló® (Figura 12), pois este tipo de dispositivo é um dos menos traumáticos comercialmente disponíveis para a realização da técnica de picada em alergologia humana (Nelson, Rosloniec, McCall & Iklé, 1993; Almarales et al., 2005; Masse et al., 2011).

**Figura 12** - Lanceta metálica com ponta de 1 mm de penetração da ALK-Abelló® (fotografia original).



Em MV, de entre os sinais mais evidentes de dor encontram-se as mudanças comportamentais, pelo que a presença destas é, frequentemente, avaliada recorrendo a escalas que classificam as reacções do animal a uma determinada situação dolorosa (Hellyer et al., 2007). Muitas das escalas existentes para uso veterinário derivam das escalas de heteroavaliação de dor já desenvolvidas em MH, particularmente para estimativa de dor em crianças pré-verbais (Hansen, 2003). Actualmente existem várias escalas comportamentais para avaliação do grau de dor em cães, nomeadamente as desenvolvidas pelas Universidades de Melbourne (Firth & Haldane, 1999), de Glasgow (Holton, Reid, Scott, Pawson & Nolan, 2001) e do Estado do Colorado (Hellyer, Uhrig, & Robinson, 2006).

Na ausência de uma escala devidamente validada para avaliação da dor provocada por testes cutâneos ou similares em cães, a selecção da escala a adoptar no presente estudo foi efectuada com base em trabalhos já publicados em MH. Num estudo português (Duarte et al., 2010), realizado com o objectivo de avaliar a dor provocada por TCP numa população em idade pediátrica, foram aplicadas três escalas diferentes: uma escala de heteroavaliação de OPS (*Objective pain scale*), com excepção da medição da pressão arterial, em crianças com idades compreendidas entre os 2 e os 5 anos; uma escala de auto-avaliação de faces, em crianças dos 5 aos 8 anos; e uma escala numérica, em crianças dos 9 aos 12 anos. A OPS, usada em crianças pré-verbais, é uma escala de heteroavaliação de dor que consiste na análise da pressão arterial e de 4 categorias comportamentais (choro, movimentos, agitação e verbalização ou linguagem corporal) pontuadas de 0 a 2 (Broadman, Rice & Hannallah, 1988). Tais categorias são em tudo semelhantes às avaliadas na população canina pela Escala Composta de Dor de Glasgow, o que motivou a utilização desta última no presente trabalho.

Assim, foi realizada uma adaptação da forma abreviada da escala de dor da Universidade de Glasgow (Reid et al., 2007), originalmente desenvolvida com o objectivo de classificar a dor aguda pós-cirúrgica em cães. Esta escala permite descrever a dor, rápida e facilmente, através de palavras ou expressões objectivas e habitualmente utilizadas na prática clínica veterinária. Com a sua aplicação durante e após a realização dos TCP, a pontuação total máxima obtida (em 2 dos 5 cães avaliados) foi 1 em 20, ficando este valor muito abaixo do limiar (5 em 20) indicado pelos autores para a administração de analgesia (Reid et al., 2007). Deste modo, podemos considerar que, tal como sugerido por estudos anteriores (Ballauf, 1991; Rocha, 2012), a técnica de picada constitui um procedimento pouco doloroso nos cães, à semelhança daquilo que, aliás, foi verificado em MH. No trabalho de Duarte e seus colaboradores, a baixa pontuação obtida em todas as escalas utilizadas revelou que a dor provocada por esta técnica em crianças é de baixa intensidade e transitória, podendo corresponder apenas ao desconforto devido, muito provavelmente, ao prurido e ansiedade relacionados com o procedimento. De facto, o comportamento das crianças pode ser influenciado por procedimentos médicos anteriormente experienciados, sendo particularmente importante, nestes casos, a aplicação de métodos não farmacológicos (Duarte et al., 2010).

Embora o desconforto associado a esta técnica seja mínimo, acreditamos que a sua aplicação em cães possa, em certos casos, vir a ser melhor tolerada na presença dos respectivos proprietários. Ao contrário dos TID, os TCP podem, como será discutido adiante, vir a ser realizados sem qualquer tipo de sedação, não havendo, portanto, qualquer inconveniente decorrente da assistência dos donos ao procedimento. Estes podem mesmo contribuir para o conforto do animal, auxiliando no emprego de técnicas de distração semelhantes às utilizadas em crianças (Mahé, Soussan & Sigal, 2011), como o recurso a brinquedos que desviem a atenção do animal do foco de dor. Associado a estes métodos não farmacológicos de controlo de dor é importante que todo o procedimento seja realizado num ambiente calmo e confortável, com o menor grau de contenção possível, de modo a reduzir ao máximo a ansiedade do paciente (Mahé et al., 2011).

#### **4.1.3. DOSEAMENTO DO CORTISOL SÉRICO**

Perante uma situação de stress, para além de alterações comportamentais, os cães podem manifestar respostas fisiológicas que reflectem mudanças na actividade do sistema adreno-medular simpático e do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (Beerda, Schilder, van Hooff & de Vries, 1997; Beerda, Schilder, van Hooff, de Vries & Mol, 1998). A avaliação deste último é, normalmente, realizada através do doseamento do cortisol plasmático (Beerda et al., 1997), tendo este parâmetro fisiológico sido já utilizado em vários trabalhos como indicador de stress nos cães (Frank et al., 1992; Fox, Mellor, Firth, Hodge, & Lawoko, 1994; Hennessy, Davis, Williams, Mellott, & Douglas, 1997; Fox, Mellor, Lawoko, Hodge, & Firth,

1998; Hennessy et al., 2001; Marcovich, Williams, Seifman, & Wolf, 2001; Steiss, Schaffer, Ahmad, & Voith, 2007; Haverbeke, Diederich, Depiereux & Giffroy, 2008).

Frank e seus colaboradores usaram o cortisol plasmático para avaliar o nível de stress induzido pela realização de TID em cães, reportando um aumento da cortisolémia nos animais não sedados relativamente àqueles submetidos a sedação durante o procedimento. Segundo os autores, os níveis de cortisol mantiveram-se dentro dos valores normais fisiológicos e as elevações verificadas não influenciaram as respostas cutâneas às injeções intradérmicas dos alergénios, uma vez que não foram registadas diferenças significativas na concentração de cortisol entre cães sedados e não sedados com resultados positivos ou falso-negativos (Frank et al., 1992).

Todos os cães analisados nesta fase do estudo revelaram concentrações séricas de cortisol abaixo do limite superior de referência de 6,0 µg/dl (Feldman & Nelson, 2004), tanto antes (T0) como após (T1) a execução dos TCP. Curiosamente, embora sempre dentro dos valores fisiológicos, alguns dos cães testados obtiveram níveis de cortisol ligeiramente superiores na primeira colheita relativamente à segunda, o que não nos surpreende dado o grau de agitação por eles demonstrado ao serem transferidos do canil para a sala de execução dos testes cutâneos. Haubenhofe e Kirchengast (2006) trabalharam com cães usados em actividades e terapias assistidas por animais e verificaram que as actividades realizadas por estes durante as suas sessões, incluindo a exposição a novos ambientes e a pessoas desconhecidas, podem influenciar a excitação fisiológica dos cães; embora isto não corresponda necessariamente a um estímulo negativo, o efeito foi o aumento da produção de cortisol (Haubenhofe & Kirchengast, 2006). Algo semelhante poderá ter ocorrido com os cães do canil do Hospital Escolar da FMV-UTL ao serem por nós abordados e transportados para um local diferente do habitual.

Após a primeira colheita, já instalados e adaptados ao novo ambiente, os cães provenientes do canil tiveram a oportunidade de receber atenção e carinho, o que poderá ter influenciado a descida dos valores de cortisol uma hora depois dos testes. De acordo com alguns dos trabalhos publicados por Hennessy e seus colaboradores, 20 minutos de interacção humana podem acalmar e prevenir o aumento dos níveis de cortisol em situações de stress. O contacto físico parece ser útil na redução da resposta hipotalâmica-pituitária-adrenal, não só em cães confinados em canis, como, provavelmente, em qualquer canídeo sujeito aos procedimentos médicos efectuados, por rotina, nos centros de atendimento veterinário (Hennessy, Williams, Miller, Douglas & Voith, 1998; Hennessy et al., 2002). Efectivamente, os métodos de distração aplicados durante e após a execução dos TCP no presente ensaio podem ter ajudado a diminuir ou a prevenir a elevação da concentração sérica de cortisol em alguns dos cães não atópicos, o que, como já foi referido, pode funcionar como um bom método para controlo não farmacológico da dor.

Embora alguns estudos apontem que bastam alguns minutos para activar o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (Hennessy, Heybach, Vernikos & Levine, 1979; Hennessy et al., 1998), o tempo de semi-vida do cortisol no plasma é superior a 70 minutos (Kirschbaum & Hellhammer, 1989). Assim, o período decorrido entre a execução dos TCP e a segunda colheita permitiu garantir que, havendo elevação nos níveis de cortisol, mesmo sendo esta transitória, tal seria provado. A grande maioria dos valores de cortisol obtidos na segunda colheita são inferiores a metade do limite máximo fisiológico, o que significa que, mesmo que as concentrações tenham diminuído para metade ao fim de uma hora, nunca terão ultrapassado os valores de referência. Além disso, um dos métodos utilizados na prática clínica para diagnóstico de hiperadrenocorticismo no cão consiste na determinação dos valores de cortisol antes e uma hora após a administração de hormona adrenocorticotrófica sintética (Feldman & Nelson, 2004). Independentemente da via de administração (endovenosa ou intramuscular) da mesma, as concentrações séricas de cortisol, medidas em cães saudáveis, entre os 60 e os 90 minutos demonstraram ser significativamente superiores às concentrações determinadas aos 30 ou aos 120 minutos (Behrend, Kempainen, Bruyette, Busch & Lee, 2006).

Apesar de tudo, os resultados apontam que esta técnica seja, de facto, menos dolorosa do que a injeção dos alérgenos por via intradérmica, uma vez que todos os animais do presente estudo revelaram níveis de cortisol abaixo da média determinada em cães não sedados após a realização de TID (4,86 µg/dl) (Frank et al., 1992). Além disso, não foram verificadas diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na dimensão média das pápulas correspondentes ao controlo positivo entre cães sedados e não sedados, o que nos indica que, à semelhança dos TID (Frank et al., 1992), as alterações na cortisolémia, decorrentes da execução da técnica sem o recurso a sedação, não têm influência na validade dos TCP. A própria colheita de sangue é, por vezes, referida como um factor de stress, contribuindo para o aumento dos níveis de cortisol. Mas, embora se possa efectuar o doseamento da mesma hormona na saliva dos cães (Vincent, & Michell, 1992; Beerda, Schilder, Janssen & Mol, 1996), este último método parece ter ainda algumas limitações e variações inter e intra-individuais (Dreschel, & Granger, 2009). Além disso, tanto a venopunctura como o recurso a cateter venoso demonstraram não provocar alterações nos níveis de cortisol plasmático, sobretudo em cães já familiarizados com este tipo de procedimentos (Knol, Dieleman, Bevers, van den Brom, & Molt, 1992), como é o caso dos animais do canil do Hospital Escolar da FMV-UTL. De qualquer forma, para reduzir a possibilidade da venopunctura influenciar a actividade do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, as colheitas foram realizadas no menor tempo possível (Hennessy et al., 1997, 1998, 2001). Deste modo, havendo consequências deste método de colheita, tal só se viria a verificar nas concentrações de T1, o que, como vimos, não se veio a confirmar.

A evolução dos níveis plasmáticos de cortisol ao longo do dia é algo que continua por esclarecer nos cães. As flutuações verificadas na sua concentração devem-se à forma episódica pela qual é efectuada a secreção desta hormona (Takahashi, Ebihara, Nakamura & Takahashi, 1981; Kemppainen & Sartin, 1984; Feldman & Nelson, 2004), mas não parece estar presente um ritmo circadiano evidente no cortisol plasmático (Takahashi et al., 1981; Kemppainen & Sartin, 1984; Beerda et al., 1996; Haverbeke et al., 2008; Pessina et al., 2009); ou, existindo, tal facto está sobretudo relacionado com a actividade do animal durante o dia, isto é, diminui após os períodos de descanso e aumenta após os momentos de maior actividade (Kolevská, Brunclík & Svoboda, 2003; Castillo et al., 2009). No presente estudo, embora nem todos os animais tenham sido sujeitos aos TCP à mesma hora do dia, todos eles se encontravam em semelhante nível de actividade antes de serem transferidos do canil para a sala de execução dos testes cutâneos, não sendo de esperar, portanto, diferenças nas concentrações de cortisol daí resultantes. As oscilações nos valores de cortisol podem, contudo, corresponder simplesmente aos picos fisiológicos de produção da hormona.

#### **4.2. Fase II**

Na fase II deste estudo foi possível verificar que todos os cães com DA, confirmada por TID, obtiveram resultados positivos nos TCP a, pelo menos, alguns dos alergénios testados. Adicionalmente, a técnica de picada revelou ter uma capacidade discriminatória aceitável ( $AUC=0,724$ ) em cães.

Depois de nos certificarmos que as concentrações dos alergénios disponíveis não provocam reacções irritantes em cães não atópicos, foi possível avançar para a segunda fase do estudo, testando os mesmos extractos agora em cães com diagnóstico clínico de DA. Porém, num dos animais testados (A.1), apesar deste ser indicativo de DAc, nenhum dos extractos alergénicos deu origem a uma resposta positiva nos TID, sendo assim classificado como Dermatite do tipo atópico (Halliwell, 2006). Neste caso, os resultados dos TCP foram totalmente concordantes com os dos TID, não tendo sido observada qualquer reacção para além da correspondente à inoculação do controlo positivo.

O reduzido número de animais sujeitos a TID na segunda fase do estudo coloca-nos algumas limitações no que diz respeito à relevância das conclusões que possam ser efectuadas. Contudo, e embora não seja este o principal objectivo do presente trabalho, antes de nos debruçarmos sobre as respostas obtidas pela técnica de picada, parece-nos importante tecer algumas considerações relativamente aos resultados dos TID, de forma a verificar se estes estão de acordo com o esperado:

- A totalidade dos animais com DAc apresentou reacções positivas a mais do que um ácaro doméstico. Tendo em consideração que todos os animais em estudo passam, pelo menos parte do seu tempo, em ambiente interior, a elevada frequência de

sensibilizações face a estes alergénios já seria de esperar, pois o ambiente doméstico parece favorecer a sua exposição (Marsella & Samuelson, 2009; Lourenço-Martins et al., 2010).

- Os ácaros *Acarus siro* e *Tyrophagus putrescentiae* revelaram uma maior percentagem de sensibilização (10/12) nos TID do que o esperado tendo em conta que não são estes mas sim os ácaros do pó, sobretudo do género *Dermatophagoides*, aqueles cujas reacções de hipersensibilidade são consideradas mais frequentes nos cães atópicos (Hill & DeBoer, 2001; Nuttall et al., 2006). Além disso, num estudo português realizado na mesma região geográfica, apenas metade dos cães atópicos testados se mostrou sensibilizada para estes dois ácaros após TID (Lourenço-Martins, 2010). Interessantemente, tal como se previa (Lourenço-Martins, 2010), o ácaro *Lepidoglyphus destructor*, adicionado à bateria de alergénios testados no presente estudo, obteve, à semelhança dos restantes ácaros de armazenamento, uma elevada percentagem de reacções positivas nos TID (10/12).
- Grande parte da população testada por via intradérmica (10/12) mostrou-se sensibilizada, no mínimo, para um dos ácaros do pó (*Der f* e *Der p*), o que corrobora com o estudo já realizado numa população canina (n=138) a viver na área metropolitana de Lisboa (Lourenço-Martins, 2010).
- As únicas espécies de pólenes que provocaram reacções positivas em mais de dois dos indivíduos em estudo foram *Festuca pratensis* (3/12) e *Chenopodium album* (3/12), resultados estes que se revelam concordantes com as percentagens relativamente elevadas obtidas para estes alergénios tanto em Portugal (9 e 13%, respectivamente) (Lourenço-Martins, 2010) como na Grécia (11 e 15%, respectivamente) (Saridomichelakis et al., 1999), países com características climáticas e, provavelmente, polínicas muito semelhantes.
- Dos TID efectuados com extractos de insectos, destacam-se as sensibilizações aos alergénios de pulga em 3 dos 12 animais estudados. De facto, em zonas endémicas para este parasita, como é a região de Lisboa, a DAc predispõe frequentemente ao desenvolvimento de DAPP (Sousa & Halliwell, 2001). Os resultados deste estudo estão, uma vez mais, de acordo com aqueles obtidos anteriormente num maior número de pacientes: 22% dos cães atópicos desta área geográfica apresentou uma reacção positiva 15 minutos após a injeção intradérmica deste alergénio (Lourenço-Martins, 2010)
- Nesta fase, os alergénios pertencentes ao grupo das penas não provocaram qualquer reacção nos cães testados. Face ao reduzido número de animais em estudo, tais resultados não nos surpreendem; este parece, de facto, ser um dos grupos de aeroalergénios para os quais a população canina do sul da Europa se

encontra menos sensibilizada (Saridomichelakis et al., 1999; Lourenço-Martins, 2010).

Uma das vantagens referidas em MH para o uso dos TCP em detrimento dos TID é a menor percentagem de reacções adversas (Bernstein et al., 2008). Em MV, embora os TID estejam associados a uma menor frequência deste tipo de reacções (Hillier & DeBoer, 2001; Scott et al., 2001), a técnica de picada parece ser igualmente segura, não havendo, segundo sabemos, registo de quaisquer reacções adversas em cavalos (Tilley et al., 2010) nem em cães (Ballauf, 1991; Rocha, 2012). O presente estudo corrobora com esta ideia, uma vez que em nenhum dos cães testados (atópicos e não atópicos) foram registados efeitos secundários da aplicação dos TCP, para além das reacções cutâneas localmente esperadas e do prurido a estas associado.

Apenas um dos cães (A.9) testados pela técnica de picada não originou um resultado válido, visto ter demonstrado uma reacção positiva no local de inoculação da solução correspondente ao controlo negativo. Contudo, visto ter sido um caso isolado e tal não ter ocorrido aquando da injeção intradérmica, acreditamos que possa ter sido fruto de algum tipo de contaminação a partir de um dos extractos alergénicos ou do próprio controlo positivo.

No presente estudo, aplicámos uma única picada por alergénio, ao contrário daquilo que já tem sido recomendado em alergologia humana (Dreborg, 2001) e aplicado até em equinos (Tilley et al, 2010; Tilley, Luís & Ferreira, 2012). Contudo, considerámos prudente não recorrer à duplicação dos testes, pois isso implicaria a execução de 46 (2 x 23) picadas a adicionar às 30 injeções intradérmicas efectuadas na mesma sessão, o que aumentaria o período de sedação. Além disso, Devenney e Fälth-Magnusson (2001), ao analisarem 1087 testes realizados em duplicado em crianças, encontraram apenas 1,3% de resultados contraditórios, concluindo que o risco adicional de reacções adversas não justificaria a deposição de um extracto extra. Parece-nos, porém, que seria algo a aplicar em futuros ensaios, caso estes sejam realizados sem sedação ou com menor número de testes por animal, de forma a investigar a precisão da técnica em cães.

Em MH, de acordo com as recomendações da *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*, devem ser consideradas positivas todas as reacções que, nos TCP a aeroalergénios, resultem numa pápula de diâmetro igual ou superior a 3 mm (Bousquet et al., 2012). Tanto quanto sabemos, nunca foi sugerido nenhum valor de *cut-off* para o diâmetro das pápulas resultantes da execução deste tipo de teste em cães.

Da análise ROC efectuada para todos os alergénios testados neste estudo, resultou um valor de *cut-off* geral de 1 mm, o que nos leva a pensar que, no cão, poderá não ser necessária a definição de um valor limite a partir do qual se possa considerar uma reacção positiva. Serão, pois, necessários estudos adicionais, que incluam um maior número de cães atópicos, para confirmar esta suspeita. Contudo, a diferença verificada quanto à

reactividade cutânea entre espécies não nos surpreende, tendo sido já reportada por Tilley et al. (2010) num estudo realizado em cavalos com ORVA. Neste, o *cut-off* proposto para o diâmetro das pápulas obtidas por TCP foi de 10 mm, valor bastante superior ao habitualmente referido em pacientes humanos.

Por outro lado, há que ter em consideração que, decorrente das diferenças existentes entre ambas as técnicas (volume, concentração e via de administração dos alergénios), a reactividade cutânea no TCP é naturalmente menor do que a encontrada no TID. Em equinos, por exemplo, o valor de *cut-off* sugerido para os TCP (Tilley et al., 2010) é inferior aos 15 mm anteriormente propostos para os TID (Lebis, Bourdeau, & Marzin-Keller, 2002). De igual modo, tendo em conta que a dimensão média para as pápulas correspondentes aos alergénios positivos nos TID foi, no presente estudo, de 1,0 a 2,0 cm, não poderíamos esperar obter pápulas de grandes dimensões na técnica de picada.

Tanto quanto sabemos, o único estudo que tentou comparar as reacções cutâneas obtidas por TID e TCP em cães foi realizado há mais de duas décadas por Ballauf (1991). Neste, concluiu-se que a aplicação da técnica de picada não era apropriada à espécie canina devido à obtenção de reacções fracas, difíceis de interpretar, apontando-se como única vantagem o facto de ser menos dolorosa do que a já bem conhecida injeção intradérmica. As respostas aos TCP foram consideradas relevantes se atingissem pelo menos 50% do tamanho da pápula do controlo positivo (histamina a 0,1%), tendo sido classificadas no máximo com “++” numa escala de “-” a “+++++” (Ballauf, 1991). A autora não nos dá a conhecer a dimensão objectiva das pápulas conseguidas e utiliza uma concentração de histamina 10 vezes inferior à do presente estudo, a qual já tinha sido abandonada em MH devido às pequenas pápulas e baixa reprodutibilidade que permite (Malling, 1984). Podemos, contudo, aferir que as reacções correspondentes à inoculação do controlo positivo obtidas por Ballauf teriam cerca de metade daquelas aqui alcançadas (Malling, 1984). Assim, visto que todas as respostas cutâneas aos extractos alergénicos do presente ensaio foram superiores a 25% da pápula de histamina a 10 mg/ml, então, provavelmente estas serão também maiores do que as pápulas dos alergénios positivos de Ballauf. Fica, contudo, por esclarecer se a justificação para tal ocorrência é a maior potência dos extractos alergénicos actualmente disponíveis ou o simples facto de, neste estudo, ao contrário do anterior, termos incluído apenas cães com diagnóstico clínico de DA cumpridores dos mais recentes critérios aprovados pela ITFCAD (Favrot et al., 2010; Olivry, 2010).

Não temos conhecimento de nenhum trabalho que, até hoje, tenha determinado os valores de sensibilidade e de especificidade dos TCP em cães. No entanto, Tilley e seus colaboradores usaram a mesma técnica em cavalos com ORVA e encontraram uma sensibilidade de 98% e uma especificidade de 73% (Tilley et al., 2010). Além disso, concluíram que estes testes são significativamente melhores do que os testes serológicos (IgE alergénio-específica no soro e no líquido de lavagem broncoalveolar) testados nos

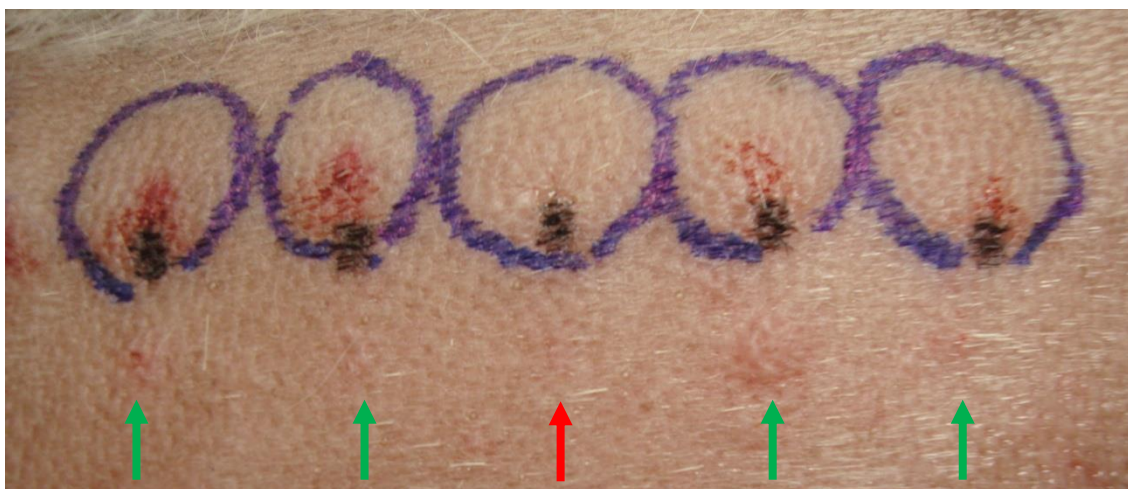


mesmos animais (Tilley et al., 2012), o que nos leva a acreditar que os TCP não são uma mais-valia apenas em MH; os TCP começam a dar passos importantes na alergologia veterinária.

Em alergologia humana, para compensar o menor volume de alergénio inoculado pelos TCP, comparativamente ao injectado por via intradérmica, vários autores recomendam a utilização da máxima concentração disponível para os extractos a usar na técnica de picada (Nelson, Oppenheimer, Buchmeier, Kordash & Freshwater, 1996; Wood, Phipatanakul, Hamilton & Eggleston, 1999). De facto, visto a sensibilidade dos TCP ser inferior à dos TID, para obter uma resposta nos TCP semelhante àquela resultante da injeção intradérmica com o mesmo alergénio, são necessárias concentrações 50 a 1000 vezes superiores (Oppenheimer et al., 2007; Bernstein et al., 2008; ASCIA, 2009). No presente estudo, os extractos alergénicos utilizados para a execução dos TCP não provinham do mesmo fabricante que aqueles utilizados nos TID. Além disto, as unidades usadas para exprimir a concentração dos alergénios são impossíveis de comparar, pelo que não nos foi possível efectuar este exercício.

O nível de concordância entre os resultados obtidos em cada uma das técnicas foi, em geral, moderado ( $k=0,46$ ), o que se poderá dever, por um lado, à menor sensibilidade dos TCP e, por outro, à menor especificidade dos TID. No entanto, não foram registadas diferenças significativas ( $p<0,05$ ) entre os resultados obtidos num e noutro teste, com a excepção do alergénio *Acarus siro* (Figura 13).

**Figura 13** - Reacções cutâneas aos alergénios de ácaros domésticos obtidas nos TID e nos TCP num cão com DA (fotografia original).



Círculos azuis: respostas positivas nos TID. Setas verdes: respostas positivas nos TCP. Seta vermelha: resposta negativa ao *Acarus siro* no TCP.

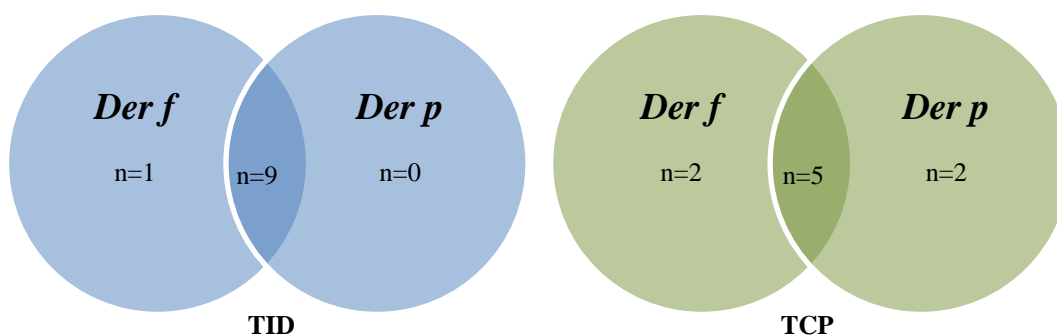
Possivelmente, nem todos os extractos alergénicos utilizados neste estudo se encontravam suficientemente concentrados para provocarem reacções positivas nos cães sensíveis a esses alergénios. De qualquer forma, a sensibilidade alcançada (56,2%) parece-nos promissora e, de certo, que poderá ser melhorada em futuros ensaios, caso se consiga obter extractos mais potentes. Uma vez que foram utilizados extractos disponíveis para uso em alergologia humana, a padronização da sua potência biológica foi, obviamente, feita com base na concentração dos alergénios *major* determinados para o Homem. No entanto, actualmente sabe-se, por exemplo, que, ao contrário do que acontece nas pessoas, os alergénios *Der f 1* (25kDa), *Der f 2* (14kDa), *Der p 1* (25kDa) e *Der p 2* (14kDa) não são as fracções alérgicas de maior importância nos cães (Nutall et al., 2006), mas sim uma quitinase de alto peso molecular (98/109kDa) definida como *Der f 15* (Noli, Bernadina & Willemse, 1996; McCall et al., 2001). A futura aplicação dos TCP em cães poderá vir a beneficiar da, ainda inexistente, padronização dos extractos alergénicos para uso em MV.

Tipicamente, os gatos apresentam reacções cutâneas nos TID mais fracas do que os cães, mas a combinação desses testes com a administração endovenosa de uma solução de fluoresceína demonstrou ser um bom método no diagnóstico da DA felina (Kadoya-Minegishi et al., 2002). De forma semelhante, talvez a injeção endovenosa de fluoresceína, aquando da realização dos TCP, venha facilitar a visualização das pápulas formadas em cães e, deste modo, contribuir para melhorar a sensibilidade da técnica.

Por seu turno, a elevada especificidade encontrada (87,7%) para os TCP neste estudo pode ser, à semelhança do que se verifica em MH (Bernstein et al., 2008), uma vantagem relativamente aos TID, uma vez que, ao reduzirmos o número de reacções falso-positivas, limitamos o número de alergénios a incluir na imunoterapia àqueles que realmente são relevantes. Em particular, a maior especificidade dos TCP ficou bem patente, neste estudo, no que diz respeito aos ácaros domésticos. Cerca de 90% das reacções positivas obtidas para estes alergénios na técnica de picada corresponderam, efectivamente, a respostas positivas nos TID.

Embora seja já reconhecida a possibilidade de reactividade cruzada entre *Der f* e *Der p* (Saridomichelakis et al., 2008), esta nem sempre acontece (Lourenço-Martins, 2010). Como podemos verificar pela Figura 14, o número de animais simultaneamente sensibilizados para *Der f* e *Der p* foi mais elevado nos TID (n=9) do que nos TCP (n=5). Possivelmente, um dos benefícios dos TCP poderá ser a melhor distinção dos casos em que a reactividade cruzada, de facto, não se verifica, correspondendo apenas a um fenómeno de co-sensibilização decorrente da menor especificidade dos TID. Ao mesmo tempo, seria vantajoso aproveitar os TCP para melhor perceber o verdadeiro papel do *Der p* na fisiopatologia da DAC.

**Figura 14** - Respostas cutâneas aos ácaros do pó nos TID e nos TCP efectuados em cães atópicos.



Vários ensaios realizados em pacientes humanos têm demonstrado que os resultados dos TCP se relacionam melhor com o quadro clínico de alergia do que aqueles obtidos nos TID (Oppenheimer & Nelson, 2006a; Oppenheimer et al., 2007). Embora os TID sejam reconhecidos pela sua maior sensibilidade (Oppenheimer et al., 2007; Bernstein et al., 2008; ASCIA, 2009), tal facto não parece acrescentar nenhum benefício e desconhece-se até que ponto é que isso se poderá traduzir num maior número de resultados falso-positivos (Oppenheimer & Nelson, 2006a; Oppenheimer et al., 2007). Neste sentido, a utilidade clínica dos TID tem sido questionada e alvo de diversos estudos que comparam os seus valores preditivos com os dos TCP (Tabelas 15 e 16). Embora seja necessário o desenvolvimento de estudos semelhantes a estes para alergénios menos potentes e não padronizados, grande parte dos trabalhos publicados na área da alergia respiratória humana indica que na presença de um TCP negativo, um resultado positivo no TID acrescenta pouco ao diagnóstico (Oppenheimer & Nelson, 2006a; Calabria & Hagan, 2008).

**Tabela 15** - Valores preditivos dos TCP para diversos alergénios em pacientes humanos.

Ref.	Alergénios	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN
a	<i>Phleum pratense</i>	-	-	86%	-
b	Gato	79-97%	80-91%	79-93%	74-97%
c	Epitélio de rato	67%	94%	83%	86%
d	<i>Alternaria alternata</i>	98%	90%	94%	96%

Referências: a) Nelson et al. (1996); b) Wood et al. (1999); c) Sharma et al. (2008); d) Fernández et al. (2010). VPP – Valor preditivo positivo. VPN – Valor preditivo negativo. Nestes estudos foram aplicados diferentes critérios de positividade.

**Tabela 16** - Valores preditivos dos TID para diversos alérgenos em pacientes humanos.

Ref.	Alérgenos	Sensibilidade	Especificidade	VPP	VPN	Diluições*
a	<i>Phleum pratense</i>	-	-	33%	-	(1:100)
b	Gato	0-60%	31-32%	0-23%	77-92%	(1:100) e (1:10)
c	Epitélio de rato	100%	65%	56%	100%	(1:100)
		100%	35%	41%	100%	(1:10)
d	<i>Alternaria</i>	81%	31%	57%	60%	(1:100)
	<i>alternata</i>	80%	55%	68%	70%	(1:1000)
		66%	79%	79%	66%	(1:10000)

Referências: a) Nelson et al. (1996); b) Wood et al. (1999); c) Sharma et al. (2008); d) Fernández et al. (2010). VPP – Valor preditivo positivo. VPN – Valor preditivo negativo.

\*As diluições apresentadas foram efectuadas a partir das concentrações dos extractos alérgenos utilizados nos TCP, cuja avaliação estatística é aquela apresentada na Tabela 15.

Nestes estudos foram aplicados diferentes critérios de positividade.

Para a determinação dos valores de sensibilidade e de especificidade, tivemos como referência os resultados dos TID realizados nos mesmos cães, funcionando estes como auto-controlos. Contudo, embora o TID continue a ser o método de eleição para a determinação dos alérgenos relevantes no quadro clínico de um cão atópico (Hillier & DeBoer, 2001), não pode ser considerado um verdadeiro *gold standard*. A impossibilidade de comparar a eficiência dos TCP com testes de provocação, como é praticado em MH (Nelson et al., 1996; Wood et al., 1999; Sharma, Wood, Bravo & Matsui, 2008; Fernández et al., 2010), obriga--nos a comparar a técnica de picada com os já bem conhecidos TID, como aliás aconteceu no advento dos testes serológicos (Mueller, Burrows, & Tsohalis, 1999; Foster et al., 2003; Tarpataki et al, 2008).

Todavia, se os próprios TCP efectuados em pacientes humanos fossem comparados aos TID realizados nos mesmos indivíduos, os resultados não seriam tão brilhantes como aqueles apresentados nas Tabelas 15 e 16. Por exemplo, se a sensibilidade do TCP realizado com o extracto alérgico *Alternaria alternata* fosse determinada, considerando como padrão o TID com o mesmo alérgeno, não teríamos uma sensibilidade de 98% (Fernández et al., 2010), mas sim de 64,4%, valor este que não dista muito daquele encontrado no presente estudo. Já os valores de especificidade são difíceis de comparar mesmo recorrendo a este exercício, dado que em alergologia humana raramente se realizam TID após um resultado positivo no TCP, muito possivelmente porque, à partida, a técnica de picada é conhecida pela sua maior especificidade.

Efectivamente, em MV os testes de provocação não são utilizados na prática clínica (Reedy e tal., 1997), o que dificultaria a sua aplicação em pacientes atópicos do Hospital Escolar da FMV-UTL. No entanto, os trabalhos que têm vindo a ser desenvolvidos por Marsella e seus colaboradores, com colónias de Beagles experimentalmente sensibilizados, têm dado passos importantes nesta área (Marsella, Nicklin et al., 2006; Marsella, Olivry, et al., 2006; Marsella & Saridomichelakis, 2010). Confirmando-se que os resultados dos testes de provocação ambiental, nomeadamente por via epicutânea, se correlacionam bem com o diagnóstico de DAc para determinado alergénio, talvez estes possam vir a ser utilizados como ponto de referência para a verdadeira positividade na avaliação da sensibilidade e especificidade dos TCP em cães.

Adicionalmente, seria interessante confirmar a relevância clínica das reacções obtidas pela técnica de picada em cães. Para isso, bastaria comparar a resposta de animais com DAc à administração de ITAE, sendo esta baseada nos TCP ou nos TID, à semelhança daquilo que já foi desenvolvido com o objectivo de comparar o sucesso destes últimos com o dos testes serológicos (Schnabl et al., 2006).

Também o reduzido número de cães atópicos testado traz, obviamente, algumas limitações no que diz respeito às conclusões retiradas do presente estudo; a incidência de cães atópicos nas consultas de dermatologia do Hospital Escolar da FMV-UTL não nos permitiu, contudo, aumentar o tamanho da amostra durante o período de tempo previsto para a sua execução. Trabalhos mais prolongados, incluindo eventualmente cães atópicos provenientes de outras regiões geográficas, permitirão aplicar a técnica de picada a um maior número de pacientes e esclarecer as vantagens aqui referidas. A bateria de alergénios a usar nos TCP pode também vir a ser melhorada incluindo, por exemplo, extractos alergénicos de insectos, como a pulga que, embora tenha, nesta região, uma prevalência relativamente elevada de sensibilizações nos TID (Lourenço-Martins, 2010), não foi possível testar recorrendo à técnica de picada por indisponibilidade do respectivo extracto.

Seria igualmente interessante tentar estabelecer um valor de *cut-off* para cada alergénio ou grupo de alergénios como, aliás, se tem vindo a verificar em MH no que diz respeito a aeroalergénios e alergénios de origem alimentar (Bernstein et al., 2008).

## 5. CONCLUSÃO

No decorrer do presente trabalho, foi possível concluir que os TCP são seguros e perfeitamente executáveis em cães não sedados. A avaliação de parâmetros comportamentais e fisiológicos permitiu confirmar que esta técnica, para além de pouco dolorosa, não representa um factor de activação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, pelo que a validade das reacções cutâneas não se vê comprometida pela concentração sérica de cortisol. Os extractos alergénicos comercialmente disponíveis para uso em alergologia humana pela técnica de picada, que foram aplicados neste estudo, não são responsáveis por reacções irritantes em cães não atópicos, podendo, portanto, ser aplicados em animais com DAc.

A elevada especificidade desta nova técnica relativamente aos já bem conhecidos TID poderá vir a ser um dos grandes benefícios da sua introdução na área da alergologia veterinária. Embora os resultados da sua aplicação em cães atópicos possam vir a ser optimizados através do recurso a extractos alergénicos mais potentes, os TCP demonstraram ser uma boa ferramenta na determinação dos alergénios relevantes. Estudos adicionais deverão ser desenvolvidos de forma a padronizar quer os extractos alergénicos, quer a própria técnica, adaptando-a, assim, ao modelo canino.

## BIBLIOGRAFIA

---

- Ackerman, L. J. (1998). Canine allergic disorders. *Canine & feline dermatology. Diagnosis and treatment*. Trenton, New Jersey: Veterinary learning systems.
- Almarales, R. L. C., Valdés, S. I. P., León, M. G., Viltre, B. I. N., Castañeda, M. A., Toledo, C. I., Díaz, M. R., Gómez, I. G & Rosado, A. L.. (2005). Comparación de dos lancetas en la prueba cutánea por punción. *Revista alergia Mexico*, 52(5), 188–193.
- Antunes, J., Borrego, L., Romeira, A., & Pinto, P. (2009). Skin prick tests and allergy diagnosis. *Allergologia Et Immunopathologia*, 37(3), 155–164.
- Australasian Society of Clinical Immunology and Allergy (2009). *Skin prick testing for the diagnosis of allergic disease: a manual for practioners*. Acedido em Jan. 17, 2012, disponível em: <http://www.allergy.org.au/health-professionals/papers/skin-prick-testing>
- Ballauf, B. (1991). Vergleich von intrakutan- und pricktest in der allergiediagnostik beim hund. *Tierärztliche Praxis*, 19(4), 428–430.
- Bangert, C., Brunner, P. M., & Stingl, G. (2011). Immune functions of the skin. *Clinics in dermatology*, 29(4), 360–376.
- Barata, L.T. (1999). Perspectivas actuais na dermatite atópica: da imunopatologia à terapêutica. *Rev. Port. Imunoalergol.*, 7, 173-184.
- Bauer, C. L., Hensel, P., Austel, M., & Keys, D. (2010). Determination of irritant threshold concentrations to weeds, trees and grasses through serial dilutions in intradermal testing on healthy clinically nonallergic dogs. *Veterinary dermatology*, 21(2), 192–197.
- Becker, A. B., Chung, F., McDonald, D. M., Frick, O. L., & Gold, W. M. (1988). Cutaneous allergic response in atopic dogs: relationship of cellular and histamine responses. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 81(2), 441–448.
- Beerda, B., Schilder, M. B. ., van Hooff, J. A. R. A. ., de Vries, H. W., & Mol, J. A. (1998). Behavioural, saliva cortisol and heart rate responses to different types of stimuli in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 58(3-4), 365–381.
- Beerda, B., Schilder, M. B. H., van Hooff, J. A. R. A. M. & de Vries, H. W. (1997). Manifestations of chronic and acute stress in dogs. *Applied Animal Behaviour Science*, 52, 307-320.
- Beerda, B., Schilder, M. B., Janssen, N. S., & Mol, J. A. (1996). The use of saliva cortisol, urinary cortisol, and catecholamine measurements for a noninvasive assessment of stress responses in dogs. *Hormones and behavior*, 30(3), 272–279.
- Behrend, E. N., Kemppainen, R. J., & Young, D. W. (1998). Effect of storage conditions on cortisol, total thyroxine, and free thyroxine concentrations in serum and plasma of dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 212(10), 1564–1568.
- Behrend, E. N., Kemppainen, R. J., Bruyette, D. S., Busch, K. A., & Lee, H. P. (2006). Intramuscular administration of a low dose of ACTH for ACTH stimulation testing in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 229(4), 528–530.
- Bensignor, E., & Carlotti, D. N. (2002). Sensitivity patterns to house dust mites and forage mites in atopic dogs: 150 cases. *Veterinary dermatology*, 13(1), 37–42.

- Bernstein, D. I., Wanner, M., Borish, L., & Liss, G. M. (2004). Twelve-year survey of fatal reactions to allergen injections and skin testing: 1990-2001. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 113(6), 1129–1136.
- Bernstein, I. L., Li, J. T., Bernstein, D. I., Hamilton, R., Spector, S. L., Tan, R., Sicherer, S., Golden, D. B., Khan, D. A., Nicklas, R. A., Portnoy, J. M., Blessing-Moore, J., Cox, L., Lang, D. M., Oppenheimer, J., Randolph, C. C., Schuller D. E., Tilles, S. A., Wallace, D. V., Levetin, E., Weber, R., American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, American College of Allergy, Asthma and Immunology. (2008). Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 100(3 Suppl 3), S1–148.
- Bieber, T., & Novak, N. (2009). Pathogenesis of atopic dermatitis: new developments. *Current allergy and asthma reports*, 9(4), 291–294.
- Bizikova, P., Linder, K. E., Paps, J., & Olivry, T. (2010). Effect of a novel topical diester glucocorticoid spray on immediate- and late-phase cutaneous allergic reactions in Maltese-beagle atopic dogs: a placebo-controlled study. *Veterinary dermatology*, 21(1), 70–79.
- Boguniewicz, M., & Leung, D. Y. M. (2006). Atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 117(2 Suppl Mini-Primer), S475–480.
- Boguniewicz, M., & Leung, D. Y. M. (2010). Recent insights into atopic dermatitis and implications for management of infectious complications. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 125(1), 4–13
- Bond, R., Lamport, A. I., & Lloyd, D. H. (2000). Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. *Research in veterinary science*, 68(3), 291–293.
- Bonkobara, M., Miyake, F., Yagihara, H., Yamada, O., Azakami, D., Washizu, T., Cruz, P. D., Jr, et al. (2005). Canine epidermal langerhans cells express alpha and gamma but not beta chains of high-affinity IgE receptor. *Veterinary research communications*, 29(6), 499–505.
- Bousquet, J., Heinzerling, L., Bachert, C., Papadopoulos, N. G., Bousquet, P. J., Burney, P. G., Canonica, G. W., Haahtela, T., Lodrup Carlsen, K. C., Price, D., Samolinski, B., Simons, F. E., Wickman, M., Annesi-Maesano, I., Baena-Cagnani, C. E., Bergmann, K. C., Bindslev-Jensen, C., Casale, T. B., Chiriac, A., Cruz, A. A., Dubakiene, R., Durham, S. R., Fokkens, W. J., Gerth-van-Wijk, R., Kalayci, O., Kowalski, M. L., Mari, A., Mullol, J., Nazamova-Baranova L., O'Hehir, R. E., Ohta, K., Panzner, P., Passalacqua, G., Ring, J., Rogala, B., Romano, A., Ryan, D., Schmid-Grendelmeier, P., Todo-Bom, A., Valenta, R., Woehrl, S., Yusuf, O. M., Zuberbier, T., Demoly, P., GlobalAllergy and Asthma European Network, Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma. (2012). Practical guide to skin prick tests in allergy to aeroallergens. *Allergy*, 67(1), 18–24.
- Bousquet, J., Lockey, R., Malling, H. J., Alvarez-Cuesta, E., Canonica, G. W., Chapman, M. D., Creticos, P. J., Dayer, J. M., Duhram, S. R., Demoly, P., Goldstein, R. J., Ishikawa, T., Ito, K., Kraft, D., Lambert, P. H., Løwenstein, H., Müller, U., Norman, P. S., Reisman, R. E., Valenta, R., Valovirta, E. & Yssel, H. (1998). Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 81(5 Pt 1), 401–405.



- Brazis, P. (2011). O papel dos ácaros de armazenamento na dermatite atópica canina. *Veterinary Focus*, 21(3), 42–46.
- Brazis, P., Queralt, M., De Mora, F., Ferrer, L., & Puigdemont, A. (1998). Comparative study of histamine release from skin mast cells dispersed from atopic, ascaris-sensitive and healthy dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 66(1), 43–51.
- Broadman, L. M., Rice L. J. & Hannallah, R. S. (1988). Testing the validity of an objective pain scale for infants and children. *Anesthesiology*, 69(3A), A770.
- Calabria, C. W., & Hagan, L. (2008). The role of intradermal skin testing in inhalant allergy. *Annals of allergy, asthma & immunology: official publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 101(4), 337–347; quiz 347, 418.
- Carr, W. W., Martin, B., Howard, R. S., Cox, L., & Borish, L. (2005). Comparison of test devices for skin prick testing. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 116(2), 341–346.
- Castillo, V. A., Cabrera Blatter, M. F., Gómez, N. V., Sinatra, V., Gallelli, M. F., & Ghersevich, M. C. (2009). Diurnal ACTH and plasma cortisol variations in healthy dogs and in those with pituitary-dependent Cushing's syndrome before and after treatment with retinoic acid. *Research in veterinary science*, 86(2), 223–229.
- Chen, T.-A., Halliwell, R. E. W., Pemberton, A. D., & Hill, P. B. (2002). Identification of major allergens of *Malassezia pachydermatis* in dogs with atopic dermatitis and *Malassezia* overgrowth. *Veterinary dermatology*, 13(3), 141–150.
- Chervet, L., Galichet, A., McLean, W. H. I., Chen, H., Suter, M. M., Roosje, P. J., & Müller, E. J. (2010). Missing C-terminal filaggrin expression, NFkappaB activation and hyperproliferation identify the dog as a putative model to study epidermal dysfunction in atopic dermatitis. *Experimental dermatology*, 19(8), e343–346.
- Cork, M. J., Robinson, D. A., Vasilopoulos, Y., Ferguson, A., Moustafa, M., MacGowan, A., Duff, G. W., Ward, S. J., Tazi-Ahnini, R. (2006). New perspectives on epidermal barrier dysfunction in atopic dermatitis: gene-environment interactions. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 118(1), 3–21.
- Darsow, U., Vieluf, D., & Ring, J. (1999). Evaluating the relevance of aeroallergen sensitization in atopic eczema with the atopy patch test: a randomized, double-blind multicenter study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 40(2 Pt 1), 187–193.
- De Benedetto, A., Agnihotri, R., McGirt, L. Y., Bankova, L. G., & Beck, L. A. (2009). Atopic dermatitis: a disease caused by innate immune defects? *The Journal of investigative dermatology*, 129(1), 14–30.
- De Benedetto, A., Kubo, A., & Beck, L. A. (2012). Skin barrier disruption: a requirement for allergen sensitization? *The Journal of investigative dermatology*, 132(3 Pt 2), 949–963.
- De Benedetto, A., Rafaels, N. M., McGirt, L. Y., Ivanov, A. I., Georas, S. N., Cheadle, C., Berger, A. E., Zhang, K., Vidyasagar, S., Yoshida, T., Boguniewicz, M., Hata, T., Schneider, L. C., Hanifin, J. M., Gallo, R. L., Novak, N., Weidinger, S., Beaty, T. H., Leung, D. Y., Barnes, K. C., Beck, L. A. (2011). Tight junction defects in patients with atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 127(3), 773–786.e1–7.

- De Mora, F., García, G., Puigdemont, A., Arboix, M., & Ferrer, L. (1996). Skin mast cell releasability in dogs with atopic dermatitis. *Inflammation Research*, 45(8), 424–427.
- De Mora, F., Puigdemont, A., & Torres, R. (2006). The role of mast cells in atopy: what can we learn from canine models? A thorough review of the biology of mast cells in canine and human systems. *The British journal of dermatology*, 155(6), 1109–1123.
- De Weck, A. L., Mayer, P., Stumper, B., Schiessl, B., & Pickart, L. (1997). Dog allergy, a model for allergy genetics. *International archives of allergy and immunology*, 113(1-3), 55–57.
- DeBoer DJ, Verbrugge M, Morris M. (2010). Pilot trial of sublingual immunotherapy in mite-sensitive atopic dogs [abstract] [versão eletrónica]. *Proceedings, North American Veterinary Dermatology Forum, Portland, OR, April 2010*. Acedido em Jul. 19, 2012, disponível em: [http://www.heska.com/Documents/Allergy/Abstract\\_Pilot-trial-NAVDF-0512.aspx](http://www.heska.com/Documents/Allergy/Abstract_Pilot-trial-NAVDF-0512.aspx)
- DeBoer, D. J. (2004). Canine atopic dermatitis: new targets, new therapies. *The Journal of nutrition*, 134(8 Suppl), 2056S–2061S.
- DeBoer, D. J., & Hill, P. B. (1999). Serum immunoglobulin E concentrations in West Highland White Terrier puppies do not predict development of atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 10(4), 275–281.
- DeBoer, D. J., & Hillier, A. (2001a). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XV): fundamental concepts in clinical diagnosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 271–276.
- DeBoer, D. J., & Hillier, A. (2001b). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVI): laboratory evaluation of dogs with atopic dermatitis with serum-based “allergy” tests. *Veterinary immunology and immunopathology*, 81(3-4), 277–287.
- DeBoer, D. J., & Marsella, R. (2001). 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*, 81(3-4), 239–249.
- Devenney, I., & Fälth-Magnusson, K. (2001). Skin prick test in duplicate: is it necessary? *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 87(5), 386–389.
- Dokmeci, E., & Herrick, C. A. (2008). The immune system and atopic dermatitis. *Seminars in cutaneous medicine and surgery*, 27(2), 138–143.
- Dreborg, S. (2001). Histamine reactivity of the skin. *Allergy*, 56(5), 359–364.
- Dreschel, N. A., & Granger, D. A. (2009). Methods of collection for salivary cortisol measurement in dogs. *Hormones and behavior*, 55(1), 163–168.
- Duarte, F.C., Chambel, M., Serôdio, E., Pedro, A.P., Bordalo, I., Mendes, S., Carrilho, S., Marques, J., Martins, P. & Pinto, P.L. (2010). Testes cutâneos por picada – Avaliação de dor em idade pediátrica. *Rev Port Imunoalergologia*, 18(3), 215-226.
- Elias, P. M., & Feingold, K. R. (2001). Does the tail wag the dog? Role of the barrier in the pathogenesis of inflammatory dermatoses and therapeutic implications. *Archives of dermatology*, 137(8), 1079–1081.

- Elias, P. M., & Menon, G. K. (1991). Structural and lipid biochemical correlates of the epidermal permeability barrier. *Advances in lipid research*, 24, 1–26.
- Elias, P. M., & Schmuth, M. (2009). Abnormal skin barrier in the etiopathogenesis of atopic dermatitis. *Current allergy and asthma reports*, 9(4), 265–272.
- Elias, P. M., & Steinhoff, M. (2008). “Outside-to-inside” (and now back to “outside”) pathogenic mechanisms in atopic dermatitis. *The Journal of investigative dermatology*, 128(5), 1067–1070.
- Elias, P. M., Hatano, Y., & Williams, M. L. (2008). Basis for the barrier abnormality in atopic dermatitis: outside-inside-outside pathogenic mechanisms. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 121(6), 1337–1343.
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (2012). *Guideline 3: Control of Ectoparasites in Dogs and Cats*. Acedido em Jul. 7, 2012, disponível em: [http://www.esccap.org/uploads/file/ESCCAP%20Guidelines%20GL3%20Final%2029June2012\(2\).pdf](http://www.esccap.org/uploads/file/ESCCAP%20Guidelines%20GL3%20Final%2029June2012(2).pdf)
- Farmaki, R., Saridomichelakis, M. N., Leontides, L., Papazahariadou, M. G., Gioulekas, D., & Koutinas, A. F. (2010). Presence and density of domestic mites in the microenvironment of mite-sensitive dogs with atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 21(5), 469–476.
- Favrot, C., Steffan, J., Seewald, W., & Picco, F. (2010). A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary dermatology*, 21(1), 23–31.
- Feingold, K. R. (2007). Thematic review series: skin lipids. The role of epidermal lipids in cutaneous permeability barrier homeostasis. *Journal of lipid research*, 48(12), 2531–2546.
- Feldman, E. C., & Nelson, R. W. (2004). *Canine and feline endocrinology and reproduction* (3rd ed.). St.Louis, Missouri: Saunders.
- Fernández, C., Bevilacqua, E., Fernández, N., Gajate, P., de la Cámara, A. G., Garcimartín, M., Vives, R., et al. (2011). Asthma related to *Alternaria* sensitization: an analysis of skin-test and serum-specific IgE efficiency based on the bronchial provocation test. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 41(5), 649–656.
- Firth, A. M., & Haldane, S. L. (1999). Development of a scale to evaluate postoperative pain in dogs [abstract]. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 214(5), 651–659. Acedido em Mar. 7, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10088012>
- Fitzgerald, J. R. (2009). The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance. *Veterinary dermatology*, 20(5-6), 490–495.
- Foster, A. P., Littlewood, J. D., Webb, P., Wood, J. L. N., Rogers, K., & Shaw, S. E. (2003). Comparison of intradermal and serum testing for allergen-specific IgE using a Fcepsilon R1alpha-based assay in atopic dogs in the UK. *Veterinary immunology and immunopathology*, 93(1-2), 51–60.

- Fox, S. M., Mellor, D. J., Firth, E. C., Hodge, H., & Lawoko, C. R. (1994). Changes in plasma cortisol concentrations before, during and after analgesia, anaesthesia and anaesthesia plus ovariohysterectomy in bitches [abstract]. *Research in veterinary science*, 57(1), 110–118. Acedido em: Abr. 24, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7973084>
- Fox, S. M., Mellor, D. J., Lawoko, C. R., Hodge, H., & Firth, E. C. (1998). Changes in plasma cortisol concentrations in bitches in response to different combinations of halothane and butorphanol, with or without ovariohysterectomy. *Research in veterinary science*, 65(2), 125–133.
- Frank, L. A., Kunkle, G. A., & Beale, K. M. (1992). Comparison of serum cortisol concentration before and after intradermal testing in sedated and nonsedated dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200(4), 507–510.
- Frick, O. L., & Brooks, D. L. (1983). Immunoglobulin E antibodies to pollens augmented in dogs by virus vaccines [abstract]. *American journal of veterinary research*, 44(3), 440–445. Acedido em Mar. 2, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6301317>
- Fujimura, M., Nakatsuji, Y., Fujiwara, S., Rème, C., & Gatto, H. (2011). Spot-On Skin Lipid Complex as an Adjunct Therapy in Dogs with Atopic Dermatitis: An Open Pilot Study. *Veterinary Medicine International*, 2011, 1–5.
- Gläser, R., Meyer-Hoffert, U., Harder, J., Cordes, J., Wittersheim, M., Kobliakova, J., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J. M., Schwarz, T. (2009). The antimicrobial protein psoriasin (S100A7) is upregulated in atopic dermatitis and after experimental skin barrier disruption. *The Journal of investigative dermatology*, 129(3), 641–649.
- Goldman, C., Rosser, E., Jr, Petersen, A., & Hauptman, J. (2010). Investigation on the effects of ciclosporin (Atopica) on intradermal test reactivity and allergen-specific immunoglobulin (IgE) serology in atopic dogs. *Veterinary dermatology*, 21(4), 393–399.
- Gordon, B. R. (1998). Allergy skin tests for inhalants and foods. Comparison of methods in common use. *Otolaryngologic clinics of North America*, 31(1), 35–53.
- Graham, L. F., Torres, S. M. F., Jessen, C. R., Horne, K. L., & Hendrix, P. K. (2003). Effects of propofol-induced sedation on intradermal test reactions in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*, 14(3), 167–176.
- Griffin, C.E. (2008). Atopic disease, clinical signs and the diagnostic challenge. *Journal of Small Animal Dermatology for Practitioners*, 1(1), 8-15.
- Griffin, C. E., & DeBoer, D. J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIV): clinical manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 255–269.
- Griffin, C. E., & Hillier, A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIV): allergen-specific immunotherapy. *Veterinary immunology and immunopathology*, 81(3-4), 363–383.
- Halliwell, R. (2006). Revised nomenclature for veterinary allergy. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 114(3-4), 207–208.

- Halliwell, R. E., & DeBoer, D. J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (III): the role of antibodies in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 159–167.
- Halliwell, R. E., Schwartzman, R. M., & Rockey, J. H. (1972). Antigenic relationship between human IgE and canine IgE. *Clinical and Experimental Immunology*, 10(3), 399–407.
- Hanifin, J. M., & Rajka, G. (1980). Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta dermato-venereologica. Supplementum*, 92, 44–47.
- Hansen, B. D. (2003). Assessment of pain in dogs: veterinary clinical studies. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources*, 44(3), 197–205.
- Harder, J., Dressel, S., Wittersheim, M., Cordes, J., Meyer-Hoffert, U., Mrowietz, U., Fölster-Holst, R., Proksch, E., Schröder, J. M., Schwarz, T., Gläser, R. (2010). Enhanced expression and secretion of antimicrobial peptides in atopic dermatitis and after superficial skin injury. *The Journal of investigative dermatology*, 130(5), 1355–1364.
- Haubenhofer, D. K., & Kirchengast, S. (2006). Physiological arousal for companion dogs working with their owners in animal-assisted activities and animal-assisted therapy. *Journal of applied animal welfare science: JAAWS*, 9(2), 165–172.
- Haverbeke, A., Diederich, C., Depiereux, E., & Giffroy, J. M. (2008). Cortisol and behavioral responses of working dogs to environmental challenges. *Physiology & behavior*, 93(1-2), 59–67.
- Hellyer, P. W., Uhrig, S. R. & Robinson, N. G. (2006). Canine Acute Pain Scale [abstract]. Colorado State University Veterinary Medical Center. Acedido em Mar. 7, 2012, disponível em: [http://www.ivapm.org/attachments/097\\_CSU%20Acute%20Pain%20Scale%20-%20Canine%20v.2.pdf](http://www.ivapm.org/attachments/097_CSU%20Acute%20Pain%20Scale%20-%20Canine%20v.2.pdf)
- Hellyer, P., Rodan, I., Brunt, J., Downing, R., Hagedorn, J. E., & Robertson, S. A. (2007). AAHA/AAFP pain management guidelines for dogs and cats. *Journal of feline medicine and surgery*, 9(6), 466–480.
- Hennessy, M. B., Davis, H. N., Williams, M. T., Mellott, C., & Douglas, C. W. (1997). Plasma cortisol levels of dogs at a county animal shelter. *Physiology & behavior*, 62(3), 485–490.
- Hennessy, M. B., Heybach, J. P., Vernikos, J., & Levine, S. (1979). Plasma corticosterone concentrations sensitively reflect levels of stimulus intensity in the rat. *Physiology & Behavior*, 22(5), 821–825.
- Hennessy, M. B., T. Williams, M., Miller, D. D., Douglas, C. W., & Voith, V. L. (1998). Influence of male and female petters on plasma cortisol and behaviour: can human interaction reduce the stress of dogs in a public animal shelter? *Applied Animal Behaviour Science*, 61(1), 63–77.
- Hennessy, M. B., Voith, V. L., Mazzei, S. J., Buttram, J., Miller, D. D., & Linden, F. (2001). Behavior and cortisol levels of dogs in a public animal shelter, and an exploration of the ability of these measures to predict problem behavior after adoption. *Applied animal behaviour science*, 73(3), 217–233.

- Hennessy, M. B., Voith, V. L., Young, T. L., Hawke, J. L., Centrone, J., McDowell, A. L., Linden, F., et al. (2002). Exploring human interaction and diet effects on the behavior of dogs in a public animal shelter. *Journal of applied animal welfare science: JAAWS*, 5(4), 253–273.
- Hill, P. B., & DeBoer, D. J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (IV): environmental allergens. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 169–186.
- Hill, P. B., & Olivry, T. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (V): biology and role of inflammatory cells in cutaneous allergic reactions. *Veterinary immunology and immunopathology*, 81(3-4), 187–198.
- Hill, P. B., Hillier, A., & Olivry, T. (2001). 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 immunopathology*, 81(3-4), 199–204.
- Hill, P. B., Moriello, K. A., & DeBoer, D. J. (1995). Concentrations of total serum IgE, IgA, and IgG in atopic and parasitized dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 44(2), 105–113.
- Hillier, A. (2002a). Allergy testing and treatment for canine atopic dermatitis. *Veterinary Medicine*, 210–224. Acedido em Mai. 17, 2012, disponível em: [http://www.rottweilerhealth.org/pdfs/march\\_allergy\\_hiller\\_02.pdf](http://www.rottweilerhealth.org/pdfs/march_allergy_hiller_02.pdf)
- Hillier, A. (2002b). Definitively diagnosing atopic dermatitis in dogs. *Veterinary Medicine*, 198–209. Acedido em Mai. 17, 2012, disponível em: [http://rottweilerhealth.org/pdfs/march\\_derm\\_hiller\\_02.pdf](http://rottweilerhealth.org/pdfs/march_derm_hiller_02.pdf)
- Hillier, A., & DeBoer, D. J. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. *Veterinary immunology and immunopathology*, 81(3-4), 289–304.
- Hillier, A., & Griffin, C. E. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 147–151.
- Hillier, A., Cole, L. K., Kwochka, K. W., & McCall, C. (2002). Late-phase reactions to intradermal testing with *Dermatophagoides farinae* in healthy dogs and dogs with house dust mite-induced atopic dermatitis. *American journal of veterinary research*, 63(1), 69–73.
- Hillier, A., Kwochka, K. W., & Pinchbeck, L. R. (2000). Reactivity to intradermal injection of extracts of *Dermatophagoides farinae*, *Dermatophagoides pteronyssinus*, house dust mite mix, and house dust in dogs suspected to have atopic dermatitis: 115 cases (1996-1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 217(4), 536–540.
- Holt, P. G. (2000). Parasites, atopy, and the hygiene hypothesis: resolution of a paradox? *Lancet*, 356(9243), 1699–1701.
- Holton, L., Reid, J., Scott, E. M., Pawson, P., & Nolan, A. (2001). Development of a behaviour-based scale to measure acute pain in dogs [abstract]. *The Veterinary record*, 148(17), 525–531. Acedido em Mar. 7, 2012, disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11354645>

- Høst, A., & Halcken, S. (2003). Practical aspects of allergy-testing. *Paediatric Respiratory Reviews*, 4(4), 312–318.
- Hou, C. C., Nuttall, T. J., Day, M. J., & Hill, P. B. (2004). *Dermatophagoides farinae*-specific IgG subclass responses in atopic dogs undergoing allergen-specific immunotherapy. *Veterinary Dermatology*, 15(s1), 5–5.
- Hou, C.-C., Griffin, C. E., & Hill, P. B. (2008). *Dermatophagoides farinae*-specific IgG responses in atopic dogs undergoing allergen-specific immunotherapy with aqueous vaccines. *Veterinary dermatology*, 19(4), 215–220.
- Howell, M. D., Kim, B. E., Gao, P., Grant, A. V., Boguniewicz, M., De Benedetto, A., Schneider, L., Beck, L. A., Barnes, K. C., Leung, D. Y. (2007). Cytokine modulation of atopic dermatitis filaggrin skin expression. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 120(1), 150–155.
- Inman, A. O., Olivry, T., Dunston, S. M., Monteiro-Riviere, N. A., & Gatto, H. (2001). Electron microscopic observations of stratum corneum intercellular lipids in normal and atopic dogs. *Veterinary Pathology*, 38(6), 720–723.
- Jackson, H. A., Miller, H. R., & Halliwell, R. E. (1996). Canine leucocyte histamine release: response to antigen and to anti-IgE. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 53(3-4), 195–206.
- Jaeger, K., Linek, M., Power, H. T., Bettenay, S. V., Zabel, S., Rosychuk, R. A. W., & Mueller, R. S. (2010). Breed and site predispositions of dogs with atopic dermatitis: a comparison of five locations in three continents. *Veterinary dermatology*, 21(1), 118–122.
- Kadoya-Minegishi, M., Park, S. J., Sekiguchi, M., Nishifuji, K., Momoi, Y., & Iwasaki, T. (2002). The use of fluorescein as a contrast medium to enhance intradermal skin tests in cats. *Australian veterinary journal*, 80(11), 702–703.
- Kempainen, R. J., & Sartin, J. L. (1984). Evidence for episodic but not circadian activity in plasma concentrations of adrenocorticotrophin, cortisol and thyroxine in dogs. *The Journal of endocrinology*, 103(2), 219–226.
- Keppel, K. E., Campbell, K. L., Zuckermann, F. A., Greeley, E. A., Schaeffer, D. J., & Husmann, R. J. (2008). Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. *Veterinary immunology and immunopathology*, 123(3-4), 337–344.
- King, M. J., & Lockey, R. F. (2003). Allergen prick-puncture skin testing in the elderly. *Drugs & aging*, 20(14), 1011–1017.
- Kirschbaum, C., & Hellhammer, D. H. (1989). Salivary cortisol in psychobiological research: an overview. *Neuropsychobiology*, 22(3), 150–169.
- Knol, B. W., Dieleman, S. J., Bevers, M. M., van den Brom, W. E., & Molt, J. A. (1992). Effects of methods used for blood collection on plasma concentrations of luteinising hormone, testosterone, and cortisol in male dogs. *The Veterinary quarterly*, 14(4), 126–129.
- Kolevská, J., Brunclík, V. & Svoboda, M. (2003). Circadian rhythm of cortisol secretion in dogs of different daily activities. *Acta Vet. Brno*, 72, 599.

- Konstantinou, G. N., Bousquet, P.-J., Zuberbier, T., & Papadopoulos, N. G. (2010). The longest wheal diameter is the optimal measurement for the evaluation of skin prick tests. *International archives of allergy and immunology*, 151(4), 343–345.
- Kubo, A., Nagao, K., & Amagai, M. (2012). Epidermal barrier dysfunction and cutaneous sensitization in atopic diseases. *The Journal of clinical investigation*, 122(2), 440–447.
- Lamminen, H., & Voipio, V. (2008). Computer-aided skin prick test. *Experimental dermatology*, 17(11), 975–976.
- Landis, J. R., & Koch, G. G. (1977). The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*, 33(1), 159–174.
- Langeveld-Wildschut, E. G., Thepen, T., Bihari, I. C., van Reijssen, F. C., de Vries, I. J., Bruijnzeel, P. L., & Bruijnzeel-Koomen, C. A. (1996). Evaluation of the atopy patch test and the cutaneous late-phase reaction as relevant models for the study of allergic inflammation in patients with atopic eczema. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 98(6 Pt 1), 1019–1027.
- Lebis, C., Bourdeau, P., & Marzin-Keller, F. (2002). Intradermal skin tests in equine dermatology: a study of 83 horses. *Equine veterinary journal*, 34(7), 666–671.
- Lee, K. W., Blankenship, K. D., McCurry, Z. M., Esch, R. E., DeBoer, D. J., & Marsella, R. (2009). Performance characteristics of a monoclonal antibody cocktail-based ELISA for detection of allergen-specific IgE in dogs and comparison with a high affinity IgE receptor-based ELISA. *Veterinary dermatology*, 20(3), 157–164.
- Leung, D. Y. (1999). Pathogenesis of atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 104(3 Pt 2), S99–108.
- Leung, D. Y. (2000). Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 105(5), 860–876.
- Leung, D. Y. M., & Bieber, T. (2003). Atopic dermatitis. *Lancet*, 361(9352), 151–160.
- Leung, D. Y. M., Boguniewicz, M., Howell, M. D., Nomura, I., & Hamid, Q. A. (2004). New insights into atopic dermatitis. *The Journal of clinical investigation*, 113(5), 651–657.
- Lewis, T. & Grant, R. T. (1924). Vascular reactions of the skin to injury. *Heart*, 13, 219-215.
- Lian, T. M., & Halliwell, R. E. (1998). Allergen-specific IgE and IgGd antibodies in atopic and normal dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 66(3-4), 203–223.
- Liccardi, G., D’Amato, G., Canonica, G. W., Salzillo, A., Piccolo, A., & Passalacqua, G. (2006). Systemic reactions from skin testing: literature review. *Journal of investigational allergology & clinical immunology: official organ of the International Association of Asthmology (INTERASMA) and Sociedad Latinoamericana de Alergia e Inmunología*, 16(2), 75–78.
- Lipozenčić, J., & Wolf, R. (2010). The diagnostic value of atopy patch testing and prick testing in atopic dermatitis: facts and controversies. *Clinics in dermatology*, 28(1), 38–44.
- Loewenstein, C., & Mueller, R. S. (2009). A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. *Veterinary dermatology*, 20(2), 84–98.
- Loser, K., & Beissert, S. (2012). Regulatory T cells: banned cells for decades. *The Journal of investigative dermatology*, 132(3 Pt 2), 864–871.



- Lourenço-Martins, A. M., Delgado, E., Neto, I., Peleteiro, M. C., Morais-Almeida, M., & Correia, J. H. D. (2011). Allergic conjunctivitis and conjunctival provocation tests in atopic dogs. *Veterinary ophthalmology*, 14(4), 248–256.
- Lourenço-Martins, A.M. (2010). *Contribuição para o estudo da dermatite atópica canina na área metropolitana de Lisboa*. Tese de Doutoramento em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Lourenço-Martins, A.M., Peleteiro, M.C., Correia, J.H.D. & Morais-Almeida, M. (2010). Será o cão o melhor amigo de um atópico? – Considerações sobre o potencial dos modelos caninos para o estudo da dermatite atópica no homem. *Rev Port Imunoalergologia*, 18(5), 405-418.
- Lund, E. (2011). Epidemiologia da dermatite atópica canina. *Veterinary Focus*, 21(3), 32–33.
- Madison, K. C. (2003). Barrier function of the skin: “la raison d’être” of the epidermis. *The Journal of investigative dermatology*, 121(2), 231–241.
- Maeda, S., Fujiwara, S., Omori, K., Kawano, K., Kurata, K., Masuda, K., Ohno, K.(2002). Lesional expression of thymus and activation-regulated chemokine in canine atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 88(1-2), 79–87.
- Maeda, S., Tsuchida, H., & Marsella, R. (2007). Allergen challenge decreases mRNA expression of regulatory cytokines in whole blood of high-IgE beagles. *Veterinary dermatology*, 18(6), 422–426.
- Mahé, E., Soussan, V., & Sigal, M.-L. (2011). Prise en charge de la douleur de l'enfant en dermatologie. *Annales de dermatologie et de vénéréologie*, 138(4), 357–361.
- Malling, H. J. (1984). Skin prick testing and the use of histamine references. *Allergy*, 39(8), 596–601.
- Marcovich, R., Williams, A. L., Seifman, B. D., & Wolf, J. S., Jr. (2001). A canine model to assess the biochemical stress response to laparoscopic and open surgery. *Journal of endourology / Endourological Society*, 15(10), 1005–1008.
- Marsella, R. (2001). Update on the role of leukotrienes in the pathogenesis of atopy: a comparative review. *Veterinary dermatology*, 12(2), 63–74.
- Marsella, R. (2009). Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG for the prevention of atopic dermatitis in dogs. *American journal of veterinary research*, 70(6), 735–740.
- Marsella, R. (2010). Tolerability and clinical efficacy of oral immunotherapy with house dust mites in a model of canine atopic dermatitis: a pilot study. *Veterinary dermatology*, 21(6), 566–571.
- Marsella, R., & Girolomoni, G. (2009). Canine models of atopic dermatitis: a useful tool with untapped potential. *The Journal of investigative dermatology*, 129(10), 2351–2357.
- Marsella, R., & Nicklin, C. F. (2001). Sulphido-leukotriene production from peripheral leukocytes and skin in clinically normal dogs and house dust mite positive atopic dogs. *Veterinary dermatology*, 12(1), 3–12.
- Marsella, R., & Olivry, T. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (VII): mediators of cutaneous inflammation. *Veterinary immunology and immunopathology*, 81(3-4), 205–213.

- Marsella, R., & Olivry, T. (2003). Animal models of atopic dermatitis. *Clinics in Dermatology*, 21(2), 122–133.
- Marsella, R., & Samuelson, D. (2009). Unravelling the skin barrier: a new paradigm for atopic dermatitis and house dust mites. *Veterinary Dermatology*, 20(5-6), 533–540.
- Marsella, R., & Saridomichelakis, M. N. (2010). Environmental and oral challenge with storage mites in beagles experimentally sensitized to *Dermatophagoides farinae*. *Veterinary dermatology*, 21(1), 105–111.
- Marsella, R., & Sousa, C. A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIII): threshold phenomenon and summation of effects. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 251–254.
- Marsella, R., Nicklin, C., & Lopez, J. (2005). Atopy patch test reactions in high-IgE beagles to different sources and concentrations of house dust mites. *Veterinary dermatology*, 16(5), 308–314.
- Marsella, R., Nicklin, C., & Lopez, J. (2006). Studies on the role of routes of allergen exposure in high IgE-producing beagle dogs sensitized to house dust mites. *Veterinary dermatology*, 17(5), 306–312.
- Marsella, R., Olivry, T., Nicklin, C., & Lopez, J. (2006). Pilot investigation of a model for canine atopic dermatitis: environmental house dust mite challenge of high-IgE-producing beagles, mite hypersensitive dogs with atopic dermatitis and normal dogs. *Veterinary dermatology*, 17(1), 24–35.
- Marsella, R., Samuelson, D., & Doerr, K. (2010). Transmission electron microscopy studies in an experimental model of canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*, 21(1), 81–88.
- Marsella, R., Samuelson, D., & Harrington, L. (2009). Immunohistochemical evaluation of filaggrin polyclonal antibody in atopic and normal beagles. *Veterinary dermatology*, 20(5-6), 547–554.
- Marsella, R., Santoro, D., & Ahrens, K. (2012). Early exposure to probiotics in a canine model of atopic dermatitis has long-term clinical and immunological effects. *Veterinary immunology and immunopathology*, 146(2), 185–189.
- Martin, D. D., & Martin, A. L. (2006). Pain management and anesthesia in veterinary dermatology. *The Veterinary clinics of North America. Small animal practice*, 36(1), 1–14, v.
- Masse, M. S., Granger Vallée, A., Chiriac, A., Dhivert-Donnadieu, H., Bousquet-Rouanet, L., Bousquet, P.-J., & Demoly, P. (2011). Comparison of five techniques of skin prick tests used routinely in Europe. *Allergy*, 66(11), 1415–1419.
- McCall, C., Hunter, S., Stedman, K., Weber, E., Hillier, A., Bozic, C., Rivoire, B., et al. (2001). Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 78(3-4), 231–247.
- McEwan, N. A. (2000). Adherence by *Staphylococcus intermedius* to canine keratinocytes in atopic dermatitis. *Research in Veterinary Science*, 68(3), 279–283.

- Morales, C. A., Schultz, K. T., & DeBoer, D. J. (1994). Antistaphylococcal antibodies in dogs with recurrent staphylococcal pyoderma. *Veterinary immunology and immunopathology*, 42(2), 137–147.
- Morris, D. O., Clayton, D. J., Drobatz, K. J., & Felsburg, P. J. (2002). Response to *Malassezia pachydermatis* by peripheral blood mononuclear cells from clinically normal and atopic dogs. *American journal of veterinary research*, 63(3), 358–362.
- Morris, M. & DeBoer, D. J. (2012). Sublingual immunotherapy for pets: a guide for veterinary dermatologists. Acedido em Jul. 19, 2012, disponível em: <http://www.heska.com/Documents/Allergy/White-Paper,-Sublingual-Immunotherapy-for-Dogs.pdf>
- Mueller, R. S., Burrows, A., & Tsohalis, J. (1999). Comparison of intradermal testing and serum testing for allergen-specific IgE using monoclonal IgE antibodies in 84 atopic dogs. *Australian veterinary journal*, 77(5), 290–294.
- Mullin, J., Carter, S., Williams, N., McEwan, N., & Nuttall, T. (2012). Transcription of canine toll-like receptor 2,  $\beta$ -defensin 1 and  $\beta$ -defensin 103 in infected atopic skin, non-infected atopic skin, healthy skin and the CPEK cell line. *Veterinary microbiology*.
- Nagata, M. (2000). Diagnosis of atopic dermatitis in dogs. *WALTHAM Focus*, 10(2), 4-9.
- Nardoni, S., Dini, M., Taccini, F., & Mancianti, F. (2007). Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. *Veterinary microbiology*, 122(1-2), 172–177.
- Negre, A., Bensignor, E., & Guillot, J. (2009). Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of interventions for *Malassezia* dermatitis in dogs. *Veterinary dermatology*, 20(1), 1–12.
- Nelson, H. S., Knoetzer, J., & Bucher, B. (1996). Effect of distance between sites and region of the body on results of skin prick tests. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 97(2), 596–601.
- Nelson, H. S., Lahr, J., Buchmeier, A., & McCormick, D. (1998). Evaluation of devices for skin prick testing. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 101(2 Pt 1), 153–156.
- Nelson, H. S., Oppenheimer, J., Buchmeier, A., Kordash, T. R., & Freshwater, L. L. (1996). An assessment of the role of intradermal skin testing in the diagnosis of clinically relevant allergy to timothy grass. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 97(6), 1193–1201.
- Nelson, H. S., Rosloniec, D. M., McCall, L. I., & Iklé, D. (1993). Comparative performance of five commercial prick skin test devices. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 92(5), 750–756.
- Nødtvedt, A., Egenvall, A., Bergvall, K., & Hedhammar, A. (2006). Incidence of and risk factors for atopic dermatitis in a Swedish population of insured dogs. *The Veterinary record*, 159(8), 241–246.
- Noli, C., & Morris, D. O. (2012). Staphylococcal pyoderma. In H. Jackson & R. Marsella (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Dermatology* (3th ed.) (pp. 173–187). England: British Small Animal Veterinary Association.

- Noli, C., Bernadina, W. E., & Willemse, T. (1996). The significance of reactions to purified fractions of *Dermatophagoides pteronyssinus* and *Dermatophagoides farinae* in canine atopic dermatitis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 52(3), 147–157.
- Nosbaum, A., Hennino, A., Berard, F., & Nicolas, J.-F. (2010). Patch testing in atopic dermatitis patients. *European journal of dermatology: EJD*, 20(5), 563–566.
- Novak, N., & Bieber, T. (2003). Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 112(2), 252–262.
- Novak, N., Bieber, T., & Leung, D. Y. M. (2003). Immune mechanisms leading to atopic dermatitis. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 112(6 Suppl), S128–139.
- Nuttall, T. (2008). Management of atopic dermatitis. *Veterinary Focus*, 18(1), 32–39.
- Nuttall, T. (2012). *Malassezia* dermatitis. In H. Jackson & R. Marsella (Eds.), *BSAVA Manual of Canine and Feline Dermatology* (3th ed.) (pp. 198–205). England: British Small Animal Veterinary Association.
- Nuttall, T. J., & Halliwell, R. E. (2001). Serum antibodies to *Malassezia* yeasts in canine atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*, 12(6), 327–332.
- Nuttall, T. J., Hill, P. B., Bensignor, E., & Willemse, T. (2006). House dust and forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 17(4), 223–235.
- Nuttall, T. J., Knight, P. A., McAleese, S. M., Lamb, J. R., & Hill, P. B. (2002). T-helper 1, T-helper 2 and immunosuppressive cytokines in canine atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 87(3-4), 379–384.
- Ogg, G. (2009). Role of T cells in the pathogenesis of atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 39(3), 310–316.
- Ohnishi, H., Miyahara, N., & Gelfand, E. W. (2008). The role of leukotriene B(4) in allergic diseases. *Allergology international: official journal of the Japanese Society of Allergology*, 57(4), 291–298.
- Oiso, N. (2010). Regulatory T cells in atopic dermatitis. *Recent patents on inflammation & allergy drug discovery*, 4(3), 244–248.
- Olivry, T. (2010). New diagnostic criteria for canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 21(1), 123–126.
- Olivry, T., & Hill, P. B. (2001). 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*, 81(3-4), 219–225.
- Olivry, T., & Sousa, C. A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XIX): general principles of therapy. *Veterinary immunology and immunopathology*, 81(3-4), 311–316.
- Olivry, T., Dean, G. A., Tompkins, M. B., Dow, J. L., & Moore, P. F. (1999). Toward a canine model of atopic dermatitis: amplification of cytokine-gene transcripts in the skin of atopic dogs. *Experimental dermatology*, 8(3), 204–211.

- Olivry, T., Deangelo, K. B., Dunston, S. M., Clarke, K. B., & McCall, C. A. (2006). Patch testing of experimentally sensitized beagle dogs: development of a model for skin lesions of atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*, 17(2), 95–102.
- Olivry, T., DeBoer, D. J., Favrot, C., Jackson, H. A., Mueller, R. S., Nuttall, T., & Prélaud, P. (2010). Tratamento da dermatite atópica canina: guidelines de 2010 para a prática clínica do Grupo de Trabalho Internacional dedicado ao estudo da Dermatite Atópica Canina (International Task Force on Canine Atopic Dermatitis). *Veterinary dermatology*, 21(3), 233–248.
- Olivry, T., DeBoer, D. J., Griffin, C. E., Halliwell, R. E., Hill, P. B., Hillier, A., Marsella, R., Sousa, C. A. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 143–146.
- Olivry, T., Deboer, D. J., Prélaud, P., & Bensignor, E. (2007). Food for thought: pondering the relationship between canine atopic dermatitis and cutaneous adverse food reactions. *Veterinary dermatology*, 18(6), 390–391.
- Olivry, T., Dunston, S. M., Murphy, K. M., & Moore, P. F. (2001). Characterization of the inflammatory infiltrate during IgE-mediated late phase reactions in the skin of normal and atopic dogs. *Veterinary dermatology*, 12(1), 49–58.
- Olivry, T., Dunston, S. M., Pluchino, K., Porter, K., & Hammerberg, B. (2008). Lack of detection of circulating skin-specific IgE autoantibodies in dogs with moderate or severe atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology*, 122(1-2), 182–187.
- Olivry, T., Foster, A. P., Mueller, R. S., McEwan, N. A., Chesney, C., & Williams, H. C. (2010). Interventions for atopic dermatitis in dogs: a systematic review of randomized controlled trials. *Veterinary dermatology*, 21(1), 4–22.
- Olivry, T., Marsella, R., Iwasaki, T., & Mueller, R. (2007). Validation of CADESI-03, a severity scale for clinical trials enrolling dogs with atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*, 18(2), 78–86.
- Olivry, T., Moore, P. F., Affolter, V. K., & Naydan, D. K. (1996). Langerhans cell hyperplasia and IgE expression in canine atopic dermatitis. *Archives of Dermatological Research*, 288(10), 579–585.
- Olivry, T., Naydan, D. K., & Moore, P. F. (1997). Characterization of the cutaneous inflammatory infiltrate in canine atopic dermatitis [Abstract]. *The American Journal of dermatopathology*, 19(5), 477–486.
- Oppenheimer, Durham & Nelson (2007). *World Allergy Organization: Allergy diagnostic testing*. Acedido em Mar. 19, 2012, disponível em: [http://www.worldallergy.org/professional/allergic\\_diseases\\_center/allergy\\_diagnostic/](http://www.worldallergy.org/professional/allergic_diseases_center/allergy_diagnostic/)
- Oppenheimer, J., & Nelson, H. S. (2006a). Skin testing. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 96(2 Suppl 1), S6–12.
- Oppenheimer, J., & Nelson, H. S. (2006b). Skin testing: a survey of allergists. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the American College of Allergy, Asthma, & Immunology*, 96(1), 19–23.

- Palmer, C. N. A., Irvine, A. D., Terron-Kwiatkowski, A., Zhao, Y., Liao, H., Lee, S. P., Goudie, D. R., Campbell, L. E., Smith, F. J., O'Regan, G. M., Watson, R. M., Cecil, J. E., Bale, S. J., Compton, J. G., DiGiovanna, J. J., Fleckman, P., Lewis-Jones, S., Arseculeratne, G., Sergeant, A., Munro, C. S., El Houate, B., McElreavey, K., Halkjaer, L. B., Bisgaard, H., Mukhopadhyay, S., McLean, W. H. (2006). Common loss-of-function variants of the epidermal barrier protein filaggrin are a major predisposing factor for atopic dermatitis. *Nature genetics*, 38(4), 441–446.
- Pepys, J. (1975). Skin testing. *Br J Hosp Med*, 14, 416–412.
- Pessina, P., Fernández-Foren, A., Cueto, E., Delucchi, L., Castillo, V., & Meikle, A. (2009). Cortisol secretion after adrenocorticotrophin (ACTH) and dexamethasone tests in healthy female and male dogs. *Acta veterinaria Scandinavica*, 51, 33.
- Piette, V., Bourret, E., Bousquet, J., & Demoly, P. (2002). Prick tests to aeroallergens: is it possible simply to wipe the device between tests? *Allergy*, 57(10), 940–942.
- Popa, I., Remoue, N., Hoang, L. T., Pin, D., Gatto, H., Haftek, M., & Portoukalian, J. (2011). Atopic dermatitis in dogs is associated with a high heterogeneity in the distribution of protein-bound lipids within the stratum corneum. *Archives of dermatological research*, 303(6), 433–440.
- Prélaud, P., Guaguère, E., Alhaidari, Z., Faivre, N., Héripret, D. & Gayerie, A. (1998). Réévaluation des critères de diagnostic de la dermatite atopique. *Revue de Médecine Vétérinaire*, 149, 1057-1064.
- Proksch, E., Brandner, J. M., & Jensen, J.-M. (2008). The skin: an indispensable barrier. *Experimental dermatology*, 17(12), 1063–1072.
- Pucheu-Haston, C. M., Jackson, H. A., Olivry, T., Dunston, S. M., & Hammerberg, B. (2008). Epicutaneous sensitization with *Dermatophagoides farinae* induces generalized allergic dermatitis and elevated mite-specific immunoglobulin E levels in a canine model of atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 38(4), 667–679.
- Racine, B. P., Marti, E., Busato, A., Weilenmann, R., Lazary, S., & Griot-Wenk, M. E. (1999). Influence of sex and age on serum total immunoglobulin E concentration in Beagles. *American journal of veterinary research*, 60(1), 93–97.
- Randall, A. J., Hillier, A., Cole, L. K., Kwochka, K. W., Needham, G., & Wassom, D. L. (2005). Quantitation of house dust mite allergens (*Der f 1* and group 2) on the skin and hair of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 66(1), 143–149.
- Randall, A., Hillier, A., Cole, L. K., Kwochka, K. W., Needham, G., & Wassom, D. L. (2003). Quantitation of house dust mites and house dust mite allergens in the microenvironment of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 64(12), 1580–1588.
- Reedy, L., Miller, W., & Willemsse, T. (1997). *Allergic skin diseases of dogs and cats* (2nd ed.). London: Saunders company Ltd.
- Reid, J., Nolan, A. M., Hughes, J. M. L., Lascelles, D., Pawson, P. & Scott, E. M. (2007). Development of the short-form Glasgow Composite Measure Pain Scale (CMPS-SF) and derivation of an analgesic intervention score [abstract]. *Animal Welfare*, 16 (Suppl 1), 97-104(8). Acedido em: Mar. 7, 2012, disponível em: <http://www.ingentaconnect.com/content/ufaw/aw/2007/00000016/A00102s1/art00014>

- Reiter, L. V., Torres, S. M. F., & Wertz, P. W. (2009). Characterization and quantification of ceramides in the nonlesional skin of canine patients with atopic dermatitis compared with controls. *Veterinary dermatology*, 20(4), 260–266.
- Ring, J., Belloni, B., & Behrendt, H. (2009). Looking ahead in dermatology: skin and allergy. *Actas dermo-sifiligráficas*, 100 Suppl 2, 32–39.
- Rippke, F., Schreiner, V., Doering, T., & Maibach, H. I. (2004). Stratum corneum pH in atopic dermatitis: impact on skin barrier function and colonization with *Staphylococcus Aureus*. *American journal of clinical dermatology*, 5(4), 217–223.
- Robin, X., Turck, N., Hainard, A., Tiberti, N., Lisacek, F., Sanchez, J.-C., & Müller, M. (2011). pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics*, 12(1), 77.
- Rocha, M. I. L. (2012). *Skin prick tests – Preliminary evaluation of this technique for the diagnosis of canine atopic dermatitis sensitization*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária – Universidade Técnica de Lisboa.
- Rook, G. A. W., & Brunet, L. R. (2005). Old friends for breakfast. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 35(7), 841–842.
- Rook, G. A., & Stanford, J. L. (1998). Give us this day our daily germs. *Immunology today*, 19(3), 113–116.
- Roque, J. B., O’Leary, C. A., Duffy, D. L., Kyaw-Tanner, M., Gharakhani, P., Vogelnest, L., Mason, K., et al. (2012). Atopic dermatitis in west highland white terriers is associated with a 1.3-Mb region on CFA 17. *Immunogenetics*, 64(3), 209–217.
- Roque, J. B., O’Leary, C. A., Kyaw-Tanner, M., Duffy, D. L., & Shipstone, M. (2011). Real-time PCR quantification of the canine filaggrin orthologue in the skin of atopic and non-atopic dogs: a pilot study. *BMC research notes*, 4, 554.
- Rosenbaum, M. R., Esch, R. E., & Schwartzman, R. M. (1996). Effects of mold proteases on the biological activity of allergenic pollen extracts. *American journal of veterinary research*, 57(10), 1447–1452.
- Rybníček, J., Lau-Gillard, P. J., Harvey, R., & Hill, P. B. (2009). Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Veterinary dermatology*, 20(2), 115–122.
- Salzmann, C. A., Olivry, T. J. M., Nielsen, D. M., Paps, J. S., Harris, T. L., & Olby, N. J. (2011). Genome-wide linkage study of atopic dermatitis in west highland white terriers. *BMC Genetics*, 12, 37.
- Santamaria-Babí, L. F. (2004). CLA(+) T cells in cutaneous diseases. *European journal of dermatology: EJD*, 14(1), 13–18.
- Santoro, D., Marsella, R., Bunick, D., Graves, T. K., & Campbell, K. L. (2011). Expression and distribution of canine antimicrobial peptides in the skin of healthy and atopic beagles. *Veterinary immunology and immunopathology*, 144(3-4), 382–388.
- Saridomichelakis, M. N., Koutinas, A. F., Gioulekas, D., & Leontidis, L. (1999). Canine atopic dermatitis in Greece: clinical observations and the prevalence of positive intradermal test reactions in 91 spontaneous cases. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 69(1), 61–73.

- Saridomichelakis, M. N., Marsella, R., Lee, K. W., Esch, R. E., Farmaki, R., & Koutinas, A. F. (2008). Assessment of cross-reactivity among five species of house dust and storage mites. *Veterinary Dermatology*, *19*(2), 67–76.
- Schlotter, Y. M., Riemers, F. M., Rutten, V. P. M. G., Knol, E. F., & Willemse, T. (2010). Enzymes involved in the conversion of arachidonic acid to eicosanoids in the skin of atopic dogs. *Experimental dermatology*, *19*(8), e317–319.
- Schlotter, Y. M., Rutten, V. P. M. G., Riemers, F. M., Knol, E. F., & Willemse, T. (2011). Lesional skin in atopic dogs shows a mixed type-1 and type-2 immune responsiveness. *Veterinary immunology and immunopathology*, *143*(1-2), 20–26.
- Schlotter, Y. M., Rutten, V. P. M. G., Riemers, F., Davenport, G., Knol, E. F., & Willemse, T. (2009). Altered expression of fatty acid desaturases in the skin of dogs with atopic dermatitis. *Journal of Dermatological Science*, *54*(1), 49–52.
- Schnabl, B., Bettenay, S. V., Dow, K., & Mueller, R. S. (2006). Results of allergen-specific immunotherapy in 117 dogs with atopic dermatitis. *The Veterinary record*, *158*(3), 81–85.
- Schwartzman, R. M., Massicot, J. G., Sogn, D. D., & Cohen, S. G. (1983). The atopic dog model: report of an attempt to establish a colony. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, *72*(2), 97–101.
- Scott, D., Miller, W., & Griffin, C. E. (2001). *Small Animal Dermatology* (6th ed.). Philadelphia, Pennsylvania: Saunders.
- Sharma, H. P., Wood, R. A., Bravo, A. R., & Matsui, E. C. (2008). A comparison of skin prick tests, intradermal skin tests, and specific IgE in the diagnosis of mouse allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, *121*(4), 933–939.
- Shaw, S. C., Wood, J. L. N., Freeman, J., Littlewood, J. D., & Hannant, D. (2004). Estimation of heritability of atopic dermatitis in Labrador and Golden Retrievers. *American Journal of Veterinary Research*, *65*(7), 1014–1020.
- Shida, M., Kadoya, M., Park, S.-J., Nishifuji, K., Momoi, Y., & Iwasaki, T. (2004). Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. *Veterinary immunology and immunopathology*, *102*(1-2), 19–31.
- Shimada, K., Yoon, J.-S., Yoshihara, T., Iwasaki, T., & Nishifuji, K. (2009). Increased transepidermal water loss and decreased ceramide content in lesional and non-lesional skin of dogs with atopic dermatitis. *Veterinary dermatology*, *20*(5-6), 541–546.
- Simou, C., Thoday, K. L., Forsythe, P. J., & Hill, P. B. (2005). Adherence of *Staphylococcus intermedius* to corneocytes of healthy and atopic dogs: effect of pyoderma, pruritus score, treatment and gender. *Veterinary dermatology*, *16*(6), 385–391.
- Sociedade Portuguesa de Alergologia e Imunologia Clínica (2012). Rede Portuguesa de alergologia – Boletim polínico. Acedido em Jun. 26, 2012, disponível em: <http://www.rpaerobiologia.com/publicacoes/?imr=4n&first=1>
- Sousa, C. A., & Halliwell, R. E. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XI): the relationship between arthropod hypersensitivity and atopic dermatitis in the dog. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, *81*(3-4), 233–237.

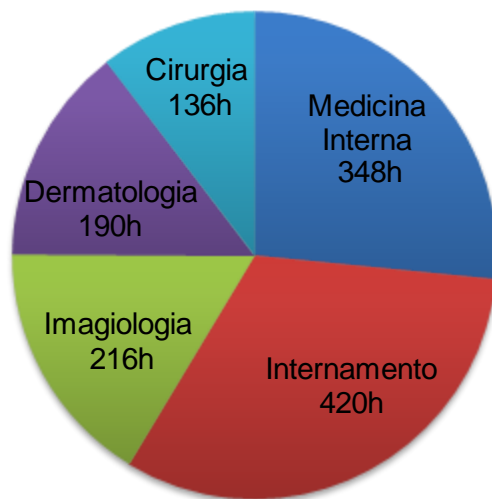


- Sousa, C. A., & Marsella, R. (2001). The ACVD task force on canine atopic dermatitis (II): genetic factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 81(3-4), 153–157.
- Stedman, K., Lee, K., Hunter, S., Rivoire, B., McCall, C., & Wassom, D. (2001). Measurement of canine IgE using the alpha chain of the human high affinity IgE receptor. *Veterinary immunology and immunopathology*, 78(3-4), 349–355.
- Steiss, J. E., Schaffer, C., Ahmad, H. A., & Voith, V. L. (2007). Evaluation of plasma cortisol levels and behavior in dogs wearing bark control collars. *Applied Animal Behaviour Science*, 106(1-3), 96–106.
- Strachan, D. P. (1989). Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ (Clinical research ed.)*, 299(6710), 1259–1260.
- Sture, G. H., Halliwell, R. E., Thoday, K. L., van den Broek, A. H., Henfrey, J. I., Lloyd, D. H., Mason, I. S., Ferguson, E. (1995). 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*, 44(3-4), 293–308.
- Swinnen, C., & Vroom, M. (2004). The clinical effect of environmental control of house dust mites in 60 house dust mite-sensitive dogs. *Veterinary dermatology*, 15(1), 31–36.
- Takahashi, Y., Ebihara, S., Nakamura, Y., & Takahashi, K. (1981). A model of human sleep-related growth hormone secretion in dogs: effects of 3, 6, and 12 hours of forced wakefulness on plasma growth hormone, cortisol, and sleep stages. *Endocrinology*, 109(1), 262–272.
- Tarpataki, N., Bigler, B., Vajdovich, P., & Vörös, K. (2008). Comparison between an intradermal skin test and allergen-specific IgE-ELISA for canine atopic dermatitis. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, 150(3), 117–122.
- Temizel, E. M., Cihan, H., Akhtardanesh, B., & Aytug, N. (2011). Effect of prednisolone and cetirizine on *D. farinae* and histamine-induced wheal and flare response in healthy dogs. *Tierärztliche Praxis. Ausgabe K, Kleintiere/Heimtiere*, 39(1), 25–30.
- Tilley, P., Luís, J. P. S., & Ferreira, M. B. (2010). Testes cutâneos por picada (TCP) na obstrução recorrente das vias aéreas (ORVA) equina. *Rev Port Imunoalergologia*, 18(6), 561–584.
- Tilley, P., Sales Luis, J. P., & Ferreira, M. B. (2012). Comparison of Skin Prick Tests with In Vitro Allergy Tests in the Characterization of Horses with Recurrent Airway Obstruction. *Journal of Equine Veterinary Science*.
- Tsukui, T., Sakaguchi, M., Kurata, K., Maeda, S., Ohmori, K., Masuda, K., Tsujimoto, H., Iwabuchi, S. (2012). Measurement for Canine IgE Using Canine Recombinant High Affinity IgE Receptor  $\alpha$  Chain (Fc $\epsilon$ R1 $\alpha$ ). *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*.
- van Damme, C. M. M., Willemse, T., van Dijk, A., Haagsman, H. P., & Veldhuizen, E. J. A. (2009). Altered cutaneous expression of beta-defensins in dogs with atopic dermatitis. *Molecular immunology*, 46(13), 2449–2455.
- Vincent, I. C., & Michell, A. R. (1992). Comparison of cortisol concentrations in saliva and plasma of dogs. *Research in veterinary science*, 53(3), 342–345.
- von Mutius, E. (2000). The environmental predictors of allergic disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 105(1 Pt 1), 9–19.

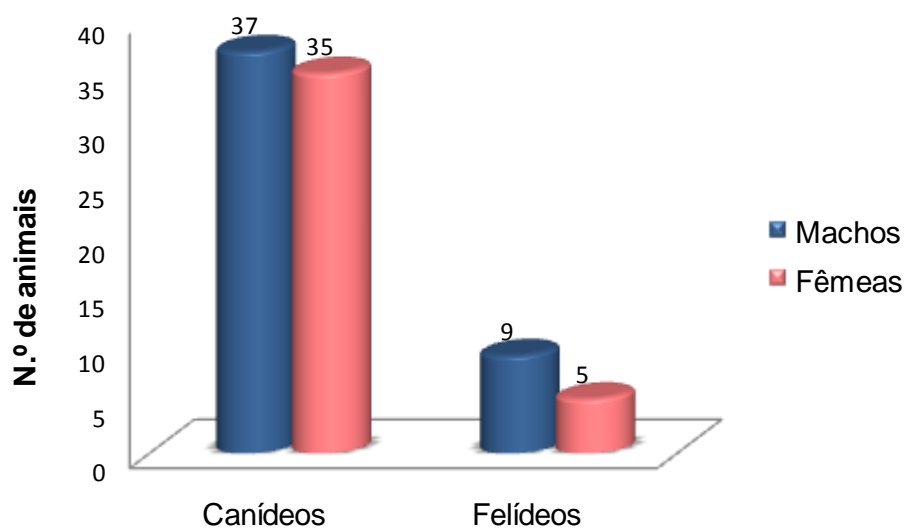
- Wahn, U. (2000). What drives the allergic march? *Allergy*, 55(7), 591–599.
- Wassom, & Grieve. (1998). In vitro measurement of canine and feline IgE: a review of FcεR1α-based assays for detection of allergen-reactive IgE. *Veterinary Dermatology*, 9(3), 173–178.
- Welle, M. M., Olivry, T., Grimm, S., & Suter, M. (1999). Mast cell density and subtypes in the skin of dogs with atopic dermatitis. *Journal of comparative pathology*, 120(2), 187–197.
- Wilkie, J. S., Yager, J. A., Eyre, P., & Parker, W. M. (1990). Morphometric analyses of the skin of dogs with atopic dermatitis and correlations with cutaneous and plasma histamine and total serum IgE. *Veterinary Pathology*, 27(3), 179–186.
- Willemse T. (1986) Atopic skin disease: a review and a reconsideration of diagnostic criteria. *J Small Anim Pract*, 27, 771-778.
- Williams, H. C., Burney, P. G., Hay, R. J., Archer, C. B., Shipley, M. J., Hunter, J. J., Bingham, E. A., Finlay, A. Y., Pembroke, A. C., Graham-Brown, R. A., et al. (1994). The U.K. working party's diagnostic criteria for atopic dermatitis. I. Derivation of a minimum set of discriminators for atopic dermatitis. *The British journal of dermatology*, 131(3), 383–396.
- Wollenberg, A., & Klein, E. (2007). Current aspects of innate and adaptive immunity in atopic dermatitis. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 33(1-2), 35–44.
- Wollenberg, A., R  wer, H.-C., & Schaubert, J. (2011). Innate immunity in atopic dermatitis. *Clinical reviews in allergy & immunology*, 41(3), 272–281.
- Wood, R. A., Phipatanakul, W., Hamilton, R. G., & Eggleston, P. A. (1999). A comparison of skin prick tests, intradermal skin tests, and RASTs in the diagnosis of cat allergy. *The Journal of allergy and clinical immunology*, 103(5 Pt 1), 773–779.
- Wood, S. H., Clements, D. N., Ollier, W. E., Nuttall, T., McEwan, N. A., & Carter, S. D. (2009). Gene expression in canine atopic dermatitis and correlation with clinical severity scores. *Journal of Dermatological Science*, 55(1), 27–33.
- Zur, G., Ihrke, P. J., White, S. D., & Kass, P. H. (2002). Canine atopic dermatitis: a retrospective study of 266 cases examined at the University of California, Davis, 1992-1998. Part I. Clinical features and allergy testing results. *Veterinary Dermatology*, 13(2), 89–102.

ACTIVIDADES DE ESTÁGIO E CASUÍSTICA ACOMPANHADA NAS CONSULTAS DE DERMATOLOGIA NO HOSPITAL ESCOLAR DA FMV-UTL

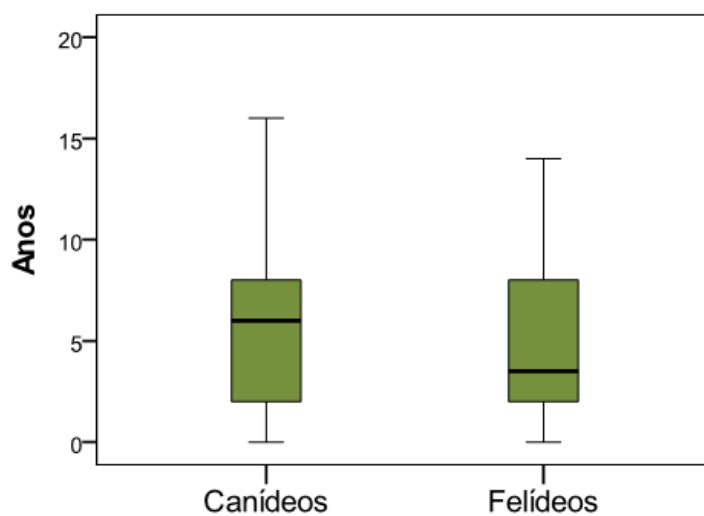
Distribuição das actividades de estágio pelos serviços do hospital escolar da FMV-UTL.



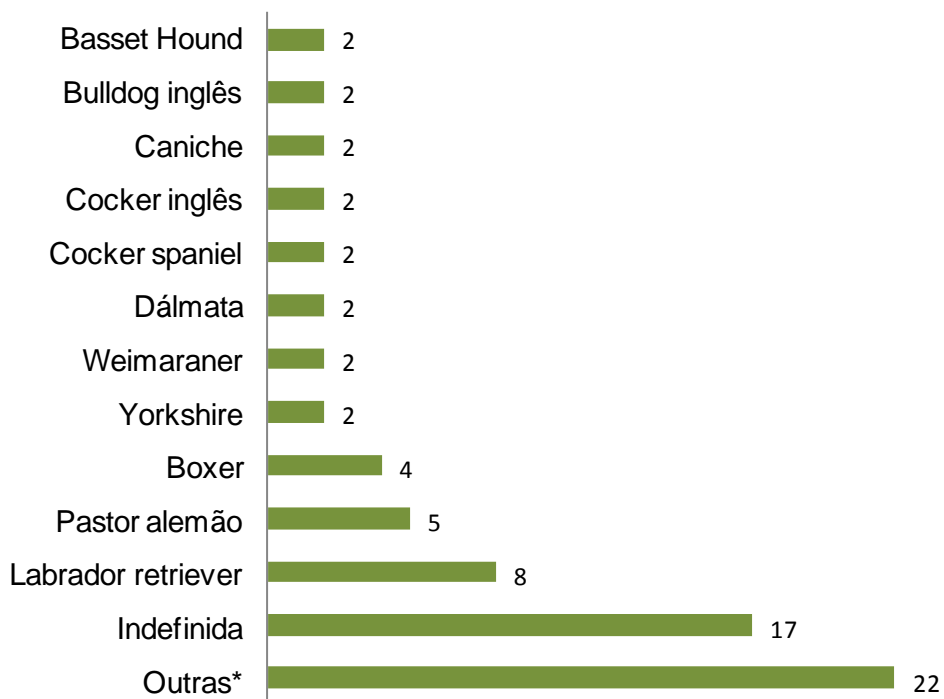
Distribuição por sexo dos animais seguidos na consulta de dermatologia.



Distribuição por idade dos animais seguidos na consulta de dermatologia.

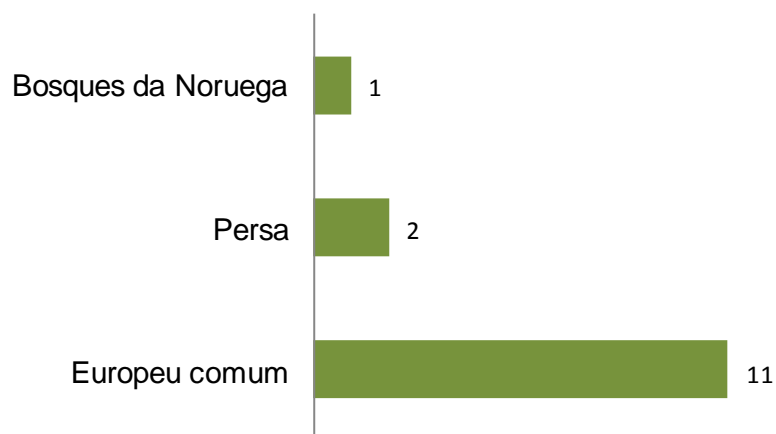


Distribuição por raça dos canídeos seguidos na consulta de dermatologia.



\* Raças representadas apenas por um indivíduo.

Distribuição por raça dos felídeos seguidos na consulta de dermatologia.



Casuística acompanhada nas consultas de dermatologia.

	<b>Causas mais frequentes</b>	<b>Causas menos frequentes</b>
<b>Canídeos</b>	Dermatite atópica canina DAPP Piodermite Dermatite por <i>Malassezia</i> Otites Sarna demodécica Sarna sarcóptica	Dermatofitose RCAOA Alopecia sazonal dos flancos Calcinose cutânea Fístula perianal Impetigo juvenil Pênfigus foliáceo
<b>Felídeos</b>	Dermatite atópica felina DAPP Piodermite Otites	Dermatofitose Ictiose das almofadinhas plantares

## ANEXO B

### PAINEL DE ALERGÉNIOS UTILIZADOS NOS TESTES CUTÂNEOS E POTÊNCIAS/ CONCENTRAÇÕES APLICADAS NOS TCP

Grupo	N.º	Alergénios	Nome comum	TCP
Ácaros	3	<i>Dermatophagoides farinae</i>	Ácaro do pó	30 HEP; Der f 1:40 µg/ml Der f 2:20 µg/ml
	4	<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	Ácaro do pó	30 HEP; Der p 1:40 µg/ml Der p 2:20 µg/ml
	5	<i>Acarus siro</i>	Ácaro de armazenamento	10 HEP
	6	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	Ácaro de armazenamento	10 HEP
	7	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	Ácaro de armazenamento	10 HEP; Lep d 2:30 µg/ml
Epitélios	8	<i>Felis catus</i>	Gato	10 HEP; Fel d 1:60 µg/ml
	9	Epitélio humano	(não aplicável)	(não disponível)
Penas	10	Mistura de penas	(não aplicável)	1:100 w/v
Fungos	11	<i>Alternaria alternata</i>	(não aplicável)	30 HEP; Alt a 1:25 µg/ml
	12	<i>Cladosporium herbarum</i>	(não aplicável)	1:20 w/v
	13	<i>Malassezia pachydermatis</i>	(não aplicável)	(não disponível)
Pólenes de árvores	14	<i>Platanus occidentalis</i>	Platanus	30 HEP
	15	<i>Cupressus arizonica</i>	Cipreste	30 HEP
	16	<i>Eucalyptus</i>	Eucalipto	(não disponível)
	17	<i>Olea Europa</i>	Oliveira	30 HEP; Ole e 1:80 µg/ml
Pólenes de gramíneas	18	<i>Dactylis glomerata</i>	Relva	30 HEP; Dac g 5:60 µg/ml
	19	<i>Festuca pratensis</i>	Festuca-dos-prados	30 HEP; Fes p 5:60 µg/ml
	20	<i>Poa pratensis</i>	Poa-dos-prados	30 HEP; Poa p 5:60 µg/ml

<b>Grupo</b>	<b>N.º</b>	<b>Alergénios</b>	<b>Nome comum</b>	<b>TCP</b>
Pólenes de gramíneas	21	<i>Lolium perenne</i>	Azevém perene	30 HEP; Lol p 5:60 µg/ml
	22	<i>Cynodon dactylon</i>	Bermuda	30 HEP; Cyn d 1:30 µg/ml
	23	<i>Phleum pratense</i>	Rabo-de-gato	10 HEP
Pólenes de ervas daninhas	24	<i>Urtica dioica</i>	Urtiga	(não disponível)
	25	<i>Artemisia vulgaris</i>	Erva-de-São João	30 HEP; Art v 1:135 µg/ml
	26	<i>Chenopodium album</i>	Pé-de-ganso	30 HEP
	27	<i>Kochia scoparia</i>	Cipreste de Verão	(não disponível)
Insectos	28	<i>Periplaneta a./ Blatella germânica</i>	Baratas	1:100 w/v
	29	<i>Ctenocephalides canis/ felis</i>	Pulgas	(não disponível)
	30	<i>Culicidae</i>	Mosquitos	(não disponível)

HEP – *Histamine equivalent prick.* w/v – *weight/ volume.*

## ANEXO C

---

### ESCALA DE AVALIAÇÃO DE DOR USADA NOS TCP (ADAPTADA DE: *SHORT FORM OF THE GLASGOW COMPOSITE PAIN SCALE*)

**Nome do animal:** \_\_\_\_\_

Observar o comportamento do cão e, em cada secção, assinalar a opção mais correcta.

#### **A. Durante o procedimento:**

(i) O cão está...

sossegado	0
a “chorar” ou a “choramingar”	1
a gemer	2
a gritar	3

#### **B. Imediatamente após o procedimento:**

(ii) O cão está a...

ignorar qualquer foco de dor/desconforto	0
olhar para o foco de dor/desconforto	1
lamber o foco de dor/desconforto	2
esfregar o foco de dor/desconforto	3
morder o foco de dor/desconforto	4

(iii) Aplicando ligeira pressão sobre a área intervencionada, o cão...

não faz nada	0
olha para o local	1
encolhe-se, retira-se	2
rosna e protege o local	3
tenta morder	4
gane	5



(iv) O cão está...		
alegre e contente		0
sossegado		1
indiferente ou não responsivo ao ambiente envolvente		2
nervoso, ansioso ou medroso		3
deprimido ou não responsivo a estímulos		4

(v) O cão está...		
confortável	0	
desconfortável	1	
inquieto, agitado	2	
cifose/lordose ou tenso	3	
rígido	4	

**Pontuação total (i + ii + iii + iv + v) = \_\_\_\_\_**

