

Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

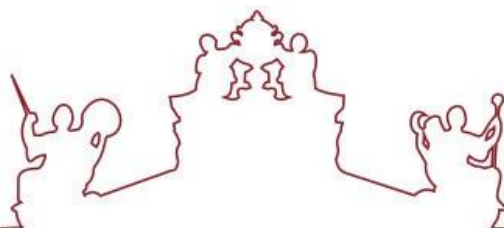
Dissertação

Avaliação da sensibilização às fontes alergénicas mais comuns em associação com a prevalência parasitária em cães

Lisa D'Alva Sousa Nascimento Costa

Orientadores | Luís Martins

Dário Jorge Costa Santinha



Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia

Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

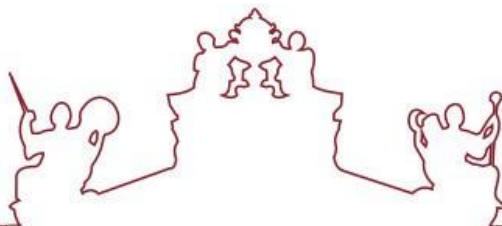
Dissertação

Avaliação da sensibilização às fontes alergénicas mais comuns em associação com a prevalência parasitária em cães

Lisa D'Alva Sousa Nascimento Costa

Orientadores | Luís Martins

Dário Jorge Costa Santinha



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

- Presidente | Rita Payan Carreira (Universidade de Évora)
- Vogal | Ana Mafalda Lourenço (Universidade de Lisboa - Faculdade de Medicina Veterinária)
- Vogal-orientador | Luís Martins (Universidade de Évora)

Agradecimentos

Aos excelentíssimos Professor Doutor Luís Martins e Professora Doutora Ludovina Padre, o meu mais profundo agradecimento, por terem aceitado orientar-me, apostando neste projeto e prestado toda a ajuda possível para a sua concretização. Por me terem orientado na elaboração desta dissertação e por toda a logística envolvida. Foi uma honra trabalhar neste projeto sob a vossa sábia alçada. Obrigada por tudo o que me ensinaram, não teria sido possível chegar ao fim deste percurso se não fossem grandes professores, com tamanha dedicação. Obrigada pela paciência e confiança.

Ao Dr. Dário Santinha, obrigada pelos desafios e ensinamentos. Não poderia ter tido mais sorte no local em que realizei a componente clínica do estágio, num hospital com uma casuística tão vasta, com uma equipa tão empenhada e prestável. Excedeu todas as expectativas. Obrigada pela oportunidade proporcionada ao aceitar a realização deste estágio, o apoio excecional e por me permitir desenvolver a componente laboratorial desta dissertação no Hospital Veterinário de Loulé. A toda a equipa HV Loulé, grata por tudo o que me transmitiram e por me fazerem sentir sempre em casa.

Ao Dr. José Carlos de Sousa, muito obrigada pela sua disponibilidade incondicional e obrigada por partilhar conhecimento consolidado pelas décadas de serviço na saúde animal e pública. À Câmara Municipal de Lagos, muito obrigada pelo apoio prestado na execução deste estudo e a todos os funcionários do canil que me receberam de braços abertos.

Ao apoio logístico, paciência e amabilidade proporcionado pelo Dr. Luís Branco e equipa na clínica PetVet Lagos, onde realizei uma parte do trabalho laboratorial, obrigada.

A todos os professores que acompanharam o meu percurso académico, grata por tudo o que me transmitiram e ensinaram, e pela vossa dedicação. Todos vós, sem exceção, uma bênção da nossa grande Universidade de Évora.

Aos meus colegas Joana Maia, Dra. Nádia Presado, Dra. Carla Cabral, Dra. Liliana Martins, Anne-Claire e Manuel Raposo por serem tão boas pessoas, por todo o ânimo e desânimo partilhado ao longo do curso, em particular nesta fase final. Um agradecimento especial à Joana, pela colaboração na realização dos diagnósticos parasitológicos em Évora. E pelo apoio, Dra. Ana Ferreira, Dra. Maria José Dias, Dra. Ana Palma e Dra. Aline Capanema.

À minha família, obrigada pela compreensão, apoio incondicional e por toda a felicidade que trazem para a minha vida. Ao Eurico, ao meu filhote, Lucas, aos meus pais, os melhores do mundo e aos únicos e fantásticos David e Marco, meus irmãos, Maria Ramos e Isaura Arouca, as mulheres mais incríveis, e a todos os meus VBs, as pessoas mais genuínas que conheço e a todos que sempre fizeram de mim uma pessoa melhor, muito obrigada.

Resumo

A presente dissertação está dividida em quatro partes: um capítulo sumário de parasitologia; os princípios básicos da alergologia veterinária; os princípios gerais da imunoalergologia e da imunoparasitologia; o estudo realizado de avaliação da sensibilização a ácaros do pó e de armazenamento, através da realização de testes intradérmicos, que permitiram a identificação de correlações de pares para os diferentes ácaros e correlações para os achados diagnósticos parasitológicos num grupo de 20 canídeos, tendo em conta as relações imunitárias estabelecidas.

Obteve-se uma prevalência de infecção parasitária geral de 50%, 10% de ancilostomatídeos, 5% de *Trichuris vulpis*, 15% de *Dipylidium caninum* (métodos coprológicos), 15% de *Hepatozoon canis*, 15% de microfilaremia (citologia de esfregaço sanguíneo) e 20% de *Rhipicephalus sanguineus*.

Estatisticamente foi demonstrada a correlação positiva entre sensibilização a ácaros domésticos e prevalência de protozoários e ixodídeos, e negativa para a prevalência de infecção por helmintes ($r = -0,7$; $p < 0,001$).

Palavras-chave: Parasitologia; Dermatologia; Alergologia; Cães; Canil.

Abstract

Evaluation of sensitization to the most common allergen sources in association with parasitic prevalence in dogs

The current graduation thesis is composed of four parts: a parasitology overview; basic principles of veterinary allergology; immunoallergology and immunoparasitology theoretical framework; the assessment of skin reactivity with intradermal testing against a group of house dust and forage mites, that allowed a pair correlation between the mites and a correlational research for the parasitological findings in a group of 20 dogs, considering the immune system relationships.

The parasite prevalence in the group was 50%, 10% of ancyllostomatoids, 5% of *Trichuris vulpis*, 15% of *Dipylidium caninum* (coprological methods), 15% of *Hepatozoon canis*, 15% of microfilaremia (blood smear cytology) and 20% of *Rhipicephalus sanguineus*.

Positive correlation was found between positivity for dust and forage mites, protozoa and ixodidae, and negative correlation for helminth ($r = -0,7$; $p < 0,001$).

Keywords: Parasitology; Dermatology; Allergology; Dogs; Kennel.

Índice Geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
<i>Abstract</i>	ii
Índice de Figuras.....	v
Índice de Tabelas	vii
Índice de Gráficos	viii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	ix
Introdução.....	1
I. Parasitologia veterinária.....	2
1. Parasitas protozoários	2
1.1 Filo Apicomplexa.....	2
1.1.1 <i>Hepatozoon canis</i>	2
1.1.2 <i>Cystoisospora spp.</i>	3
1.2 Filo Sarcocystidophora	4
1.2.1 <i>Leishmania infantum</i>	4
1.2.2 <i>Giardia spp.</i>	5
2. Parasitas helmintes	7
2.1 Filo Nematoda.....	7
2.1.1 <i>Ancylostomatinae</i>	7
2.1.2 <i>Trichuris vulpis</i>	8
2.1.3 <i>Toxocara canis</i>	9
2.1.1 <i>Dirofilaria immitis</i>	10
2.1.2 <i>Onchocerca lupi</i>	11
2.2 Classe Cestoda.....	12
2.2.1 <i>Dipylidium caninum</i>	12
3. Parasitas ixodídeos	12
3.1 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	13
II. Alergologia veterinária.....	14
1. Dermatite Atópica Canina	14
2. Ácaros domésticos	17
2.1 <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>	18
2.2 <i>Dermatophagoides farinae</i>	19
2.3 <i>Acarus siro</i>	20

2.4	<i>Lepidoglyphus destructor</i>	20
2.5	<i>Tyrophagus putrescentiae</i>	20
2.6	<i>Euroglyphus maynei</i>	20
3.	Diagnóstico alergológico	21
4.	Hipótese da Higiene	22
III.	Imunologia Veterinária.....	23
1.	Princípios gerais	23
2.	Imunoloalergologia	25
2.1	Sensibilização	26
2.2	Resposta de hipersensibilidade do tipo I e polarização de célula T	27
2.3	Princípios imunológicos do diagnóstico alergológico.....	28
3.	Imunoparasitologia	29
3.1	Imunidade inata, nuócitos e ponte para a imunidade adaptativa	30
3.2	Eosinófilos, macrófagos e neutrófilos	32
3.3	Imunidade adaptativa	34
3.3.1	Linfócitos T reguladores (Treg) e citocinas.....	34
3.3.2	Linfócitos T helper (Th) 17 e citocinas.....	35
3.3.3	Resposta de hipersensibilidade do tipo 2	36
3.3.4	Linfócitos Th1, Th9, Th22 e citocinas	37
3.3.5	Imunoglobulina E (IgE)	37
3.4	Imunorregulação por helmintes	38
3.4.1	Filarídeos.....	41
3.5	Imunorregulação por protozoários	41
3.5.1	<i>Leishmania sp.</i>	42
3.5.2	<i>Hepatozoon canis</i>	43
3.5.3	<i>Giardia sp.</i>	44
3.6	Imunorregulação por ixodídeos	44
4.	Reações cruzadas	45
5.	Predisposição genética.....	45
6.	Imunomodulação e terapêutica médica.....	46
IV.	Avaliação da sensibilização às fontes alergénicas mais comuns em associação com a prevalência parasitária em cães	47
1.	Objetivos	47
2.	Materiais e Métodos	47
3.	Resultados	50

3.1	Hemograma	50
3.2	Fibrinogénio	57
3.3	Diagnóstico parasitológico.....	62
3.4	Testes intradérmicos.....	70
3.5	Correlação entre sensibilização (TID) e diagnóstico parasitário	75
4.	Discussão.....	77
4.1	Hemograma	79
4.2	Fibrinogénio	81
4.3	Diagnóstico parasitológico.....	82
4.4	Testes intradérmicos.....	83
4.5	Correlação entre sensibilização (TID) e diagnóstico parasitário	86
	Conclusões.....	90
	Bibliografia.....	93
	Anexos	107

Índice de Figuras

Figura 1 – Mapa da distribuição mais comum das lesões e prurido associado a dermatite atópica canina (adaptado de Hensel <i>et al.</i> , 2015).	14
Figura 2 – Vista ventral de fêmea de <i>Dermatophagoides farinae</i> (adaptado de Mullen & OConnor, 2019).	19
Figura 3 – Fêmea de <i>Acarus siro</i> (adaptado de Mullen & OConnor, 2019).	20
Figura 4 – Vista ventral de fêmea <i>Euroglyphus maynei</i> (adaptado de Mullen & OConnor, 2019).	20
Figura 5 – Vias mediadoras na resposta inflamatória alérgica (adaptado de Akdis <i>et al.</i> , 2016).	24
Figura 6 – Modelo de ligação em ponte (<i>cross-linking</i>) alérgénio a recetores de alta e baixa afinidade IgE e consequente desgranulação do mastócito (adaptado de Herbert, 2017).	27
Figura 7 – Esquema da resposta imunitária às infeções por helmintes. As setas sólidas indicam sinalização a células, setas descontínuas indicam a diferenciação celular (adaptado de Jackson <i>et al.</i> , 2009).	30
Figura 8 – Morfologia de nuócitos por coloração Giemsa (adaptado de Neill <i>et al.</i> , 2010).	31
Figura 9 – Estímulos microambientais recebidos por ILC2s (adaptado de Lloyd & Snelgrove, 2018).	31

Figura 10 – Eixo nuócito (ILC2)-célula dendrítica-resposta Th2 (adaptado de Lloyd & Snelgrove, 2018).....	32
Figura 11 – Desgranulação eosinofílica e consequente lesão da cutícula parasitária (adaptado de Tizard, 2012).	33
Figura 12 – Modelo da regulação de citocinas tipo 2 e Th17 na presença de quitina parasitária ou alergénios e lesão tecidual. CLP – proteína tipo-quitina (adaptado de Allen <i>et al.</i> , 2015).	35
Figura 13 – Exemplos de efetores imunitários imunossuprimidos por helmintes (adaptado de Hewitson <i>et al.</i> , 2009).....	39
Figura 14 – Imunidade protetora e imunossupressão por leishmaniose (adaptado de Day, 2011).	43
Figura 15 – Esfregaço sanguíneo (ampliação: 1000x), tricograma (ampliação: 100x) e aspeto geral do animal nº 2.	51
Figura 16 – Esfregaço sanguíneo (ampliação: 1000x), lesão cutânea e <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , animal nº 3.	52
Figura 17 – Esfregaço sanguíneo (ampliações: 1000x e 400x) e úlcera na mucosa do animal nº 16.	53
Figura 18 – Esfregaço sanguíneo do animal nº 15 (ampliação: 1000x).	55
Figura 19 – Esfregaço sanguíneo com <i>Hepatozoon canis</i> no animal nº 7 (ampliação: 1000x).	56
Figura 20 – Citologia de aposição de lesão ulcerativa, citologia otológica e esfregaço sanguíneo, animal nº 4 (ampliações: 100x, 400x, 1000x).....	59
Figura 21 – Esfregaço sanguíneo, microfilarémia e tricograma do animal nº 9 (ampliações: 1000x e 100x).	60
Figura 22 – Esfregaço sanguíneo do animal nº 20 (ampliação: 1000x).	61
Figura 23 – Gamonte de <i>Hepatozoon canis</i> em neutrófilo, animal nº 7 (ampliação: 1000x).	62
Figura 24 – Gamonte de <i>Hepatozoon canis</i> em monócito, animal nº 17 (ampliação: 1000x).	62
Figura 25 – Esfregaço sanguíneo, microfilarémia, <i>Hepatozoon canis</i> (ampliações: 1000x e 400x) e lesão dermatológica esternal do animal nº 17.	63
Figura 26 – Esfregaço sanguíneo, <i>Hepatozoon canis</i> e citologia por aposição do animal nº 18 (ampliação: 1000x).....	64
Figura 27 – Microfilária em esfregaço sanguíneo, animal nº 9, terminação posterior (ampliação: 1000x).....	65
Figura 28 – Microfilária em esfregaço sanguíneo, animal nº 9, terminação anterior (ampliação: 1000x).....	65
Figura 29 – Esfregaço sanguíneo, microfilarémia e citologia por aposição de lesão do animal nº 8 (ampliações: 400x e 1000x).	66
Figura 30 – Proglote ovígero de <i>Dipylidium caninum</i> (ampliação: 40x).	67

Figura 31 – Ovo de ancilostomatídeo (ampliação: 100x).	67
Figura 32 – Ovo de <i>Trichuris vulpis</i> (ampliação: 100x).	68
Figura 33 – Citologia por aposição de lesão cutânea e esfregaço sanguíneo do animal nº 1 (ampliações: 1000x e 400x).....	69
Figura 34 – Teste intradérmico negativo aos extratos alergénicos em estudo.....	73
Figura 35 – Teste intradérmico positivo aos extratos alergénicos <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> e <i>Tyrophagus putrescentiae</i>	74
Figura 36 – Teste intradérmico positivo a <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Acarus siro</i> e <i>Tyrophagus putrescentiae</i>	74
Figura 37 – Teste intradérmico positivo a <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Acarus siro</i> e <i>Euroglyphus maynei</i>	74
Figura 38 – Teste intradérmico positivo a <i>Dermatophagoides farinae</i> e <i>Tyrophagus putrescentiae</i>	75
Figura 39 – Teste intradérmico positivo a <i>Dermatophagoides farinae</i> , <i>Acarus siro</i> , <i>Lepidoglyphus destructor</i> e <i>Euroglyphus maynei</i>	75

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Os dois conjuntos de critérios de Favrot para o diagnóstico de dermatite atópica canina (adaptado de Favrot, 2010, referido por Hensel <i>et al.</i> , 2015).	15
Tabela 2 – Análise estatística da variável idade dos animais do grupo.	50
Tabela 3 – Média e desvio padrão dos valores de hemograma obtidos.	51
Tabela 4 – Análise estatística da percentagem de eosinófilos dos animais do grupo. ...	54
Tabela 5 – Classificações aos testes intradérmicos do grupo.	70
Tabela 6 – Frequências absoluta e relativa para as diferentes respostas verificadas nos testes intradérmicos, por extrato alergénico.....	71
Tabela 7 – Correlação de pares para as reatividades cutâneas obtidas para os diferentes extratos alergénicos em estudo.	72
Tabela 8 – Correlação entre a prevalência de Nematoda e reatividade cutânea positiva aos testes intradérmicos.	76
Tabela 9 – Correlação entre as variáveis reatividade cutânea positiva aos testes intradérmicos e efeito parasitário imunológico.	76
Tabela 10 – Correlação entre as variáveis reatividade cutânea positiva aos testes intradérmicos e efeito imunológico parasitário.	77
Tabela 11 – Prevalências das espécies parasitárias diagnosticadas no presente estudo, em Portugal continental e nas cidades de Lagos, Beja, Serpa e na região do Algarve, Portugal.	83

Tabela 12 – Distribuição da casuística geral da componente de estágio curricular realizado no Hospital Veterinário de Loulé, frequência absoluta por área clínica e espécie animal (Fip) e frequência relativa (Fr%).	107
Tabela 13 – Distribuição da casuística da patologia e clínica médica realizada no Hospital Veterinário de Loulé, frequência absoluta por área clínica e espécie animal (Fip) e relativa (Fr%).	107
Tabela 14 – Distribuição da casuística da patologia e clínica cirúrgica realizada no Hospital Veterinário de Loulé, frequência absoluta por área clínica e espécie animal (Fip) e relativa (Fr%).	107

Índice de Gráficos

Gráfico 1 – Diagrama de extremos e quartis da idade dos animais no grupo.	50
Gráfico 2 – Resultados de hematócrito, concentração de hemoglobina corpuscular média e volume corpuscular médio obtidos para os indivíduos no grupo.....	51
Gráfico 3 – Diagrama de extremos e quartis da percentagem de eosinófilos dos animais do grupo.	54
Gráfico 4 – Percentagem de eosinófilos, obtidos para os animais em estudo, e delimitação a verde do limite superior considerado normal para a espécie.	57
Gráfico 5 – Valores de fibrinogénio em mg/dL obtidos para os animais em estudo, e delimitação a azul do limite superior considerado normal para a espécie.....	57
Gráfico 6 – Diagrama de extremos e quartis das respostas aos testes intradérmicos, por extrato alergénico.	71
Gráfico 7 – Correlação de pares para as diferentes respostas por extrato alergénico. .	73

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

- Aca s** – Alergénios de *Acarus siro*
- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- APC** – *Antigen-presenting Cells* (Células apresentadoras de antígeno)
- ASIT** — *Allergen-specific Immunotherapy* (Imunoterapia alérgico-específica)
- AID** – *Atopic-like Dermatitis* (Dermatite do tipo atópico)
- BID** – *Bis in die* (duas vezes por dia)
- Breg** - Linfócitos B reguladores
- DAc** – Dermatite atópica canina
- DC** – *Dendritic Cells* (Células dendríticas)
- Der f** – Alergénios de *Dermatophagoides farinae*
- Der p** – Alergénios de *Dermatophagoides pteronyssinus*
- EDTA** – Ácido etilendiamino tetra-acético
- ELISA** – Ensaio de imunoabsorção enzimática
- Eur m** – Alergénios de *Euroglyphus maynei*
- Fcε** – Fração épsilon da IgE de alta afinidade
- FcεRI** – Recetor de alta afinidade para IgE
- FcεRII** – Recetor de baixa afinidade para IgE; CD23
- Fi** – Frequência absoluta
- Fip** – Frequência absoluta relativa por espécie animal
- Fr (%)** – Frequência relativa em percentagem
- GM-CSF** – *Granulocyte-macrophage Colony-stimulating Factor* (Fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos)
- Hgb** – Hemoglobina
- Hp-ARI** – *Heligmosomoides polygyrus Alarmin Release Inhibitor* (Inibidor da libertação de alarmina)
- IFN-γ** – Interferão-gama
- IgE** – Imunoglobulina E
- IgEt** – IgE total sérica
- IgG** – Imunoglobulina G
- IL** – Interleucina; citocina
- ILC** – *Innate Lymphoid Cells* (Células linfóide inatas)
- ILC2** – Nuócitos
- IM** – Intramuscular
- ITC** – *Irritant threshold concentrations* (limite inferior das concentrações tidas como irritantes para TID)
- IV** – Intravenoso
- Lep d** – Alergénios de *Lepidoglyphus destructor*
- LPS** – Lipopolissacárido
- M-CSF** – *Macrophage Colony-stimulating Factor* (Fator estimulador de colónias de macrófagos)
- M1** – Macrófagos classicamente ativados
- M2** – Macrófagos alternativamente ativados
- MCH** – *Mean Corpuscular Hemoglobin* (Hemoglobina corpuscular média)

MCHC – *Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration* (Concentração de hemoglobina corpuscular média)

MCV – *Mean Corpuscular Volume* (Volume Corpuscular Médio)

MHC I e II – *Major Histocompatibility Complex class I and II* (Complexo maior de histocompatibilidade classe I e II)

MIF – *Macrophage Inhibiting-factor* (Fator de inibição da migração de macrófagos)

MPV – *Mean Platelet Volume* (Volume plaquetário médio)

NK – Células *Natural-killer*

NO – *Nitric Oxide* (Óxido nítrico)

Opg – Ovos por grama de fezes

PAAF – Punção Aspirativa por Agulha Fina

PAMP - Padrão molecular associado a agentes patogénicos

PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PCT – Plaquetócrito

PDW – *Platelet Distribution Width* (Índice de distribuição plaquetário)

PNU – Unidades proteicas não standardizadas de extrato alergénico

PO – *Per os*, administração via oral

PRRs – *Patern-recognizing Receptors* (Recetores de reconhecimento de padrão)

RAST – *Radioallergosorben Test* (atualmente usado para designar os métodos de determinação das sIgE)

RDW – *Red Cell Distribution Width* (Distribuição percentual do volume eritrocitário)

SC – Administração pela via subcutânea

SD – *Standard Deviation* (Desvio padrão)

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis* (Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio)

SID – *Semel in die* (uma vez por dia)

sIgE – Imunoglobulina E (IgE) específica

SPT – *Skin Prick Test* (Teste cutâneo por picada)

TCD4⁺ – Linfócito T auxiliar expressando o *cluster* de diferenciação 4

TCD8⁺ – Linfócito T auxiliar expressando o *cluster* de diferenciação 8 (citotóxico)

TGF-β – Fator de transformação do crescimento

TGM – *TGF mimic* (homólogo de TGF)

Th – Linfócito T *helper* (auxiliar)

TID – Testes intradérmicos

TLR – Recetores *Toll-Like*

TNF – *Tumor necrosis factor* (Fator de necrose tumoral)

Treg – Linfócitos T reguladores

TRPV1 – *Transient receptor potencial vanilloid type 1* (Recetor vanilóide do tipo 1)

TSLP – *Thymic Stromal Lymphopoietin* (Linfopoietina estromal tímica)

Tyr p – Alergénios de *Tyrophagus putrescentiae*

Introdução

A presente dissertação foi desenvolvida no âmbito do Mestrado Integrado de Medicina Veterinária da Universidade de Évora e baseou-se no estágio curricular realizado no Hospital Veterinário de Loulé e no Canil Municipal de Lagos, no Algarve, nas áreas de medicina veterinária de pequenos animais e de saúde pública. O referido estágio teve início a oito de outubro de 2018 a término a 29 de maio de 2019. Este estágio realizou-se sob a orientação do Doutor Luís Miguel Lourenço Martins, Professor Auxiliar do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Évora, responsável pelo Laboratório de Análises Clínicas e pela Consulta Externa de Imunoalergologia do Hospital Veterinário Universitário de Évora, e da Doutora Ludovina Neto Padre, Professora Auxiliar do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade de Évora, responsável pelo Laboratório de Parasitologia do Departamento de Medicina Veterinária. Teve, ainda, a orientação do Dr. Dário Jorge Costa Santinha, diretor clínico do Hospital Veterinário de Loulé, e do Dr. José Carlos de Sousa, médico veterinário municipal da Câmara Municipal de Lagos.

A informação relativa à casuística, acompanhada na componente do estágio curricular realizada no Hospital Veterinário de Loulé, visou a obtenção de competências profissionais na área de medicina de pequenos animais e será exibida em tabelas apresentadas em anexo. A informação anexada abrange os valores somatórios das frequências absolutas e frequências relativas em percentagem por espécie, no que respeita à casuística médica e cirúrgica acompanhada. No referido Hospital realizaram-se também as análises hematológicas e citológicas, com obtenção de registos fotográficos de achados clínicos referentes aos animais em estudo para esta dissertação.

A presente dissertação está organizada em quatro partes: compreende um capítulo sumário de parasitologia, referente às espécies diagnosticadas no grupo de animais em estudo, um capítulo descritivo dos princípios básicos da alergologia veterinária, no que respeita às temáticas dermatite atópica canina, ácaros do pó e de armazenamento, diagnóstico alérgico e hipótese da higiene. Esta dissertação compreende ainda um capítulo dedicado à imunologia veterinária, no qual são enunciados princípios gerais de imunoalergologia e imunoparasitologia. Por fim, o último capítulo diz respeito ao estudo realizado no canil municipal de Lagos, a um grupo de vinte cães, no qual se pretendeu avaliar a sensibilização dos animais a um grupo de ácaros do pó e de armazenamento, através da realização de testes intradérmicos, e averiguar a correlação desses dados com os diagnósticos parasitológicos realizados no grupo. Esta correlação permitirá averiguar sobre a correspondência das respostas imunitárias a parasitas e na doença alérgica.

Esta dissertação foi elaborada com o auxílio das ferramentas informáticas Microsoft Office 365, Microsoft Word e Analysis ToolPak (Microsoft Excel®), Zotero 5.0.71, MedCalc 19.0.5 e GraphPad InStat 3.10.

I. Parasitologia veterinária

Serve o presente capítulo para sumariar as espécies de parasitas importantes na elaboração desta dissertação, com principal enfoque na sua caracterização, contemplando aspectos gerais da sua biologia, patogenia, diagnóstico e terapêutica.

1. Parasitas protozoários

Protozoários são organismos unicelulares eucariontes que pertencem ao reino Protista. Possuem organelos celulares, núcleo, retículo endoplasmático, mitocôndria, complexo de Golgi, lisossomas, rodeados por membrana celular, podendo ainda apresentar estruturas flagelares, membrana ondulante ou cílios, o que lhes permite a locomoção e obtenção de nutrientes por endocitose (Taylor *et al.*, 2015; Saari *et al.*, 2018).

Alguns protozoários infetam os canídeos através de vetor artrópode e muitos protozoários provocam infecções crônicas, devido à coevolução entre os parasitas e o sistema imunitário do indivíduo (Lopes *et al.*, 2012; Saari *et al.*, 2018).

1.1 Filo Apicomplexa

1.1.1 *Hepatozoon canis*

O protozoário *Hepatozoon* sp. pertence à classe Conoidasida, ordem Adeleorina e família Hepatozoidae (Taylor *et al.*, 2015).

Das mais de 300 espécies conhecidas de *Hepatozoon*, existem duas cujo hospedeiro vertebrado obrigatório é o cão, nomeadamente, *Hepatozoon canis*, de distribuição cosmopolita e *H. americanum*, referido por Zajac & Conboy (2012) como limitado ao sudeste dos Estados Unidos da América.

Apresenta um ciclo de vida heteroxeno, com diferentes formas de desenvolvimento e reprodução no hospedeiro vertebrado e invertebrado. A fase de reprodução assexuada, que decorre no hospedeiro vertebrado, inclui a merogonia seguida de gametogonia. No hospedeiro invertebrado ocorre a fase de reprodução sexuada, seguida de esporogonia. No sangue periférico dos canídeos podem observar-se os gamontes de *H. canis*, morfológicamente alongados, elipsoidais, rodeados por membrana, com núcleo excêntrico alongado, medindo 8-12 µm de comprimento por 3-6 µm de largura, visíveis em microscopia ótica em esfregaço sanguíneo corado com Diff Quick ou Giemsa, no citoplasma de leucócitos (neutrófilos e monócitos). Os esquizontes deste protozoário, quistos parasitários, com 30 µm de diâmetro médio, podem ser encontrados encapsulados nos tecidos por histopatologia ou citologia de linfonodos, baço e medula óssea e agregam no seu interior dois a quatro macromerozoitos ou mais de 20 micromerozoitos, com núcleo definido (Zajac & Conboy, 2012; Taylor *et al.*, 2015; Saari *et al.*, 2018).

O animal infeta-se após ingerir o hospedeiro invertebrado, ixodídeo portador de esporozoítos. Os ixodídeos *Rhipicephalus sanguineus* ou *Ixodes spp.* transmitem *H. canis*, enquanto que *H. americanum*, é transmitido por *Amblyomma maculatum*. Após a ingestão, os

esporozoítos penetram a mucosa digestiva do animal e infetam monócitos e macrófagos, que transferem os esporozoítos para linfonodos, baço, medula óssea e, eventualmente, fígado, rins e pulmões, onde se desenvolvem esquizontes e decorre a reprodução assexuada num processo denominado esquizogonia, que culmina com a libertação de merozoítos que penetram nos neutrófilos. O ixodídeo infeta-se quando se alimenta destas formas presentes no sangue do hospedeiro, após o que ocorre a gametogonia, fase de reprodução sexuada, de que resulta o zigoto, cuja maturação (esporogonia) culmina no oocisto, o qual contém esporozoítos e que permanece na cavidade corporal do ixodídeo (Zajac & Conboy, 2012; Taylor *et al.*, 2015; Mehlhorn, 2016; Saari *et al.*, 2018).

No que concerne à patogenia da hepatozoonose, a infeção por *H. canis* pode apresentar uma sintomatologia subclínica, podendo ocorrer manifestação clínica apenas quando associada a doença concomitante, consistindo em sinais inespecíficos de letargia, febre, apetite caprichoso, perda de peso, anemia e linfadenomegalia. Quando a parasitémia é elevada pode desenvolver-se hepatite, pneumonia e glomerulonefrite (Taylor *et al.*, 2015; Saari *et al.*, 2018).

A terapêutica para esta infeção consiste na administração pela via subcutânea (SC) de imidocarb na dose de 5 mg/kg de peso, a cada 14 dias, até que não se verifique parasitémia no esfregaço sanguíneo, e pode complementar-se com a administração oral (PO) de doxiciclina na dose de 5 mg/kg de peso, uma vez por dia (SID), durante 7 dias. A terapêutica, contudo, pode não ser curativa, ocorrendo uma eliminação parcial dos organismos. No entanto, uma parasitémia baixa constitui um bom prognóstico (Bowman, 2013; Mehlhorn, 2016).

1.1.2 *Cystoisospora* spp.

O protozoário *Cystoisospora* spp. pertencente à classe Sporozoea, subclasse Coccidia, ordem Eucoccida e família Eimeriidae. Anteriormente denominado *Isospora* spp. foi submetido a revisão taxonómica e reclassificado baseado na ausência de corpo de Stieda nos seus esporocistos, o que ocorre nas espécies parasitas de mamíferos (Barta *et al.*, 2005; Bowman, 2013; Taylor *et al.*, 2015; Mehlhorn, 2016).

As espécies que parasitam os canídeos são *Cystoisospora canis* (syn. *Isospora canis*), *C. ohioensis* (syn. *I. ohioensis*), *C. burrowsi* (syn. *I. burrowsi*) e *C. neorivolta*, sendo que estas duas últimas podem representar a mesma espécie, como refere Dubey (2019). Os oocistos podem ser identificados por microscopia ótica após técnica coprológica de flutuação, observando-se paredes lisas, de forma elipsoide e encontrando-se não esporulados nas amostras fecais frescas, visualizando-se apenas uma célula, o esporonte. O oocisto de *C. canis* mede cerca de 38-51 x 27-39 µm e as restantes espécies medem cerca de 17-27 x 15-24 µm. Todavia, desconhecem-se as dimensões do oocisto de *C. neorivolta* (Zajac & Conboy, 2012; Dubey, 2019).

O cão pode infetar-se após a ingestão de oocistos esporulados presentes no meio ou após a ingestão de esquizontes em hospedeiros paraténicos. Praticamente todos os cachorros nos primeiros meses de vida são infetados por *Cystoisospora* sp, independentemente das

condições sanitárias do local em que se encontrem. No intestino ocorre a libertação dos esporozoítos que formam vacúolos parasitóforos no epitélio do hospedeiro, o esquizonte. Após a sua maturação e ruptura do vacúolo são libertos os merozoítos que invadem células vizinhas. Ocorrem três gerações de esquizogonia no ciclo de vida de *C. canis*, o que promove a perda de epitélio associada à sintomatologia típica das coccídioses. A fase endógena de *C. ohioensis* ocorre à superfície do epitélio dos enterócitos, enquanto que nas espécies *C. burrowsi* e *C. neorivolta* ocorre no tecido subepitelial do hospedeiro (Bowman, 2013; Mehlhorn, 2016; Dubey, 2019).

A subsequente fase reprodutiva sexuada é designada gametogonia, na qual se formam os gametócitos. Após a fecundação forma-se o zigoto, culminado na libertação de oocistos não esporulados nas fezes do hospedeiro. Após a esporulação (fase de esporogonia), que ocorre no exterior, o oocisto possui dois esporocistos elipsoidais, contendo quatro esporozoítos cada (Taylor *et al.*, 2015; Mehlhorn, 2016; Saari *et al.*, 2018).

A sintomatologia inclui diarreia, apatia, dor abdominal, anorexia e perda peso, em casos severos, pode ocorrer anemia e diarreia sanguinolenta, durante 1-7 dias e morte pela destruição massiva do epitélio intestinal (Zajac & Conboy, 2012; Mehlhorn, 2016).

A terapêutica de eleição consiste na administração de toltrazuril na dose de 10 mg/kg, PO, SID, durante 4-5 dias; ou sulfadimetoxina na dose de 55 mg/kg, na primeira administração, e na dose de 27,5 mg/kg, SID, nos quatro dias seguintes, ou até dois dias após a remissão dos sintomas (Mehlhorn, 2016).

1.2 Filo Sarcocystidophora

1.2.1 *Leishmania infantum*

O protozoário *Leishmania* spp. pertence à subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophorea, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae. Existem mais de 50 espécies de *Leishmania*, sendo que pelo menos 12 delas parasitam o cão. A espécie *Leishmania infantum* destaca-se pela sua importância médico-veterinária e risco zoonótico, sendo um parasita intracelular obrigatório que infeta principalmente macrófagos (Bozza *et al.*, 2012; Saari *et al.*, 2018).

Ao longo do seu desenvolvimento passa por dois tipos morfológicos, a forma amastigota e a forma promastigota. A forma amastigota, presente em macrófagos e no sistema reticuloendotelial de vários órgãos do hospedeiro vertebrado, é arredondada ou oval, com cerca de 2–6 µm de diâmetro, possui um núcleo, quinoplasto e um pequeno flagelo intracelular e anterior. Esta forma é ingerida pelo hospedeiro invertebrado, insetos flebotomíneos cujas espécies *Phlebotomus perniciosus* e *P. ariase* são as mais importantes em Portugal. No hospedeiro invertebrado transforma-se na forma promastigota, passível de ser inoculada no vertebrado quando o flebotomo se alimenta (Campino & Maia, 2010; Zajac & Conboy, 2012; Taylor *et al.*, 2015; Saari *et al.*, 2018).

A sintomatologia, que pode demorar meses ou anos a evidenciar-se, consiste em lesões cutâneas ou viscerais. Na forma cutânea verificam-se sobretudo lesões de dermatite ulcerativa. A forma visceral é uma reticuloendoteliose, caracterizada pela proliferação de lesões granulomatosas em vários órgãos, como o fígado, e verificando-se lesões imunopatológicas secundárias nos glomérulos renais, mucosa nasal, úvea ocular, alopecia periorcular, esplenomegália por congestão, hepatomegália com infiltração lipídica, infiltração de amastigotas em macrófagos, mielócitos e neutrófilos na medula óssea, anemia, trombocitopenia e adenopatia, sendo que os linfonodos numa fase inicial podem apresentar-se hiperplásicos, mas com a cronicidade da doença pode ocorrer a atrofia do seu córtex (Day, 2011; Bowman, 2013; Taylor *et al.*, 2015).

O diagnóstico pode ser realizado pela visualização das formas amastigotas em citologias coradas, obtidas de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de medula óssea, linfonodos ou baço, de citologias por aposição de lesões cutâneas e por sorologia, através da titulação de anticorpos, em testes de aglutinação direta, de imunofluorescência e de imunoabsorção enzimática (ELISA). O diagnóstico pode também ser realizado com recurso a técnicas de citometria de fluxo, ou por métodos de biologia molecular que detetam ácido desoxirribonucleico (ADN) específico, como a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) (Zajac & Conboy, 2012; Travi *et al.*, 2018).

Existem vários protocolos de controlo de leishmaniose, nomeadamente a administração de alopurinol na dose de 10 mg/kg, PO, duas vezes ao dia (BID), durante 6-12 meses, associada a antimoniato de meglumina na dose de 75-100 mg/kg, SID, durante 4-6 semanas; albendazol na dose de 10mg/kg, PO, SID, durante 30 dias; anfotericina B, na forma lipossomal, na dose de 3-3,3 mg/kg, via intravenosa (IV), três vezes por semana, até perfazer 3-5 tratamentos, ou na forma de produto lipídico, testando inicialmente com a dose de 0,5 mg/kg e depois a passar a 3-3,3 mg/kg, IV, cada 72-96 horas até se atingir a dose cumulativa de 15 mg/kg; miltefusina 2 mg/kg PO SID durante 28 dias, associado a alopurinol; por fim, o imunomodulador domperidona na dose de 0,5 mg/kg, SID, durante 30 dias a cada 4 meses (Plumb, 2011; Sabaté *et al.*, 2014; Travi *et al.*, 2018).

Torna-se importante referir, dado o interesse no controlo desta zoonose no principal reservatório, que foi demonstrada a existência de estirpes resistentes ao fármaco mais comumente utilizado para o controlo da infeção, o alopurinol. No entanto, representa maior risco de saúde pública o cão não diagnosticado, que o sujeito a tratamento de controlo, mesmo considerando as limitações terapêuticas verificadas atualmente (Yasur-Landau *et al.*, 2016; Miró & López-Vélez, 2018).

1.2.2 *Giardia* spp.

O protozoário *Giardia* spp. pertence à classe Zoomastigophora, ordem Diplomonadida e família Hexamitidae. Nos canídeos pode ocorrer infeção pelas seguintes espécies: *Giardia duodenalis* (*syn. G. intestinalis*, *syn. G. lamblia*) e *G. entérica*, que são espécies zoonóticas, e *G. canis*. De acordo com a sua biologia molecular, as espécies pertencentes ao género *Giardia* são

classificadas em genótipos de A a H, sendo predominantes nos canídeos os genótipos C e D, podendo encontrar-se também os genótipos B e AI, este último com carácter zoonótico (Ferreira *et al.*, 2011; Bowman, 2013;).

Ao longo do seu desenvolvimento passa por duas formas, trofozoítos e quistos. O trofozoíto é achatado bilateralmente, simétrico, piriforme a elipsoidal, mede cerca de 12-15 µm de comprimento por 5-9 µm de largura, é convexo dorsalmente e apresenta concavidade ventral com função de disco suctório; possui ainda quatro pares de flagelos, dois núcleos anteriores e discos suctórios, adaptados para aderir às microvilosidades da mucosa do intestino delgado e cólon. Certas condições ambientais estimulam a sua libertação e, à medida que percorre o intestino grosso, ocorre o seu enquistamento, que consiste na formação por exocitose de uma parede resistente, contendo elementos filamentosos e quitina, o que lhe confere resistência e permite a multiplicação dos dois núcleos. Para além dos quistos com quatro núcleos, pode ocorrer a libertação de trofozoítos nas fezes, especialmente quando diarreicas, estes últimos são bastante frágeis e pouco resistentes no ambiente. A infeção do hospedeiro pode ocorrer por ingestão de quistos, a partir do meio ambiente (Zajac & Conboy, 2012; Bowman, 2013; Taylor *et al.*, 2015; Mehlhorn, 2016; Saari *et al.*, 2018).

A patogenia depende do estado imunitário do indivíduo, o que significa que a giardiose canina pode ser assintomática ou provocar diarreia por má absorção, que pode ser aguda, intermitente, crónica, e eventualmente acompanhada por dor abdominal, náuseas, vômitos e anorexia, verificando-se a sintomatologia mais exuberante nos animais mais jovens ou imunodeprimidos. Nas infeções crónicas podem ocorrer sequelas dermatológicas, oculares, articulares e a nível do sistema nervoso central. As infeções latentes colocam outros animais e humanos em risco (Zajac & Conboy, 2012; Cotton *et al.*, 2015; Mehlhorn, 2016).

Para a identificação diagnóstica de trofozoítos ou quistos de *Giardia* sp., recomenda-se que as amostras fecais sejam observadas até 30 minutos após a colheita e não refrigeradas, tendo em consideração que os quistos colapsam com a maioria das soluções de flutuação utilizadas, sendo a solução mais indicada a de sulfato de zinco a 33%, pela especificidade da sua densidade. A observação ao microscópio ótico deve ser realizada sob ampliação de 400x. Algumas formas parasitárias podem ser evidenciadas através de esfregaço fecal direto. No entanto, como a quantidade fecal utilizada é muito reduzida, a sensibilidade é proporcionalmente baixa. Outros métodos de diagnóstico incluem a pesquisa de anticorpos, por imunofluorescência direta (*gold standard*), com maior sensibilidade quando há alteração da mucosa, caso contrário podem verificar-se falsos negativos, pesquisa de antígenos (ELISA, imunofluorescência indireta) e deteção de material antigénico fecal por PCR (Zajac & Conboy, 2012; Mehlhorn, 2016; Beer *et al.*, 2017).

O tratamento médico consiste na administração de um dos seguintes protocolos: febendazol na dose de 50 mg/kg, PO, SID, 3-5 dias; ronidazol na dose de 30-50 mg/kg, PO, BID, durante 7 dias; nitazoxanida na dose de 75 mg/kg, a cada 14 dias. A utilização de metronidazol deve ser evitada pelo risco de seleção de estirpes resistentes e pelos possíveis efeitos

secundários, nomeadamente disfunções neurológicas e digestivas (Mehlhorn, 2016; Moron-Soto *et al.*, 2017; Saari *et al.*, 2018).

2. Parasitas helmintes

2.1 Filo Nematoda

Os nematodas são dos organismos multicelulares mais abundantes no mundo, ainda que a maioria não seja patogénica. Na sua morfologia são parasitas bilateralmente simétricos, cilíndricos, longos, possuem pseudoceloma e dimorfismo sexual (Roberts & Janovy, 2008).

2.1.1 *Ancylostomatinae*

A subfamília *Ancylostomatinae* refere-se a ancilostomatídeos da classe Secernentea, ordem Strongylida e família Ancylostomatidae. As espécies com potencial zoonótico são *Ancylostoma brasiliense* e *A. caninum*, podendo desencadear nos humanos uma enterite eosinofílica ou larva migrans cutânea (Roberts & Janovy, 2008; Zajac & Conboy, 2012; Bowman, 2013; Taylor *et al.*, 2015).

Os adultos da espécie *Uncinaria stenocephala* possuem uma cápsula bucal larga, afunilada, com um par de lâminas cortantes. Os machos adultos medem cerca de 5-8,5 mm e as fêmeas 7-12 mm de comprimento. O macho possui uma bolsa copuladora bem desenvolvida, que apresenta um pequeno lobo dorsal e dois lobos laterais separados com espículas delgadas. Os adultos de *A. caninum* diferem dos anteriores a nível de dimensões, medindo os machos cerca de 12 mm e as fêmeas cerca de 15-22 mm de comprimento. Outra diferença entre as espécies reside na cavidade bucal, apresentando *A. caninum* três pares de ganchos e uma capacidade elevada de hematofagia (Bowman, 2013; Taylor *et al.*, 2015; Saari *et al.*, 2018).

Os ovos de ancilostomatídeos são detetados por métodos coprológicos de flutuação e são morfologicamente idênticos, de forma elíptica, casca lisa, contendo uma mórula. A diferença entre espécies reside no tamanho, medindo o *Ancylostoma* spp. cerca de 52-79 x 28-58 µm, enquanto que a *U. stenocephala* mede cerca de 71-92 x 35-58 µm (Zajac & Conboy, 2012).

A transmissão de *A. caninum* pode ocorrer por via transmamária e transplacentária, pela ingestão da larva filaróide presente no ambiente ou em hospedeiros paraténicos mas principalmente por via percutânea. A transmissão de *U. stenocephala* ocorre por ingestão da larva filaróide ou de hospedeiros paraténicos, sendo rara a transmissão pela via percutânea, que, quando ocorre, inviabiliza a maturação na forma adulta (Zajac & Conboy, 2012; Saari *et al.*, 2018).

No que respeita à patogenia de *A. caninum*, ocorrem três fases. Na fase cutânea, a larva penetra até à derme e provoca uma reação local a nível dos capilares; a fase pulmonar ocorre quando as larvas saem dos capilares alveolares para os alvéolos e progridem dos brônquios para a traqueia; por último, na fase intestinal, fixam-se à mucosa do intestino delgado, geralmente no duodeno, mudando frequentemente o seu posicionamento no hospedeiro. Devido à secreção de substâncias anticoagulantes provocam micro hemorragias nos locais de fixação anteriores.

Cerca de duas semanas após a ingestão das larvas, ou um mês após a transmissão via percutânea, ocorre a libertação de ovos nas fezes do hospedeiro (período pré-patente). No entanto, nem todas as larvas se desenvolvem, algumas, invadem o tecido muscular estriado ou a parede intestinal e entram em hipobiose, sendo reativadas no período peri-parto (Roberts & Janovy, 2008; Bowman, 2013).

Por outro lado, na espécie *U. stenocephala* não ocorre migração traqueal e os parasitas permanecem no duodeno, fixando-se à mucosa através do seu par de lâminas (Saari *et al.*, 2018).

A sintomatologia provocada por *A. caninum* é particularmente visível em cachorros, ocorrendo a deterioração do seu estado geral na segunda semana de vida, podendo verificar-se anemia severa, hipoproteinémia, diarreia sanguinolenta e morte, consoante a carga parasitária. No que respeita à sintomatologia provocada por *U. stenocephala*, decorrente das lesões provocadas nas microvilosidades intestinais, pode ocorrer uma anemia ligeira, hipoalbuminémia, diarreia, anorexia e letargia quando estão presentes cargas parasitárias muito elevadas (Zajac & Conboy, 2012; Bowman, 2013; Saari *et al.*, 2018).

A terapêutica médica pode consistir na administração de nitroscanato, numa administração única de 50 mg/kg, de pirantel numa administração de 5 mg/kg, de febendazol na dose de 50 mg/kg, SID, durante três dias, flubendazol na dose de 22 mg/kg em administração única, levamisole na dose de 5 mg/kg, mebendazol, moxidectina, selamectina ou emodepside. Recomenda-se que às fêmeas cuja ninhada faleceu, na gestação seguinte sejam desparasitadas com febendazol na dose anteriormente indicada, diariamente, desde o dia 40 da gestação, até ao dia 14 do pós-parto, uma vez que os desparasitantes habitualmente utilizados são ineficazes contra as larvas presentes nos tecidos, que permanecem viáveis para migração para o tecido mamário aquando da lactação. Uma cadela, exposta a apenas uma infeção, terá capacidade de transmitir o ancilostomatídeo durante três lactações às ninhadas futuras (Bowman, 2013; Mehlorn, 2016).

2.1.2 *Trichuris vulpis*

A espécie *Trichuris vulpis* (syn. *Trichocephalus vulpis*) pertence à classe Secernentea, ordem Trichocephalida, superfamília Trichuroidea e família Trichuridae. O adulto esbranquiçado mede cerca de 4,5-7,5 cm de comprimento e possui uma porção posterior larga que afila abruptamente até à porção anterior filiforme, penetrando esta última na mucosa do intestino grosso, subepitelialmente, para que ocorra a hematofagia. A extremidade posterior do macho é espiralada, com uma espícula envolvida por bainha retrátil (Roberts & Janovy, 2008; Saari *et al.*, 2018).

O ciclo de vida é direto e a infeção ocorre por ingestão dos ovos com a forma larvar infeciosa. Após a ingestão, a larva eclode e penetra as criptas intestinais do intestino delgado, onde permanece cerca de 2-10 dias, antes de migrar até ao lúmen do ceco e cólon, local de reprodução e postura de ovos, após um período pré-patente de cerca de 3 meses. Os ovos

embrionam e tornam-se infetantes no meio exterior, em cerca de um a dois meses (Bowman, 2013; Saari *et al.*, 2018).

Os ovos castanho-dourados, de dimensões que variam de 72-90 µm por 32-42 µm, apresentam a forma característica de limão de casca lisa e grossa, com dois opérculos polares transparentes. A sua observação por microscopia ótica após a aplicação de técnicas coprológicas de flutuação, permite o diagnóstico definitivo (Zajac & Conboy, 2012; Bowman, 2013).

Tem como hospedeiros o cão, a raposa e o gato, nos quais as infeções podem ser assintomáticas, ligeiras ou causar colites hemorrágicas, quando a carga parasitária é elevada. A sintomatologia clínica, quando presente, consiste em diarreia aquosa e por vezes sanguinolenta, anemia e perda de peso. A infeção humana pode ocorrer, ainda que com alguma raridade (Zajac & Conboy, 2012; Taylor *et al.*, 2015).

O tratamento médico é realizado mediante a administração de febendazol, milbemicina oxima, febantel, emodepsida, oxantel ou moxidectina, uma vez por mês durante três meses. A reinfeção é controlada através do melhoramento no maneiio sanitário (Bowman, 2013; Saari *et al.*, 2018).

2.1.3 *Toxocara canis*

O *Toxocara canis* pertence à classe Secernentea, ordem Ascaridida, superfamília Ascaridoidea e família Toxocaridae. É um parasita cosmopolita de coloração branca a creme, tendo os machos uma dimensão de cerca de 10 cm e as fêmeas cerca de 18 cm. A cabeça é elíptica, devido às asas cefálicas, e a boca é rodeada por três lábios. A terminação posterior do macho apresenta um apêndice digitiforme (Roberts & Janovy, 2008; Bowman, 2013; Taylor *et al.*, 2015; Mehlhorn, 2016; Saari *et al.*, 2018).

A forma de infeção mais importante no cão é a via transplacentária, seguida pelas vias transmamária, pela ingestão de ovos ou de hospedeiros paraténicos. Nos animais jovens verifica-se a migração larvar entero-hepato-pneumo-traqueo-entérica, as larvas migram através do fígado, coração e sistema respiratório até à faringe, onde são deglutidas para o trato digestivo, onde maturam. Após as 16 semanas de vida, não ocorre migração pelo sistema respiratório, a migração é somática, dispersando-se o parasita por várias localizações do hospedeiro onde podem enquistar e entrar em hipobiose (Zajac & Conboy, 2012; Saari *et al.*, 2018).

Esta espécie tem importância zoonótica, podendo manifestar-se em humanos como larva *migrans* visceral, ocular ou neurológica, consoante a localização das larvas ou os locais de migração (Zajac & Conboy, 2012).

O diagnóstico parasitológico ocorre pela visualização microscópica de ovos após técnica coprológica de flutuação. Os ovos possuem uma casca rugosa espessa, com uma célula que se observa granular e escura, medindo cerca de 85-90 x 75 µm (Zajac & Conboy, 2012; Taylor *et al.*, 2015).

A toxocarose é uma patologia importante em cachorros, podendo provocar sintomatologia respiratória e digestiva, nados-mortos, morte neonatal, nos adultos ocorrem infecções geralmente assintomáticas (Zajac & Conboy, 2012; Bowman, 2013; Saari *et al.*, 2018).

A desparasitação interna deve ser iniciada às duas semanas de vida, e repetida a cada duas semanas até que os cachorros atinjam os três a seis meses de idade, sendo indicada a administração de milbemicina oxima. Para prevenir a transmissão materna, as fêmeas gestantes devem ser desparasitadas diariamente com febendazol na dose de 50 mg/kg, desde o 40º dia de gestação ao 14º dia pós-parto. Em alternativa, pode ser administrada ivermectina, na dose de 1 mg/kg, nos 20º e 42º de gestação, ou moxidectina a 1%, na dose de 1 mg/kg, nos 40º e 55º dias de gestação (Bowman, 2013; Saari *et al.*, 2018).

2.1.1 *Dirofilaria immitis*

A espécie *Dirofilaria immitis* pertence à classe Secernentea, ordem Spirurida, superfamília Filarioidea, família Onchocercidae e subfamília *Dirofilarinae*. Os adultos localizam-se no ventrículo direito, átrio direito, artéria pulmonar e veia cava caudal, com dimensões que se aproximam dos 15-30 cm. Se a carga parasitária for leve, os canídeos podem permanecer assintomáticos, mas se a parasitemia for elevada, pode ocorrer obstrução do sistema circulatório, provocando hipertensão pulmonar, que é compensada por hipertrofia ventricular direita, que, por sua vez, promove a insuficiência cardíaca congestiva direita. Para além disto, pela excreção de produtos parasitários e morte dos parasitas pode também ocorrer endocardite, endarterite valvular e embolismo pulmonar. Importante fazer referência à bactéria *Wolbachia*, a qual desempenha um papel importante na patogenia da dirofilariose. *Wolbachia* é uma Rickettsia simbiote de várias espécies de filarídeos. As suas colónias encontram-se à superfície das filárias, são essenciais à embriogénese e maturação de *D. immitis* e promovem a deposição de complexos imunes (anticorpos-antígenos bacterianos) causadores de lesões a nível renal e pulmonar. Resumidamente, a sintomatologia da dirofilariose consiste em apatia, perda de condição corporal, intolerância ao exercício, tosse com hemoptise e, nas fases mais avançadas, pode ocorrer dispneia, edemas, ascite e a morte do animal (Genchi *et al.*, 2011; Bowman, 2013; Taylor *et al.*, 2015; Saari *et al.*, 2018).

O desenvolvimento larvar ocorre no hospedeiro intermediário e a transmissão das microfilárias tem lugar aquando da refeição do *Culex* sp. no hospedeiro definitivo. Atingem a forma adulta a nível cardíaco, onde os adultos podem reproduzir-se e sobreviver até cinco anos. A microfilarémia, resultante da reprodução sexuada e consequente libertação de microfilárias, surge 6-9 meses após a infeção do hospedeiro e a permanência destas no sangue periférico permite a sua ingestão pelo hospedeiro intermediário aquando da sua refeição (Bowman, 2013; Mehlhorn, 2016).

O diagnóstico definitivo pode ser realizado através de visualização ao microscópio ótico de microfilárias em esfregaço sanguíneo, existindo várias técnicas que permitem aumentar a baixa sensibilidade deste teste, tais como os métodos de concentração teste de Knott modificado

e teste de filtração. Podem também ser utilizados testes de detecção antigénica, de maior sensibilidade, como o teste ELISA (Bowman, 2013; Mehlhorn, 2016; Saari *et al.*, 2018).

Está indicado como tratamento médico a administração de doxiciclina na dose de 10 mg/kg, PO, BID, durante quatro semanas, para eliminação da bactéria simbiótica *Wolbachia*, reduzindo os efeitos secundários do tratamento e aumentando a sua eficácia. O adulticida indicado é a melarsomina na dose de 2,5 mg/kg, IM, sendo repetida após um mês, em duas administrações espaçadas de 24 horas. Como microfilaricida, utilizam-se lactonas macrocíclicas cerca de dois meses antes do tratamento adulticida. Alternativamente, a administração mensal de imidaclopride a 10% associada a moxidectina a 2,5%, juntamente com a administração de doxiciclina na dosagem descrita anteriormente, é um protocolo igualmente eficaz na eliminação de dirofilárias adultas e microfilarémia. Quando o animal desenvolve a síndrome da veia cava caudal, pode efetuar-se tratamento cirúrgico (Scheffers *et al.*, 2013; Meireles, *et al.*, 2014; Saari *et al.*, 2018; Genchi *et al.*, 2019).

2.1.2 *Onchocerca lupi*

O *Onchocerca lupi* pertence à classe Secernentea, ordem Spirurida, superfamília Filarioidea, família Onchocercidae e subfamília *Onchocercinae* (Zajac & Conboy, 2012; Bowman, 2013; Taylor *et al.*, 2015).

O conhecimento do seu ciclo de vida permanece sob investigação. Estudos recentes apontam para que o hospedeiro invertebrado seja a espécie hematófaga *Simulium tribulatum* ou as espécies do complexo de *S. vittatum* e que o cão seja o reservatório natural deste parasita. Este nematoda causa onchocercose ocular, induzindo doença aguda ou crónica caracterizada por conjuntivite, fotofobia, epífora, exoftalmia e lesões nodulares perioculares de 0,3-0,7 cm de dimensão, nos hospedeiros vertebrados canídeos, felídeos e humanos. O diagnóstico é possível por biópsia de pele da área frontal periocular, sedimentação e observação das microfilarías ao microscópio ótico, com cerca de 100 µm, ou dos adultos, nos quais se destaca a presença de cutícula de duas camadas, a interna estriada transversalmente e a externa com proeminências específicas que se acentuam com a maturação. Adicionalmente, foi desenvolvido teste PCR para o diagnóstico de *O. Lupi* (Otranto *et al.*, 2012; Otranto *et al.*, 2013; Hassan *et al.*, 2015; Komnenou *et al.*, 2016; Latrofa *et al.*, 2018; Verocai *et al.*, 2018).

O tratamento da onchocercose é cirúrgico, com a remoção dos granulomas conjuntivais e seguido de tratamento médico pós-cirúrgico. Um protocolo consiste na administração de melarsomina 2.5 mg/kg, IM, SID, repetidos em dois dias consecutivos, ivermectina 50 µg/kg, SC, uma vez por mês, após o tratamento com melarsomina, antibioterapia tópica e prednisolona sistémica. Esta é uma adaptação do protocolo terapêutico da dirofilariose canina surte algum efeito na onchocercose ocular, mas pode verificar-se a recorrência da sintomatologia meses após o tratamento. Estudam-se atualmente novos protocolos médicos que, associados ao tratamento cirúrgico, têm melhorado o prognóstico desta patologia, como sendo a conjugação de ivermectina (na dose de 400 µg/kg, PO, SID) e doxiciclina (na dose de 10-100 mg/kg, PO, SID) durante vários meses (Otranto *et al.*, 2015).

2.2 Classe Cestoda

Os cestodes pertencem ao filo Platyhelminthes, correspondendo a parasitas cujo corpo parenquimatoso é achatado dorsoventralmente, segmentado e desprovido de celoma. A absorção de nutrientes ocorre por histofagia, através do tegumento. O corpo dos cestodes consiste em escólex, pescoço e estróbilo. O estróbilo é constituído por inúmeros proglotes que contêm os órgãos sexuais masculinos e femininos, tendo capacidade de autorreprodução ou reprodução cruzada. Os novos segmentos são formados a nível do pescoço, ocorrendo distalmente a maturação dos segmentos mais antigos, os grávidos, ocupados por útero e ovos embrionados, libertam-se juntamente com as fezes. Após a sua desintegração são libertos os ovos (Bowman, 2013; Saari *et al.*, 2018).

2.2.1 *Dipylidium caninum*

O *Dipylidium caninum* pertence à ordem Cyclophillidea, família Dilepididae. Quanto à sua morfologia, pode atingir os 50 cm de comprimento, possui escólex com quatro ventosas e rostelo retrátil, com quatro ou cinco camadas de ganchos. Os proglotes são facilmente reconhecíveis quando presentes nas fezes, apresentam uma forma alongada, assemelhando-se a bagos de arroz largo ou a pevides de pepino, possuindo dois conjuntos de órgãos genitais, com um poro de abertura em cada margem, têm cerca de 12 X 3 mm e movimentos autónomos. Os ovos são amarelo-acastanhados, quase esféricos, contêm um embrião hexacanto, medem cerca de 25-50 µm e podem encontrar-se livres ou dentro de cápsula ovígera, sendo que cada cápsula pode conter até 30 ovos (Bogitsh *et al.*, 2012; Bowman, 2013; Taylor *et al.*, 2015).

O adulto não é patogénico e várias centenas de parasitas são tolerados pelo hospedeiro sem que ocorra sintomatologia clinicamente relevante, apenas prurido perianal devido ao movimento dos proglotes (Taylor *et al.*, 2015).

O ciclo de vida de *D. caninum*, requer um hospedeiro intermediário, *Pulex* sp., *Ctenocephalides* sp. ou *Trichodectes canis*, que ingira ovos, no caso das pulgas durante a sua fase larvar. O animal infeta-se com a ingestão do artrópode, após a libertação do cisticercoide no intestino delgado, onde desenvolve a maturidade sexual em cerca de 20 dias (Bogitsh *et al.*, 2012).

O diagnóstico é realizado pelo reconhecimento dos proglotes e visualização ao microscópio ótico.

O tratamento médico pode ser realizado com administrações de praziquantel, epsiprantel ou nitroscanato. Por outro lado, deve ser realizado o controlo do hospedeiro intermediário (Saari *et al.*, 2018).

3. Parasitas ixodídeos

As carraças são ectoparasitas hematófagos obrigatórios, com dimorfismo sexual, que se alimentam em hospedeiros vertebrados e são importantes vetores de agentes que podem provocar doenças protozoárias, virais e bacterianas. A sua posição sistemática é a seguinte: filo

Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acarina, superfamília Ixodoidea. Existem cerca de 700 espécies na família Ixodidae, distribuídas por 12 géneros (Bowman, 2013; Taylor *et al.*, 2015).

3.1 *Rhipicephalus sanguineus*

A cosmopolita espécie *Rhipicephalus sanguineus* pertence à família Ixodidae e subfamília *Rhipicephalinae* (Metaestriata). Pode ser vetor da *Babesia canis* (agente da piroplasmose canina), *Ehrlichia canis* (erliquiose monocítica canina), *Rickettsia rickettsii* (febre maculosa das montanhas rochosas) e *Hepatozoon canis* (hepatozoonose) (Bowman, 2013; Saari *et al.*, 2018; Nicholson *et al.*, 2019).

Quanto à sua morfologia, a sua coloração é amarela, avermelhada ou acastanhada. Os adultos medem de 3 a 12 mm, com palpos e hipostoma curtos e base do capitulo em forma hexagonal. O primeiro par de coxas tem dois esporões e as pernas tornam-se gradualmente mais largas dos pares anteriores para os posteriores. O sulco anal é posterior e estende-se medialmente. Os machos possuem escudos adanais e acessórios. As larvas de seis pernas são pequenas e castanhas claras, enquanto que as ninfas de oito pernas são avermelho-acastanhadas. Possui olhos e festões e o escudo não é ornamentado (Bowman, 2013; Taylor *et al.*, 2015; Nicholson *et al.*, 2019).

Esta espécie tem um ciclo de três hospedeiros, ocorrendo a reprodução no hospedeiro. Após fertilização, a fêmea alimenta-se cerca de 14 dias, liberta-se do hospedeiro para depositar 4000-5000 ovos em locais abrigados, de onde eclodem as larvas passados 17-30 dias. As larvas alimentam-se durante seis dias, libertam-se do hospedeiro e no solo realizam a muda para ninfas em cerca de 5-23 dias. Por sua vez, as ninfas realizam refeições sanguíneas durante 4-9 dias após o que ocorre no solo a muda para a forma adulta. Todo o ciclo pode ocorrer em apenas dois meses, caso as condições sejam favoráveis. Caso não se alimentem, possuem uma longevidade no ambiente de, designadamente, as larvas até 34 dias, ninfas até 40 dias e os adultos até 385 dias (Dantas-Torres *et al.*, 2012; Bowman, 2013; Taylor *et al.*, 2015).

A infestação por ixodídeos pode provocar anemia, dor e edema no local de hematofagia, absorção de toxinas, infeções secundárias e míases (Bowman, 2013).

Recomenda-se o tratamento profilático periódico com acaricidas, principalmente na medida em que reduz o risco de doenças secundárias associadas, e controla a sua prevalência. Em Portugal, foi referido que a formulação ectoparasiticida mais utilizada é a combinação de imidaclopride a 10% e permetrina a 50%. No entanto, McCall *et al.* (2004) demonstraram que não se verifica o suposto efeito sinérgico entre ambas as substâncias, sendo a sua aplicação menos eficaz do que, por exemplo, a utilização única de imidaclopride. Existem inúmeras substâncias acaridas no mercado e vários relatos das crescentes resistências verificadas. As recomendações atuais focam-se, sobretudo, na sensibilização dos tutores para a importância da aplicação de medidas de controlo nos animais e no ambiente, respeitando as doses e tempos de ação definidos para o ectoparasiticida utilizado, removendo imediatamente os ixodídeos

presentes no animal e procedendo à eliminação cuidadosa dos mesmos (Coles & Dryden, 2014; European Scientific Counsel Companion Animal Parasites, 2016; Pereira *et al.*, 2016).

II. Alergologia veterinária

As afeções alérgicas em animais são económica e clinicamente significantes. As manifestações de hipersensibilidade tipo I em canídeos são urticária, angioedema e anafilaxia, consistindo a dermatite alérgica à picada da pulga e a dermatite atópica canina, as condições alérgicas caninas mais prevalentes. Outras afeções que se podem verificar nos canídeos alérgicos são a dermatite alérgica de origem alimentar, a dermatite por *Malassezia* e a dermatite de contacto (Day & Schultz, 2011; Martins *et al.*, 2016).

Nos próximos capítulos será realizada uma abordagem sumária da dermatite atópica canina, assim como dos ácaros domésticos, geralmente envolvidos na patogenia desta afeção, dando especial enfoque às espécies utilizadas nos testes intradérmicos para a elaboração desta dissertação. Serão referidos os princípios teóricos do diagnóstico alergológico, que será complementado com informação adicionada no capítulo referente à imunologia. Por fim, será descrita a hipótese da higiene, salientando-se algumas interpretações correntes, como importante base para compreender o rumo teórico que tem guiado investigadores na construção do conhecimento em alergologia veterinária.

1. Dermatite Atópica Canina

A dermatite atópica canina (DAc) é uma das dermatoses mais frequentes em cães. É uma patologia dermatológica complexa, que consiste numa resposta inflamatória, prurítica, que se desenvolve na sequência de uma predisposição genética para reações alérgicas a alergénios ambientais, sendo mediada por imunoglobulina E (IgE) (DeBoer, 2013; Bizikova *et al.*, 2015; Favrot, 2015; Martins, 2018).

Paralelamente, existe outra condição dermatológica que apresenta sintomatologia clínica sobreponível à DAc, diferindo desta por não ser possível documentar a resposta imunomediada por IgE, nem por métodos sorológicos, nem por testes intradérmicos, pelo que foi denominada de dermatite do tipo atópico ou *Atopic-like Dermatitis* (AID) (DeBoer, 2013).

Não existem sinais patognomónicos de DAc e a diversidade de apresentações clínicas impossibilitam o diagnóstico completo. Recorrendo à anamnese e exame do estado geral, podem

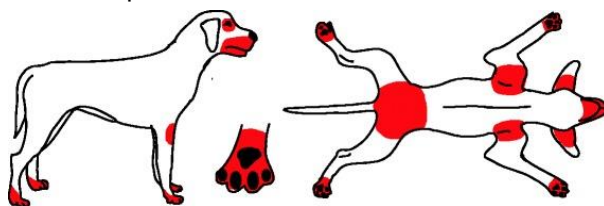


Figura 1 – Mapa da distribuição mais comum das lesões e prurido associado a dermatite atópica canina (adaptado de Hensel *et al.*, 2015).

verificar-se lesões com apresentação localizada ou generalizada, agudas ou crônicas, e possivelmente a ocorrência de infecções secundárias. Na Fig. 1 está evidenciada a distribuição mais comum das lesões de DAC, ocorrendo tipicamente nos membros, a nível perioral, periocular, abdominal ventral, região axilar e face interna dos pavilhões auriculares. Nestes locais podem ocorrer os sinais clínicos mais consistentes desta afeção, como eritema, verificando-se, por vezes, erupções eritematosas maculares ou papulares, alopecia, excoriações, hiperpigmentação e liquenificação (Bizikova *et al.*, 2015; Favrot, 2015; Hensel *et al.*, 2015).

Para dirigir a interpretação de achados dermatológicos coincidentes com a distribuição das lesões inflamatórias e pruríticas representadas na Fig. 1, no sentido do diagnóstico de DAC, devem ser utilizados os critérios de Favrot (2000), cujo grau de observação determina diferentes níveis de sensibilidade e especificidade (Hensel *et al.*, 2015), conforme identificado na tabela 1:

Tabela 1 – Os dois conjuntos de critérios de Favrot para o diagnóstico de dermatite atópica canina (adaptado de Favrot, 2010, referido por Hensel *et al.*, 2015).

Critérios para o diagnóstico de CAD	Utilização	Fiabilidade
<p>Conjunto de critérios I:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Início dos sinais antes dos 3 anos de idade 2. Predominantemente <i>indoor</i> 3. Prurido responsivo a corticosteroides 4. Infecções fúngicas crônicas ou recorrentes 5. Membros anteriores afetados 6. Afeção das faces internas dos pavilhões auriculares 7. Margens dos pavilhões auriculares não afetadas 8. Região dorsolombar não afetada 	Estudos clínicos, farmacológicos e epidemiológicos.	<ul style="list-style-type: none"> • 5 critérios: Sensibilidade 85.4% Especificidade 79.1% • 6 critérios: Sensibilidade 58.2% Especificidade 88.5%
<p>Conjunto de critérios II:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Início dos sinais antes dos 3 anos de idade 2. Predominantemente <i>indoor</i> 3. Prurido alesional inicial 4. Membros anteriores afetados 5. Afeção das faces internas dos pavilhões auriculares 6. Margens dos pavilhões auriculares não afetadas 7. Região dorsolombar não afetada 	Diagnóstico provável de CAD; utilizar métodos diagnósticos complementares e excluir diagnósticos diferenciais.	<ul style="list-style-type: none"> • 5 critérios: Sensibilidade 77.2% Especificidade 83% • 6 critérios: Sensibilidade 42% Especificidade 93.7%

A lista de diagnósticos diferenciais para esta condição é extensa, pelo que devem ser excluídas outras prováveis doenças pruríticas, através da realização de exames dermatológicos complementares, tais como, entre outros, otoscopia, citologias dermatológicas de aposição ou por raspagem, tricogramas e provas culturais, que permitem confirmar ou descartar outras etiologias ou a ocorrência de infecções secundárias, como por exemplo, por *Staphylococcus* sp., *Malassezia* sp. ou ectoparasitoses, como infestação por pulgas, sarna sarcóptica, demodicose, otocariose, pediculose, trombiculose, assim como outras condições alérgicas, tais como

dermatite alérgica à picada de pulga, hipersensibilidade à picada de insetos, dermatite de contato, hipersensibilidade alimentar e neoplasias como o linfoma cutâneo (Martins *et al.*, 2008; Hensel *et al.*, 2015; Martins *et al.*, 2016; Martins, 2018).

Em suma, o diagnóstico de DAC pressupõe a exclusão de dermatites por ectoparasitas, a presença de mais de quatro critérios de Favrot, a exclusão de outros possíveis componentes alérgicos, designadamente de origem alimentar, e avaliação de possíveis complicações microbianas, seguido da realização de testes alergénicos, que permitem o diagnóstico definitivo e que serão seguidamente abordados com maior detalhe. Aqueles, permitem identificar as fontes alergénicas a que o indivíduo se encontra sensibilizado e possíveis desencadeadores da patologia (Martins *et al.*, 2008; Favrot, 2015).

A melhor profilaxia consiste na evicção do contacto com as espécies a que o animal é alérgico. No entanto, por ser frequentemente muito difícil e, tendo em conta que a extensão das lesões aquando do diagnóstico implica medidas terapêuticas visando a normalização imunitária, a remissão sintomatológica e a reconstrução da barreira cutânea, o tratamento de DAC requer terapêutica médica mista – dermatológica e imunológica (Martins, 2018).

Se, no passado, a terapêutica para esta condição consistia sobretudo na administração de glucocorticoides, orais ou injetáveis, cuja utilização pode promover inúmeros efeitos secundários e síndrome de resistência aos glucocorticoides, com o surgimento da imunoterapia tornou-se possível reduzir a sua utilização. No que respeita às apresentações farmacológicas que permitiram a redução do uso de glucocorticoides sistémicos, destacam-se: i) a ciclosporina, um dos primeiros imunomoduladores, inibidor da calcineurina; ii) o aceponato de hidrocortisona, um glucocorticoide de ação tópica; iii) o oclacitinib, um inibidor da Janus kinase, enzima responsável pela ativação da via de transdução do sinal indutor do prurido nas células nervosas sensoriais, e iv) o lokivetmab, o primeiro anticorpo monoclonal caninizado, anti-interleucina (IL)-31 (Olivry & Banovic, 2019).

Visando a remissão da sintomatologia na fase reativa, em que a sintomatologia se deve a uma complexa resposta inflamatória desencadeada pelo contacto com os alérgenos, o animal beneficia de tratamento médico de efeito rápido e sistemicamente abrangente, sendo indicado o uso de glucocorticoides de curta ação, por via oral. Quando a inflamação cutânea diminui, pode substituir-se o glucocorticoide pela administração de oclacitinib, como inibidor da resposta pruriginosa. Em todo o caso, após a identificação das espécies alergénicas implicadas na DAC, é vivamente aconselhado o recurso a imunoterapia alérgico-específica (ASIT), uma terapia que, ao recondicionar a resposta imunitária, visa alterar o padrão de resposta imunitária, de forma curativa. Nesta fase de indução da mudança no padrão imunológico, o recurso a glucocorticoides de ação tópica nos locais afetados e ao lokivetmab constitui uma opção frequente e muito vantajosa (Olivry & Banovic, 2019).

2. Ácaros domésticos

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Classe Arachnida

Subclasse Acari

Ordem Sarcoptiformes

Famílias Acaridae, Glycyphagidae e Pyroglyphidae

Os alérgenos envolvidos na dermatite atópica canina (DAC), e causa frequente de reações alérgicas, são sobretudo de origem ambiental, sendo os mais significativos os ácaros do pó e de armazenamento. Estão identificadas mais de 250 espécies de ácaros responsáveis por problemas de saúde em humanos e animais. As respostas alérgicas a ácaros podem ocorrer por contacto direto com a pele, inalação, ou por ingestão. No entanto, as propriedades intrínsecas ou extrínsecas que tornam uma proteína alérgica permanecem desconhecidas, supondo-se que algumas atividades enzimáticas possam ser a base da capacidade, ainda não documentada, para induzir uma resposta alérgica (Martins *et al.*, 2008; Brazis, 2011; Moya *et al.*, 2016; Mullen & OConnor, 2019).

O corpo dos ácaros está dividido em gnatosoma, com pedipalpos e quelíceras, e idiossoma, a porção remanescente que suporta as pernas e olhos (se presentes). Os pedipalpos segmentados são apêndices sensitivos. Os ácaros adultos possuem quatro pares de pernas enquanto as ninfas têm apenas três pares. Os sistemas respiratórios incluem ductos traqueais para permitir as trocas gasosas ao longo do corpo, sendo que a presença de espiráculos e a sua localização fornecem pistas taxonómicas para a sua identificação. A morfologia de alguns dos ácaros aqui referidos pode ser observada nas Fig. 2, 3 e 4 (Mullen & OConnor, 2019).

Em Portugal vários autores referiram a ocorrência de ácaros do pó e de armazenamento nas cidades de Coimbra, Lisboa, Funchal, Leiria, Santarém e Setúbal, nomeadamente, *Dermatophagoides pteronyssinus*, prevalentes em todas aquelas cidades, e, em Lisboa, foram identificadas adicionalmente as espécies *Euroglyphus maynei*, *Acarus siro*, *Tyrophagus putrescentiae* e *Lepidoglyphus destructor* (Pinhão & Grácio, 1978; Loureiro *et al.*, 1990; Grácio & Quinta, 2000; referidos por Colloff, 2009).

A nova nomenclatura de ácaros domésticos foi proposta para substituir ácaros do pó e de armazenamento, no *The Third International Workshop on indoor allergens and asthma*. Os alérgenos dos ácaros domésticos, ou do pó e de armazenamento, são divididos em grupos relacionáveis e identificados pelas primeiras três letras do género e primeira letra da espécie. Der p 1 e Der f 1 correspondem ao grupo 1 de alérgenos de *Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae*, respetivamente. Já foram identificados mais de 18 diferentes alérgenos de *Dermatophagoides* sp. Para além destas divisões, existem grupos alérgicos denominados

major e *minor*, conforme reconhecidos sorologicamente por mais ou menos de 50% dos pacientes atópicos. Para os humanos, os grupos 1 e 2 são considerados os alergénios *major* mais importantes, enquanto que para canídeos, os grupos *major* são 15 e 18, alergénios de elevados pesos moleculares, que como a maioria dos alergénios *major* em canídeos, apresentam pesos moleculares > 80 kDa (Nuttall *et al.*, 2008).

Quando se testa um determinado extrato alergénico desconhecem-se quais os grupos presentes na solução comercial, exceto se especificamente purificados e quantificados, sendo que essa informação pode ser obtida através da técnica eletroforese em gel de poliacrilamida presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), que identifica as bandas correspondentes pelos diferentes pesos moleculares, permitindo a sua distinção (Nuttall *et al.*, 2008; Moya *et al.*, 2016).

2.1 *Dermatophagoides pteronyssinus*

O *Dermatophagoides pteronyssinus*, pertence à família Pyroglyphidae, é o ácaro do pó causador de alergia em humanos, mais prevalente, e cresce no habitat doméstico, preferencialmente a temperaturas de aproximadamente 25° e humidade relativa acima de 60%. Encontra-se abundantemente no pó doméstico, particularmente à superfície de colchões, tapetes e sofás, produzindo os mais potentes alergénios presentes no pó doméstico. O *D. pteronyssinus* consome células descamativas de humanos, ao contrário do *D. farinae*, que consome principalmente bactérias e fungos, verificando-se em estudos de prevalência, que o alergénio Der p 1 tem maior prevalência no habitat doméstico, tanto de cães atópicos como de saudáveis, quando comparado com o alergénio Der f 1 (Moya *et al.*, 2016; Assunção *et al.*, 2017; Mullen & OConnor, 2019).

Geralmente, os cães apresentam reatividade cutânea baixa aos testes intradérmicos realizados a *D. pteronyssinus*, ao contrário do que ocorre nos humanos. No entanto, embora não seja um alergénio frequentemente reconhecido por canídeos, é possível que na patogenia canina de DAC, ocorra influência do grupo Der p 1, *minor* no desenvolvimento da sensibilização e promoção de resposta imunitária a outros alergénios (Nuttall *et al.*, 2008; Moya *et al.*, 2016).

No que respeita às particularidades de cada grupo alergénico *minor* salientam-se: i) Der p 1, com 222 aminoácidos, é uma protease cisteínica de pequeno peso molecular, nomeadamente, 25 kDa, é sensível ao calor, pH e redução, mas estável no ambiente doméstico, com semivida de 10 anos; ii) Der p 2, com 129 aminoácidos, sendo um polipeptídeo de 14 kDa, estável ao calor e pH mas susceptível à redução; iii) Der p 3, 6 e 9, proteases serínicas, com capacidade enzimática *in vitro* para autoclivagem apresentando bandas de 17-30 kDa; iv) Der p 4, com atividade semelhante à α -amilase; v) Der p 5, um polipeptídeo de 113 aminoácidos, cuja atividade biológica é desconhecida; vi) Der p 11, uma proteína com 113 aminoácidos, de 103 kDa, homóloga da paramiosina, que permite a degradação de vários produtos; ainda que o Der p 11 seja considerado como *major* em medicina humana, e tendo em conta o seu elevado peso molecular, não foram encontrados estudos que o considerem um alergénio *major* em canídeos (Nuttall *et al.*, 2008).

Os alergénicos *major* Der p 15 e 18 são proteínas do tipo das quitinases, pertencentes a um grupo enzimaticamente inativo, relacionado com a digestão de nutrientes pelos ácaros e que induzem desgranulação mediada por IgE, nos indivíduos sensibilizados e alérgicos. Parecem não ocorrer reações cruzadas entre Der p 18 e outros alergénios do tipo das quitinases. O Der p 15 possui uma arquitetura semelhante ao Der p 18, mas uma homologia de apenas 27% (Resch *et al.*, 2016).

2.2 *Dermatophagoides farinae*

Esta espécie tem preferência por ambientes mais secos do que *D. pteronyssinus*, sendo designada o ácaro do pó doméstico americano. Encontra-se frequentemente nos alimentos secos para animais, carpetes e chão seco, onde consome principalmente bactérias e fungos (Mullen & OConnor, 2019).

Os alergénicos conhecidos são Der f 1-4, 6-8, 10, 11, 13-18, 20-22 e 24-33. No que respeita à atividade biológica e suas características, salienta-se que: i) o Der f 1 é uma proteinase cisteínica de 223 aminoácidos e baixo peso molecular (20-30 kDa); ii) o Der f 2 é constituído por



Figura 2 – Vista ventral de fêmea de *Dermatophagoides farinae* (adaptado de Mullen & OConnor, 2019).

polipeptídeos de <20kDa e 129 aminoácidos; iii) outros alergénios que também apresentam baixos pesos moleculares são os Der f 3, 5, 6 e 7; iv) por outro lado, com pesos moleculares superiores, encontramos o Der f 4 (56-60 kDa), o Der f 10 (60-65 kDa) e, destacando-se por participar na degradação enzimática de vários produtos, o Der f 11 (92-98 kDa), o Der f 16 (55 kDa), uma gelosina ácida com 480 aminoácidos, que pertence a um grupo de proteínas reguladoras de actina do citoesqueleto e o Der f 17 (53 kDa).

Os grupos *major* para o cão são enzimas digestivas, designadas quitinases – Der f 15 (97-109 kDa) e Der f 18 (60 kDa), estão presentes no sistema digestivo dos ácaros, com função digestiva importante para o ácaro, enquanto os grupos *minor* descritos se encontram nas fezes produzidas pelos ácaros. Os alergénios Der f 15 e 18 foram os primeiros alergénios *major* descritos para os canídeos, tendo sido documentadas taxas de reconhecimento de IgE específicas (sIgE) na ordem dos 95% e 57-77% respetivamente (McCall *et al.*, 2001; Nuttall *et al.*, 2008; Cunha *et al.*, 2012; Moya *et al.*, 2016; Mueller *et al.*, 2016; Resch *et al.*, 2016; Olivry *et al.*, 2017).

Ocorrem múltiplas isoformas que podem estar associadas a polimorfismo espontâneo da sequência alergénica de aminoácidos e/ou a glicosilação variável e estes polimorfismos parecem influenciar a sua imunogenicidade no indivíduo (Thomas *et al.*, 2004; Nuttall *et al.*, 2008).

Em suma, cães atópicos sensibilizados a *D. farinae* demonstram maior reatividade a grupos alergénicos de elevado peso molecular e, entre os anteriormente referidos, inclui-se o recentemente identificado Zen-1 (Olivry *et al.*, 2017).

2.3 *Acarus siro*

O *Acarus siro* é o mais importante ácaro de armazenamento, um cosmopolita encontrado em cereais processados, onde causa degradação consoante o teor de matéria seca. Com dimensões que variam entre os 350-650 µm, reproduz-se a temperaturas de 24-32° C e a humidades relativas superiores a 60%. Pertence à família Acaridae, subfamília *Acarinae*, tal como o *Tyrophagus* sp. É predador

de vida livre que se pode alimentar de outros ácaros, fungos ou pequenos artrópodes em produtos armazenados. Os ácaros de armazenamento infestam cereais, produtos lácteos desidratados, frutos secos, camas de animais, entre outros. Em humanos, pode provocar acariose pulmonar, sob certas condições de exposição, já tendo sido identificado no exsudado brônquico (tal como *D. farinae* e *D. pteronyssinus*) (Mullen & OConnor, 2019).

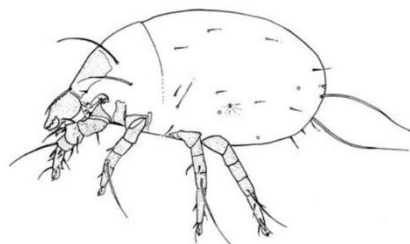


Figura 3 – Fêmea de *Acarus siro* (adaptado de Mullen & OConnor, 2019).

2.4 *Lepidoglyphus destructor*

O *Lepidoglyphus destructor* é um ácaro de armazenamento, comumente encontrado no pó doméstico, pertencente à família Glycyphagidae. Conhecem-se alergénios Lep d dos grupos 2, 5, 7, 10 e 13 (Thomas *et al.*, 2004; Nuttall *et al.*, 2008; Mullen & OConnor, 2019).

2.5 *Tyrophagus putrescentiae*

Este é um ácaro de armazenamento comum e cosmopolita, da família Acaridae, que contamina alimentos com elevados teores de proteína e gordura, alimentando-se de fungos e sendo, por isso conhecido como o ácaro do bolor. Pode completar o seu ciclo de vida em duas semanas, sob condições ótimas. A sensibilização a este ácaro está relacionada com lesões alérgicas peribucais (Nuttall *et al.*, 2008; Mullen & OConnor, 2019).

2.6 *Euroglyphus maynei*

Este ácaro do pó, cosmopolita, pertence à mesma família taxonómica Pyroglyphidae do género *Dermatophagoides* spp., mas a uma subfamília diferente, a *Pyroglyphinae*. Os seus requerimentos de habitat consistem em teores de humidade elevados, encontrando-se preferencialmente em colchões e roupa de cama (Mullen & OConnor, 2019).

São conhecidos os grupos (Eur m) 1, 2, 3, 4 e 14, com homologia de até 90% a *Dermatophagoides* spp., constatando-se no entanto, baixa ocorrência de reações cruzadas antigénicas (Thomas *et al.*, 2004; Nuttall *et al.*, 2008).

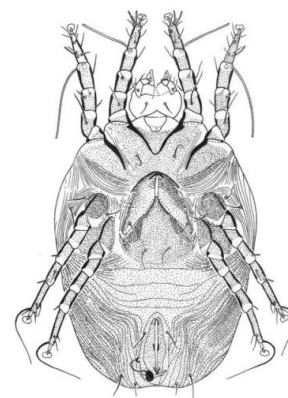


Figura 4 – Vista ventral de fêmea *Euroglyphus maynei* (adaptado de Mullen & OConnor, 2019).

3. Diagnóstico alergológico

Os meios complementares *gold standard* para o diagnóstico dos alergénios envolvidos na patologia de DAC são os testes intradérmicos (TID) que avaliam a reatividade dermatológica do indivíduo por exposição seletiva ao alergénio, e a quantificação sorológica de IgE específicas de alergénio, como sendo pelo teste imunoenzimático ELISA ou por teste *radioallergosorbent* (RAST). Qualquer um destes testes, conjuntamente com a presença dos critérios mínimos de Favrot, discutidos anteriormente, permitem o diagnóstico definitivo de DAC, e adicionalmente, permitem identificar quais os alergénios envolvidos na patogenia, designadamente, o espectrotipo, possibilitando formular uma ASIT adequada ao indivíduo (Martins *et al.*, 2008; Hammerberg, 2013; Hensel *et al.*, 2015).

Os testes cutâneos são um método de pesquisa de sIgE *in vivo*. Existem duas variantes que detetam reações de hipersensibilidade mediada por IgE, nomeadamente, o TID e o teste cutâneo por picada (SPT), sendo este último mais utilizado em medicina humana (Martins *et al.*, 2008).

Os testes *in vitro*, permitem quantificações precisas. A quantificação sorológica de IgE total (IgEt) não é um procedimento diagnóstico habitual em medicina veterinária, por apresentar variabilidade substancial de correlação questionável com a apresentação clínica. No entanto, o rácio sIgE/IgEt é relevante, podendo apresentar um valor preditivo para o prognóstico terapêutico (Day, 2013; Hammerberg, 2013; Martins *et al.*, 2016).

Por outro lado, as afeções alérgicas evoluem frequentemente para infeções secundárias bacterianas, às quais a terapêutica requer a utilização de antimicrobianos, contribuindo para o aumento na ocorrência de estirpes resistentes, o que se afigura como uma importante problemática de saúde pública, no contexto de *One Health*, sendo que o manejo terapêutico deve ser idealmente específico de alergénio, de modo a não prejudicar a resposta imunitária aos desafios infecciosos. Para que tal aconteça, é essencial a realização do diagnóstico alergénico definitivo, aferindo o agente etiológico (Day, 2013; Martins, 2018).

Futuramente, esperam-se desenvolvimentos no que respeita a métodos complementares de diagnóstico, demonstrando-se promissores os doseamentos da proteína eosinofílica catiónica, teste de ativação de basófilos, teste de libertação de histamina e teste de transformação linfoblástica. A imunofenotipagem surge-nos igualmente como um conceito interessante, baseado no paradigma da polarização resposta imunitária Th1/Th2, que permitirá a utilização de mediadores biológicos ativos para a manipulação terapêutica do sistema imunitária (Martins *et al.*, 2016).

Voltaremos a abordar a temática dos testes alergológicos no capítulo relativo à imunologia.

4. Hipótese da Higiene

Em 1989, um epidemiologista britânico, David Strachan, verificou um aumento na prevalência de rinite alérgica, asma e eczema em crianças e efetuou uma análise estatística desse aumento, em função de 16 variáveis ambientais e socioeconómicas. Os resultados que obteve suportaram a ideia de que, na infância, fase de maturação do sistema imunitário, as infecções transmitidas por irmãos mais velhos, potenciadas por condições sanitárias inferiores, tinham um efeito protetor contra o desenvolvimento de doenças alérgicas. Nas três décadas prévias à publicação do estudo de Strachan, a diminuição no tamanho da família, o aumento das condições gerais domésticas e os crescentes padrões higiénicos, pareciam ter contribuído para uma crescente expressão clínica de patologias atópicas. À medida que a prevalência de doenças infecciosas diminuía, fruto da intervenção profilática, terapêutica médica e melhores condições sanitárias, especulou-se que a redução na prevalência infecciosa poderia prejudicar os sistemas imunitários, justificando-se, desse modo, o aumento exponencial na prevalência de patologias alérgicas e autoimunes, verificada sobretudo nos países desenvolvidos. Surgia, assim, a designada “hipótese da higiene” (Strachan, 1989; Scudellari, 2017).

Mais recentemente, esta teoria continua em discussão, com algumas adaptações. Vários autores referem que as interações do indivíduo, de cariz genética, com o ambiente, podem contribuir para o desenvolvimento de reações imunes lesivas, como a autoimunidade e a alergia, e estudos epidemiológicos apontam para a crescente prevalência de processos alérgicos nos países industrializados em detrimento dos países em desenvolvimento. Paralelamente, ocorreu a necessidade de redefinir a hipótese da higiene, após o desenvolvimento do conhecimento imunológico, porque se compreende que a exposição precoce ao microbioma e a algumas espécies de parasitas, educa o sistema imunitário imaturo a reagir apropriadamente a estímulos, sendo, portanto, benéfica. Porém, a diminuição nos padrões de higiene consiste numa medida nefasta ao indivíduo, uma vez que potencia a infeção por agentes patogénicos (Maizels, 2009; McSorley & Maizels, 2012; Bloomfield *et al.*, 2016; Scudellari, 2017; Langgartner *et al.*, 2019).

Em 2003, a hipótese da higiene seria aperfeiçoada pela “hipótese dos velhos amigos”, a qual afirmava que a reduzida exposição aos agentes imunorreguladores, que ocorre na sociedade moderna atual, aumenta a atividade imunológica e inflamatória, culminando no desenvolvimento de diversas patologias, com o surgimento de patologias alérgicas, autoimunidade e, inclusive, perturbações emocionais e diminuição na resiliência face ao stress. A redução na exposição rotineira a parasitas, nos países socioeconomicamente avançados, é tida como um risco acrescido para o aumento de doenças imunomediadas e embora seja aceite que existe uma correlação negativa entre infeção por helmintes e patologia alérgica, algumas espécies de parasitas podem ter um efeito benéfico no controlo de inflamações consideradas aberrantes, enquanto outras espécies podem exacerbar a sintomatologia alérgica (Smits *et al.*, 2010; Elliott & Weinstock, 2012; Cruz *et al.*, 2017; Langgartner *et al.*, 2019).

Existe outra adaptação da hipótese da higiene, denominada “hipótese das mudanças”, que defende que o aumento na prevalência de patologias alérgicas se deverá a reações

cruzadas. A principal característica do estilo de vida moderno é a mudança, existindo um aumento na diversidade de alérgenos “novos”, o que possibilita uma maior ocorrência de reações cruzadas com os alérgenos “velhos” (pólen, epitélio de animais, fungos, ácaros). Portanto, pode haver uma associação entre infestações por helmintos nas sociedades tradicionais e baixa prevalência de patologia atópica, uma vez que os parasitas podem representar um indicador de “estabilidade no estilo de vida”, isto é, pouca mudança. Nesta teoria defende-se que o sistema imunitário não é insuficientemente estimulado, como defendido pela hipótese da higiene, é estimulado de forma diferente. E, tendo em conta que não existe IgE não específica, apenas IgE relativamente à qual não conhecemos a especificidade, pois o sistema imunitário desenvolve uma “imagem” do seu ambiente e a IgE classificada como não específica, possivelmente será um somatório de toda a diversidade de sIgE. Assim, existindo em quantidades abaixo do limite detetável ($\approx 0,1$ kU/L), quanto maior a diversidade de IgE, maior será a possibilidade de ocorrência de reações cruzadas, com o consequente aumento da população de mastócitos sensibilizados. Nesta perspetiva, quando os helmintos induzem um aumento na IgE_t, a ligação da sIgE a mastócitos e basófilos é reduzida. Perspetivando, de forma exemplificativa, ir-se-á fixar uma IgE anti-helminte, ocupando o ligando celular onde, na ausência dessa resposta IgE específica para parasita, a ligação poderia ocorrer, por exemplo, a uma IgE anti-ácaro, diminuindo a oportunidade de reação de libertação de histamina (e de outros mediadores pro-inflamatórios) aquando da prevalência de alérgenos ambientais, aos quais o indivíduo se encontra sensibilizado, estabilizando a atividade específica alérgica e até reduzindo-a (Herbert, 2017).

Muitos autores tentaram aprimorar a hipótese da higiene, adicionando elementos com fundamento nos avanços no conhecimento imunológico. A teoria dos velhos amigos adicionou novos agentes como exercendo uma clara influência no desenvolvimento imunitário. A teoria da higiene também evoluiu, numa vertente, considerando a importância do condicionamento do sistema imunitário em tenra idade, imprimido pelo ambiente, e passando a considerar que as infeções por parasitas e bactérias comensais auxiliam na maturação imunitária, minimizando disfunções do sistema imunológico. Noutra vertente, inclui-se a ideia de ser possível “recalibrar” o sistema imunitário maduro pela exposição a agentes infecciosos (Maizels, 2019).

III. Imunologia Veterinária

1. Princípios gerais

Visando melhorar a eficiência diagnóstica de processos alérgicos, e para que o médico veterinário alergologista possua um conjunto de instrumentos que lhe permitam uma maior acuidade diagnóstica, com terapêuticas mais eficientes, é necessário aprofundar o conhecimento a nível dos mecanismos imunológicos moleculares envolvidos (Martins *et al.*, 2016). Neste capítulo iremos abordar aspetos fundamentais de imunologia veterinária, tendo em consideração a natureza do trabalho realizado para a elaboração desta dissertação.

A pele é a primeira linha de defesa do organismo, uma ferramenta importante do sistema imunitário inato. Associada às múltiplas características que tornam a pele numa barreira de defesa inata, esta participa no sistema imunitário adaptativo, através das células dendríticas (DC), apresentadores de antígeno a células T *helper* (Th). Se um antígeno atravessa a barreira cutânea, como quando um ixodídeo se alimenta no hospedeiro, as DC capturam o antígeno, processando-o para apresentação às Th, e as alterações na homeostase são comunicadas aos nuócitos, essenciais para o desencadear de uma resposta imunitária rápida e eficiente. Para além destas, os queratinócitos expressam moléculas da classe II do complexo maior de histocompatibilidade (MHC II), exercem função de células apresentadoras de antígeno e, em circunstâncias de lesão epitelial ou inflamação, induzem sinalização específica (Tizard, 2012).

O sistema imunitário inato é constituído por um conjunto de células leucocitárias, heteroproteínas séricas e intracelulares. Ao ser detetada uma ameaça ocorre sinalização, de modo a mobilizar macrófagos e granulócitos, os quais libertam proteínas antimicrobianas e metabolitos reativos, e, mobilizando células dendríticas, via nuócitos que ativam o sistema imunitário adaptativo, o processo culmina na proliferação de células T e B, reconhecedoras do antígeno específico (Maizels, 2009).

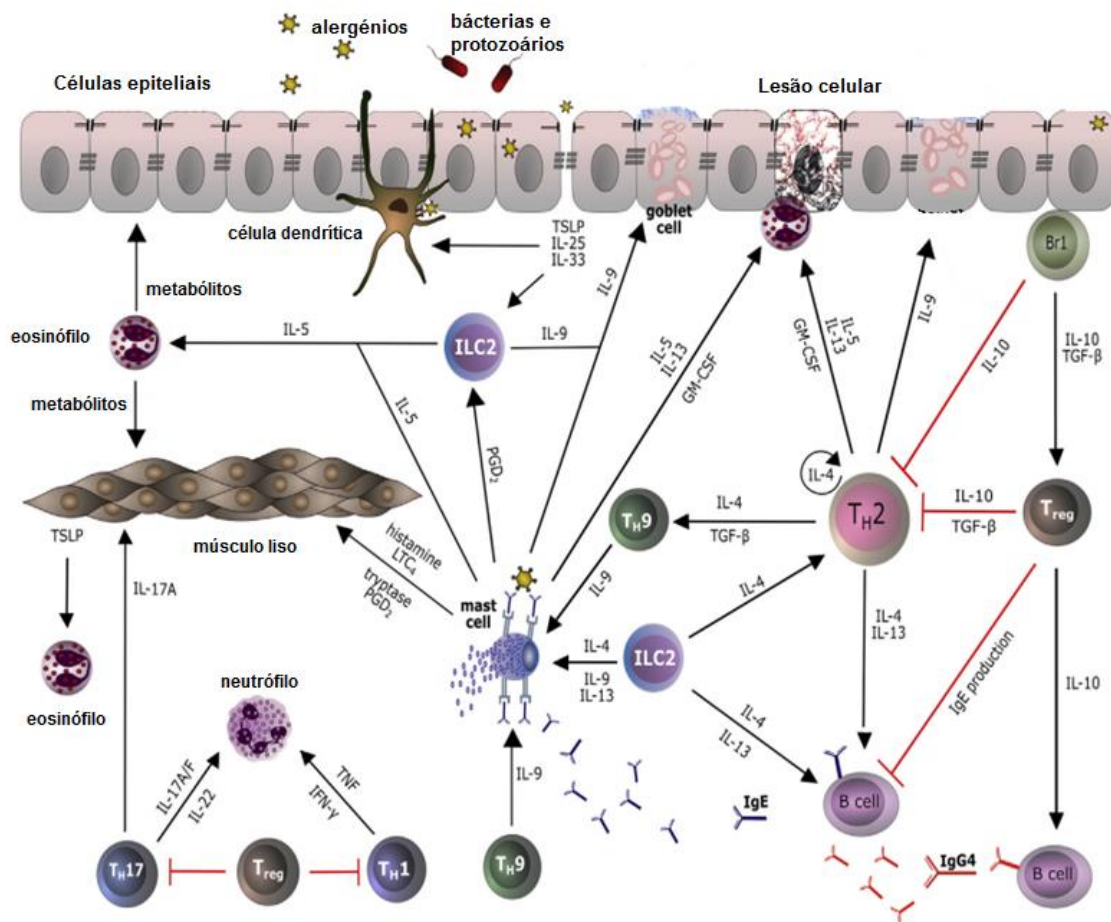


Figura 5 – Vias mediadoras na resposta inflamatória alérgica (adaptado de Akdis *et al.*, 2016).

Na pele, importante barreira físico-química e imunológica, existem diferentes tipos de células. As células apresentadoras de antígeno (APC), geralmente DC, expressando recetores de reconhecimento padrão (PRRs) ou recetores *toll-like* (TLR) que, quando detetam padrões moleculares associados a patógenos (PAMP), clivam as moléculas e formam complexos de histocompatibilidade, visando sinalizar os linfócitos. Quando as APC expressam MHC I, o sistema imune adaptativo promove a resposta de linfócitos T citotóxicos, expressando de *cluster* de diferenciação 4 (TCD8⁺), indutores da apoptose. Mas, por outro lado, se é apresentado o MHC II, proliferam as células B, diferenciam-se os linfócitos auxiliares expressando o *cluster* de diferenciação 4 (TCD4⁺) em Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, ou linfócitos T reguladores (Treg), designando-se este processo por polarização, esquematizado na Fig. 5, sendo que cada subtipo T promove o desenvolvimento de diferentes respostas inflamatórias (Huang, 2014; Akdis *et al.*, 2016).

Relativamente à barreira mucosa intestinal, importante barreira no que respeita à proliferação de parasitas gastrointestinais, possui uma camada mucosa secretora e o epitélio intestinal, que promove a retenção luminal do conteúdo antigénico, endógeno e exógeno, desencadeador de resposta gastrointestinal pro-inflamatória, na qual participa a resposta imunitária inata e adaptativa (Cotton *et al.*, 2015).

2. Imunoloalergologia

Imunologicamente classificam-se os mecanismos de hipersensibilidade nos tipos I, II, III ou IV, e doenças autoimunes. No que respeita à hipersensibilidade de tipo I, designada imediata por demorar cerca de 15 minutos a verificar-se, geralmente após a reexposição ao alérgeno no indivíduo sensibilizado, pressupõe uma fase de sensibilização e uma segunda fase de resposta (como se discutirá em detalhe nos subcapítulos 2.1 e 2.2). Esta resposta ocorre na superfície cutânea e mucosas, envolve a sinalização Th2, promoção de resposta imunitária humoral, com produção de IgE, *cross-linking* e desgranulação com libertação de mediadores biológicos ativos, podendo resultar em patologias de natureza atópica, as quais, na espécie humana costumam manifestar-se de três formas clínicas distintas, nomeadamente rinoconjuntivite alérgica, asma alérgica e dermatite atópica (Day & Schultz, 2011; Herbert, 2017).

A hipersensibilidade tipo II, uma resposta de citotoxicidade mediada por anticorpos, visa a destruição de células-alvo, sensibilizadas através de antígenos de superfície. Ocorre produção de IgG ou IgM e uma reação citotóxica associada, sendo o exemplo clássico a reação a transfusão sanguínea incompatível, em que aloanticorpos incompatíveis, específicos contra estruturas de grupo distinto, consideradas antigénicas, desencadeiam uma reação hemolítica aguda ou crónica. A hipersensibilidade de tipo III resulta da formação e deposição de complexos imunes, através da ativação do complemento, como ocorre na leishmaniose. A hipersensibilidade de tipo IV é mediada por células, ao contrário das anteriores, mediadas por anticorpos, sendo conhecida por hipersensibilidade tardia. Ocorrendo reexposição à molécula desencadeadora, as células Th1 libertam o factor inductor de interferão-gama (IFN- γ) e outras citocinas localmente, resultando na neoformação de vénulas, estimulação de adesinas vasculares, quimiotaxia Th,

macrófagos e granulócitos, sendo exemplos deste tipo de hipersensibilidade a alergia de contacto e o teste da tuberculina (Day & Schultz, 2011).

A doença alérgica é uma manifestação patológica de hipersensibilidade, quando ocorre uma sensibilização imunológica a um antígeno, geralmente inócuo, ou quando ocorre uma resposta imunitária excessiva à reexposição antigénica. A base para a ocorrência deste acontecimento é multifactorial, envolvendo uma predisposição genética. Quanto a este factor, ainda que a base molecular não esteja totalmente definida, aponta-se para alterações genéticas que se refletem em polimorfismos MHC e moléculas associadas a Th2. Outros factores associados, na base destas patologias, são a disfunção da barreira cutânea, facilitando a penetração em profundidade dos alérgenos e agentes patogénicos em geral, aumentando o risco de sensibilização e podendo desencadear a doença. Salienta-se, ainda, que patologias concomitantes podem interferir na polarização de linfócitos T (Day & Schultz, 2011; Marsella *et al.*, 2011; Chermprapai *et al.*, 2018; Martins, 2018).

2.1 Sensibilização

A sensibilização imunológica de um indivíduo ocorre por exposição repetida a um determinado alérgeno, o que pode resultar numa reacção de hipersensibilidade, base da doença alérgica, que apenas se expressa clinicamente caso ocorra a conjugação perfeita entre factores genéticos, influências ambientais e desregulação imunológica. Concorrem todos estes factores para condicionar a acção das células Treg, cuja atividade proporciona protecção contra a resposta exacerbada que caracteriza a patologia alérgica (Smits *et al.*, 2010; Day, 2013).

Os mecanismos de sensibilização do indivíduo por determinado alérgeno ocorre após o contacto intradérmico do alérgeno com PRRs ou com TLR da célula de Langerhans, que sinaliza a nuócitos, promotores, por acção da IL-13 na migração das DC para o sistema linfático, onde vão apresentar os péptidos alérgenos, através de MHC II, a uma célula TCD4⁺. Ocorre, então, a diferenciação TCD4⁺ em linfócito Th2 (Day, 2013; Abbas *et al.*, 2014; Lloyd & Snelgrove, 2018).

Na sequência das IL-4 e IL-13 produzidas pelos nuócitos e células Th2, a célula B alérgeno-específica ativa-se em plasmócito, sintetizador de IgE ou IgG específicas. As imunoglobulinas em circulação ligam-se a recetores de alta afinidade (FcεRI) na superfície de eosinófilos, basófilos, mastócitos e macrófagos tecidulares, tornando-se o indivíduo sensibilizado, ou seja, apto a desenvolver uma resposta de hipersensibilidade ou de imunotolerância, aquando do contacto subsequente com os antígenos sensibilizantes (Day, 2013; Abbas *et al.*, 2014; Akdis *et al.*, 2016).

Após a sensibilização, no indivíduo clinicamente normal pode ocorrer imunotolerância, devida à atuação inibitória das Treg, produtoras de IL-10. Porém, no indivíduo alérgico, cuja população de Treg se apresenta condicionada, ocorre a ativação inapropriada de células TCD4⁺ promovendo a resposta alérgica, via diferenciação Th2 (Day, 2013).

2.2 Resposta de hipersensibilidade do tipo I e polarização de célula T

Após a sensibilização, em contactos subsequentes com o alérgeno, os leucócitos estão revestidos de IgE, fixados aos FcεRI. Quando ocorre a ligação do epítopo do alérgeno às IgE, inicia-se o movimento físico do FcεRI, procurando uma segunda ligação FcεRI-alérgeno ou FcεRII-alérgeno (de baixa afinidade), para que ocorra uma ligação em ponte IgE, vulgarmente designada *cross-linking* como se observa na Fig. 6. Quando no mastócito se observa *cross-link IgE* desencadeia-se o mecanismo designado por hipersensibilidade de tipo I, com desgranulação e libertação de substâncias pró-inflamatórias, como a histamina, que promovem vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular, contração de músculo liso, edema tecidual, exocitose leucocitária e indução de prurido. O carácter imediato (minutos) após o contacto com o antigénio ambiental, que caracteriza este processo, define a natureza imediata desta forma de hipersensibilidade (Day, 2013; Abbas *et al.*, 2014; Herbert, 2017).

Apesar de ser um fenómeno imediato, este mecanismo inicial é seguido por uma resposta de hipersensibilidade tardia, que ocorre entre 4 a 24 horas após a resposta de hipersensibilidade imediata, havendo infiltração de eosinófilos, macrófagos e linfócitos Th2 (Day, 2013).

A magnitude da resposta alérgica é regulada por IL-10, IL-35 e TGF-β. Estas citocinas são produzidas por células Treg, linfócitos B reguladores (Breg), macrófagos e DC. A deficiência em IL-10 pode constituir o motivo pelo qual os indivíduos alérgicos não controlam eficazmente a diferenciação no sentido Th2, cuja resposta deveria ser suprimida por intermédio das células Treg (Day & Schultz, 2011; Tizard, 2012; Day, 2013; Akdis *et al.*, 2016).

A IL-31, interleucina-chave no desencadeamento do prurido, promove a inflamação e prurido, conjuntamente com a inibição do recetor vanilóide do tipo 1 (TRPV1) via Janus Kinase. Nos animais sensibilizados, aumenta a produção de IL-31, que é produzida maioritariamente por células Th2, no combate a endotoxinas bacterianas e alérgicas. Existem recetores para IL-31

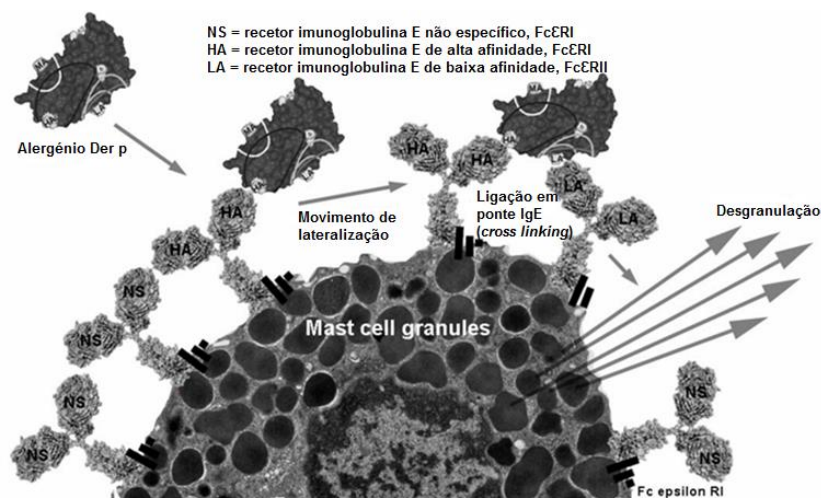


Figura 6 – Modelo de ligação em ponte (*cross-linking*) alérgeno a receptores de alta e baixa afinidade IgE e consequente desgranulação do mastócito (adaptado de Herbert, 2017).

nos monócitos, eosinófilos, basófilos, queratinócitos e em células neuronais relacionadas com a transmissão de sinalização para o prurido, via medula espinal (McCandless *et al.*, 2014; Akdis *et al.*, 2016; Fukuyama *et al.*, 2017; Martins, 2018).

Atingida a cronicidade, as células Treg são incapazes de diminuir a resposta ativa, predominando a diferenciação no sentido Th2 e Th9. A polarização para Th9 é despoletada pela IL-4 e concorre para perpetuar a cronicidade alérgica. A IL-9, produzida por nuócitos e células Th9, está associada a resposta alérgica tardia, imunologia tumoral, autoimunidade e infeções parasitárias (Day, 2013; Akdis *et al.*, 2016; Licona-Limón *et al.*, 2017).

2.3 Princípios imunológicos do diagnóstico alergológico

O *gold standard* para estabelecer o diagnóstico definitivo e a etiologia da dermatite alérgica consiste na identificação das espécies alergénicas que desencadeiam os sinais clínicos, por meio de provas de provocação, através da administração pelas vias i) intradérmica de extratos alergénicos padronizados (TID); ii) inalatória; iii) oral, ou iv) através da determinação sorológica de sIgE. A quantificação da IgEt, sobretudo na espécie humana, também é importante para o enquadramento de atopia. Fundamentalmente, realiza-se o diagnóstico alergológico, uma vez que o manejo terapêutico deve ser alérgico-específico, de forma a ser minimamente eficaz, em termos clínicos e a não condicionar a resposta imunitária face a desafios infecciosos (Day, 2013; Hammerberg, 2013).

A ativação de mastócitos presentes na derme, realizada através dos testes intradérmicos, demonstra a sensibilização aos extratos testados, pelo processo de desgranulação de mastócitos, dependente da especificidade e composição das IgE presentes. Em suma, a severidade da reação alérgica de tipo I corresponderá, em alguns casos, ao grau de desgranulação de mastócitos (Herbert, 2017).

A produção de IgE nos canídeos realiza-se maioritariamente a nível local, pelo que as concentrações séricas de sIgE ou de IgG podem não ser representativas do panorama imunitário real, ou seja, não se correlacionarão, necessariamente, com a doença clínica, como demonstrado repetidamente em vários ensaios. Outra justificação para a quantificação de baixas concentrações de IgE livre na circulação sanguínea é a alta afinidade dos FcεRI (Brazis, 2011; Day, 2013; Hammerberg, 2013; Herbert, 2017).

As propriedades de IgE mais relevantes são a especificidade, a atividade específica, a clonalidade e a afinidade. IgE “não-específica” representa cerca de 99% do IgEt, com a sIgE a representar cerca de 1%. A especificidade significa que o alvo antigénico é conhecido e pode detetar-se sIgE na ausência de alergia clínica, representando sensibilização com toterância ou significando a ausência de contacto com os alergénios em causa, por via desencadeadora. Por atividade específica entende-se o rácio de sIgE/IgEt, sendo um importante marcador alergológico, tendo em conta que, quanto menor for este rácio, menores as probabilidades que um mastócito possua duas IgE “vizinhas” à superfície do mastócito com especificidade para o

mesmo alergénio, o que é necessário para que ocorra o *cross-linking* com a desgranulação (Herbert, 2017).

Quanto à clonalidade, é de referir que a especificidade para um alergénio não implica que todos as IgE dirigidas a um determinado alergénio sejam idênticas. Pelo contrário, para que ocorra *cross-link* é necessária a presença de sIgE para, pelo menos, dois epitopos diferentes, adjacentes (ver Fig. 6). Se o *cross-link* ocorrer na sequência de três ligações haverá sensibilidade aumentada e a desgranulação ocorrerá com concentrações mais baixas de alergénio. Assim, a clonalidade é a expressão da confiança imunológica (para conhecer um alergénio). Por fim, o conceito de afinidade, que representa o grau de ligação da sIgE a determinado epitopo (Herbert, 2017).

Mesmo que se determine o rácio sIgE/IgEt, para determinar a atividade específica, que permite prever a libertação de histamina e reatividade clínica, o exame complementar sorológico, de quantificação, não apresentará vantagens relativamente à avaliação da reatividade cutânea decorrente da desgranulação mastocitária, a não ser quando existe risco de falsos negativos, devido a medicações específicas, possibilidade de reação anafilática ou lesões dermatológicas muito extensas (Herbert, 2017).

3. Imunoparasitologia

A interação parasita-hospedeiro iniciou-se há centenas de milhões de anos, remontando para a época em que o sistema imunitário dos mamíferos iniciou o seu desenvolvimento. Os parasitas desenvolveram estratégias para atenuar as implicações nefastas do parasitismo, salvaguardando a integridade biológica do hospedeiro, evoluíram a par dos nossos sistemas imunitários, desenvolvendo ferramentas biológicas extraordinárias para manipular diferentes facetas da imunidade, o que pode inspirar futuras terapêuticas com recurso a produtos parasitários, perspetivando-se que possam recalibrar a excessiva atividade do sistema imunitário na doença alérgica (Jackson *et al.*, 2009; Tanaka, 2018; Maizels, 2019).

O sistema imunitário do hospedeiro desenvolve respostas complexas perante a presença de parasitas, que incluem uma correlação entre mecanismos de imunidade inata e adaptativa. Sumariamente, os protozoários estimulam sobretudo respostas do tipo Th1, enquanto helmintosos crónicas geram respostas tipicamente Th2 (Neill *et al.*, 2010; Huang, 2014).

Os parasitas possuem estratégias de sobrevivência perante o sistema imunitário do hospedeiro, tais como a evasão ao reconhecimento e a supressão da imunidade celular, ou seja, bloqueiam ou atrasam as respostas imunitárias do hospedeiro, inatas e adaptativas, durante o tempo mínimo para que ocorra a sua reprodução ou até completarem o seu ciclo de vida. Alguns agentes parasitários exprimem variação antigénica periódica, como *Giardia lamblia*, que expressa glicoproteínas de superfície variantes, enquanto outros parasitas podem ativar a via alternativa do complemento. Várias espécies de helmintos visam alterar as vias imunitárias do hospedeiro e ainda que os mecanismos detalhados sejam diferentes entre as variadas espécies,

reconhece-se que promovem um efeito protetor nas patologias alérgicas (Hewitson *et al.*, 2009; Maizels, 2009; Tizard, 2012; Abbas *et al.*, 2014).

Atualmente estuda-se também a influência de helmintes nos microbiomas e o seu contributo para a homeostase saudável do hospedeiro. Por exemplo, ácidos gordos de cadeia curta não são produzidos por mamíferos, mas pelas bactérias comensais em níveis tais que promovem células Treg, consistindo a disbiose numa alteração patológica, em parte por interromper a imunomodulação que os comensais promovem no indivíduo. Os helmintes são igualmente capazes de produzir ácidos gordos de cadeia curta e até de potenciar a produção destes compostos pelas bactérias comensais (Zaiss *et al.*, 2015; Coakley *et al.*, 2016; Maizels, 2019).

A Fig. 7 sistematiza a complexidade da informação imunológica a ser descrita nos subcapítulos seguintes relativamente a helmintes, estando omissas informações acerca dos nuócitos e neutrófilos, assim como as vias Th9 e Th22 (ver a Fig. 5).

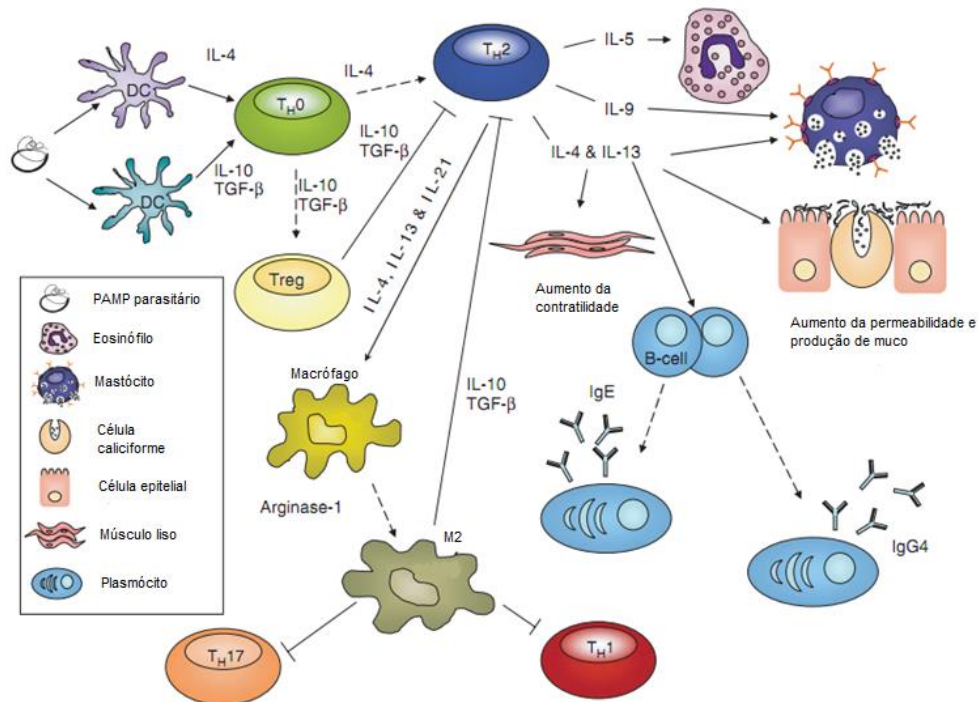


Figura 7 – Esquema da resposta imunitária às infecções por helmintes. As setas sólidas indicam sinalização a células, setas descontinuas indicam a diferenciação celular (adaptado de Jackson *et al.*, 2009).

3.1 Imunidade inata, nuócitos e ponte para a imunidade adaptativa

A primeira linha de defesa imunitária, no que respeita à presença de parasitas, é a via inata, através da promoção de sinais clássicos de hipersensibilidade de tipo I (Maizels, 2009; Tizard, 2012).

A integridade da barreira física, quer no trato intestinal, quer nas vias respiratórias, pode ser fisicamente comprometida por helmintes, que desencadeiam uma resposta adaptativa protoalérgica, promovendo o aumento da permeabilidade, em parte devido às citocinas excretadas

pelo indivíduo, mas também em detrimento dos produtos dos próprios helmintes, que visam melhor acesso aos tecidos do hospedeiro, evitando a resposta imunitária (Maizels, 2019).

Se até muito recentemente se atribuía o papel de patrulhar o microambiente, em busca de sinais de perigo, às DC, hoje compreende-se melhor o processo da resposta imunitária e

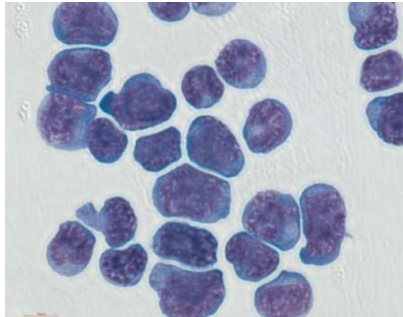
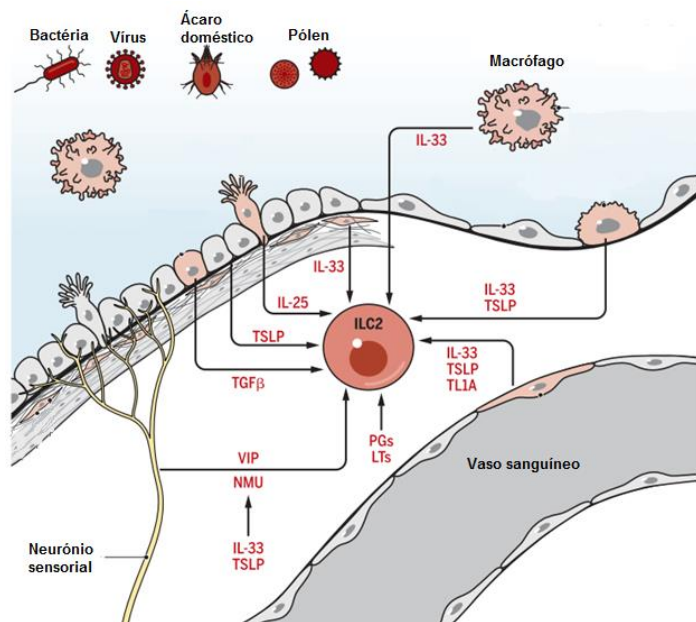


Figura 8 – Morfologia de nuócitos por coloração Giemsa (adaptado de Neill *et al.*, 2010).

atribui-se aos nuócitos essa função, sendo que deles depende o desencadear da resposta adaptativa, designada de tipo 2, e respetiva polarização de células Th (Fig. 9 e 10). Existem três tipos de células linfóides inatas, nomeadamente ILC1, relacionado com a resposta imunitária do tipo Th1; ILC2, as células linfóides inatas do tipo 2, também designadas nuócitos; e ILC3, as relacionadas com a resposta imunitária Th17 (Cruz *et al.*, 2017).

Na Fig. 8 podemos observar a morfologia dos nuócitos, células efetoras do sistema imunitário inato do tipo 2 relacionadas com processos alérgicos e helmintoses. Aquando da sua descoberta estimou-se que representassem menos de 0,2% das células tecidulares, observando-se um aumento significativo da sua população após administração intraperitoneal de IL-25 endógena e em cultura contendo IL-33 e IL-7. Podem ser ativados na sequência de variados estímulos (Fig. 9) como, por exemplo, pela linfopoiétina estromal tímica (TSLP) ou pelo fator de necrose tumoral (TNF), leucotrieno e hipovitaminose A, como ocorre na sequência de algumas parasitoses. Estas células expressam elevados níveis de IL-4, IL-5, IL-6, IL- 9, IL-10, IL-13 e IL-21, e fatores de crescimento hematopoiético, culminando com a expulsão parasitária. Compreende-se, agora, que quando a expulsão parasitária é um processo mediado por células T, estas células têm o papel de recrutar e mediar a expansão, migração e sobrevivência prolongada de nuócitos, como investigado inicialmente por Neill *et al.*, (2010). A incerteza presente na comunidade científica quanto aos mecanismos e vias desencadeadoras da resposta imunitária Th2 foi dissipada com a descoberta destas células e, desde então, construídos novos paradigmas imunológicos (Jackson *et al.*, 2009; Cruz *et al.*, 2017; Lloyd & Snelgrove, 2018;).



Tornou-se inegável o papel fundamental dos nuócitos no que respeita aos processos alérgicos e resposta antiparasitária, visto

Figura 9 – Estímulos microambientais recebidos por ILC2s (adaptado de Lloyd & Snelgrove, 2018).

produzirem citocinas do tipo Th2 (IL-13 e IL-5), em particular. Possuem ontogenia linfóide, todavia sem os recetores característicos dos linfócitos B e T, desprovidos de capacidade citotóxica, apesar de dotados de capacidade de processar antígenos, de fazer endocitose, sendo a sua função primária a produção de citocinas. Ativam-se na subseqüentemente aos sinais tecidulares locais associados a IL-25, IL-33, TSLP, TGF- β , prostaglandinas e leucotrienos, entre outros, encontrando-se amplamente distribuídos. A chave para a sua funcionalidade é ditada pelo microambiente envolvente, onde as perturbações geradas pela presença de helmintes, bactérias, vírus, alérgenos e moléculas endógenas geram sinais de *stress* que os ativam (Dudakov *et al.*, 2015; Lloyd & Snelgrove, 2018; Nussbaum & Ortiz-Carpena, 2018).

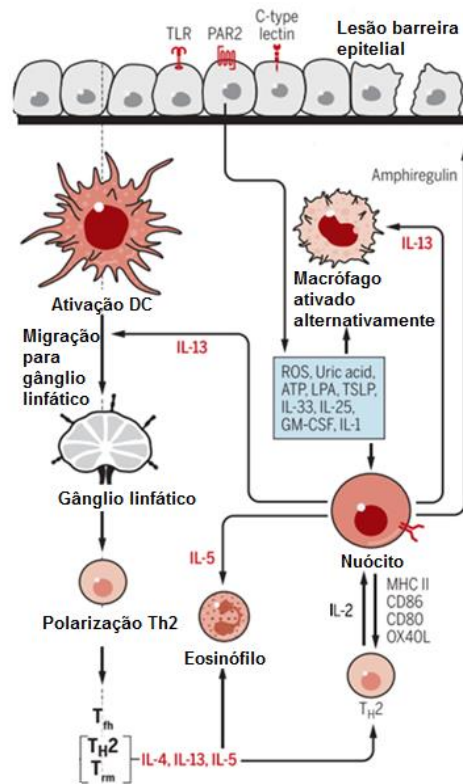


Figura 10 – Eixo nuócito (ILC2)-célula dendrítica-resposta Th2 (adaptado de Lloyd & Snelgrove, 2018).

As DC reconhecem PAMPs, via TLR-2, -3 e -4, recetores C lectinas, entre outros. No entanto, não são as protagonistas centrais na polarização de respostas imunitárias adaptativas, como se julgava anteriormente. Desempenham um papel importante no diálogo que estabelecem com os nuócitos, sendo estes a comandar as DC, pela produção de IL-13, a promover a polarização da resposta imunitária de Th0 para Th2. Os nuócitos também promovem a diferenciação Th2, diretamente, expressando moléculas MHC II, embora a apresentação direta de antígeno às células T seja menos eficientemente do que a realizada pelas DC. Em suma, o eixo ILC2-DC-Th2 é modulado por sinais transmitidos pelas células ativadas por lesões ocorridas na barreira epitelial, com disrupção da homeostase, como se observa na Fig. 10 (Smits *et al.*, 2010; Cruz *et al.*, 2017; Lloyd & Snelgrove, 2018).

O sistema imunitário inato, por si só, é pouco eficaz na eliminação de parasitas, o que se deve, em parte, à elevada especificidade dos recetores *toll-like* de primeira linha (TLR-4) para o lipopolissacarídeo bacteriano, portanto pouco específico para parasitas. No entanto, os TLR-4 possuem um grau de polimorfismo que lhes permite reter temporariamente os parasitas, enquanto são ativados os linfócitos específicos de antígenos T e B, desencadeando-se o processo de imunidade adaptativa (Miller, *et al.*, 2005; Roach *et al.*, 2005; Maizels, 2009).

3.2 Eosinófilos, macrófagos e neutrófilos

Quando ocorre a desgranulação de mastócitos, libertam-se eotaxinas que promovem a migração de eosinófilos, a par da qual ocorre eosinofilia pela expressão das IL-5, IL-25 e IL-33 (Akdis *et al.*, 2016).

Os eosinófilos, são uma classe de granulócitos onde também se encontram FcεRI e que após a sua ligação a parasitas, desgranulam metabólitos diretamente para a cutícula parasitária, nomeadamente, oxidantes, como a peroxidase eosinofílica, óxido nítrico (NO), lisofosfolipase e fosfolipase D. A proteína catiónica eosinofílica e a neurotoxina eosinofílica são ribonucleases letais para alguns helmintes, sendo que os eosinófilos são os leucócitos cujos grânulos proteicos são mais tóxicos para parasitas. No entanto, nalguns parasitas há resistência a estes compostos citocidas, como por exemplo, em estadios larvares de *Toxocara canis*, em que ocorre a perda da camada exterior da cutícula, como consequência da desgranulação, facilitando a maturação de estadio (Tizard, 2012; Abbas *et al.*, 2014). Pode visualizar-se na Fig. 11 a desgranulação eosinofílica e lesão da cutícula parasitária, de forma esquematizada.

Os helmintes presentes nos tecidos intestinais e pulmonares são destruídos por eosinófilos, enquanto a eliminação de protozoários depende de resposta mediada por anticorpos,

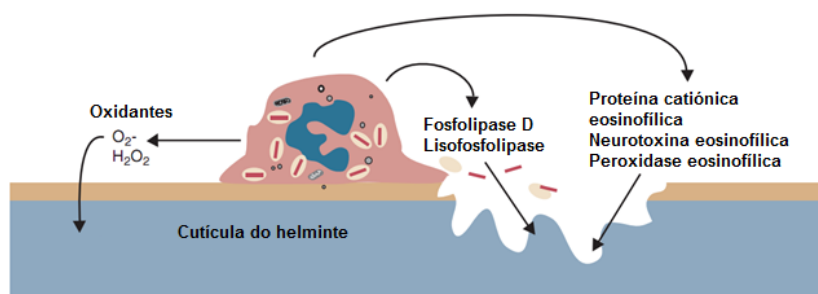


Figura 11 – Desgranulação eosinofílica e consequente lesão da cutícula parasitária (adaptado de Tizard, 2012).

particularmente pela ativação de macrófagos pelas citocinas produzidas pelas células Th1. Embora no início de uma parasitose possam ocorrer respostas mistas de Th1 e Th2, com a cronicidade da infecção predominará um dos subtipos, sendo que o domínio da resposta Th1 ou Th2 pode determinar a resistência ou a suscetibilidade à doença. Esta polarização, sem interferências de imunomodulação, depende do conjunto de TLRs ativado pelo antígeno. Por exemplo, os protozoários que ativam as células Th2 têm melhores hipóteses de sobrevivência no hospedeiro, porque a resposta imunitária que é eficaz ao seu combate é a Th1 (Tizard, 2012; Abbas *et al.*, 2014; Huang, 2014).

As funções dos macrófagos são de adesão, endocitose, fagocitose, morte microbiana, secreção de fatores tróficos e quimiotaxia. No que respeita à imunidade mediada por macrófagos, ocorre diferenciação de macrófagos classicamente ativados (M1) induzida por IFN-γ, importante citocina da resposta Th1, pela ligação lipopolissacárido (LPS) via TLR-4 e são ainda ativadas pelo fator estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). As células M1 libertam potentes moléculas citotóxicas, incluindo oxidantes, NO, aquando da sua desgranulação (Tizard, 2012; Martinez & Gordon, 2014).

Por outro lado, o estímulo para a diferenciação de macrófagos ativados alternativamente (M2) é vasto, contemplando a sinalização transmitida por IL-4, IL-13, IgG, glucocorticoides, IL-10 e fator estimulador de colónias de macrófagos (M-CSF). Tem como funções favorecer a

arginase, suprimir a inflamação Th2 e promover a fibrose. A polarização M1/M2 não é estanque, uma vez que os macrófagos podem desenvolver fenótipos mistos – M1/M2 (Martinez & Gordon, 2014).

O fator de inibição da migração de macrófagos (MIF) é um importante mediador inflamatório que participa nas respostas imunitárias inata e adaptativa, é segregado por várias células e participa no controlo parasitário, mas em muitos casos, à custa do aumento das lesões tecidulares pelo aumento da inflamação (Bozza *et al.*, 2012).

A morte de protozoários envolve a polarização de macrófagos com consequente produção de NO e espécies reativas de oxigénio, o que indica que depende da polarização M1. Uma resposta altamente polarizada Th1 e sinergismo MIF, é eficaz na morte destes parasitas, e pode ser revertida pela ação de IL-10, TGF- β ou IL-13 (Bozza *et al.*, 2012; Martinez & Gordon, 2014).

Recentemente, relacionaram-se também os neutrófilos às respostas imunitárias adaptativas de tipo 2. Os macrófagos comunicam com os neutrófilos numa colaboração para imobilizar e eliminar larvas de nematodas. Os neutrófilos estão tradicionalmente associados a respostas pró-inflamatórias do tipo 1, suprimidas por IL-4, mas observou-se que podem adotar um fenótipo “N2”, como demonstra a Fig. 12. Porém, a ativação alternativa de neutrófilos ocorre a um custo, com a consequência de exacerbar os danos tecidulares causados ao hospedeiro, como por exemplo, agravando as lesões pulmonares à migração larvar (Allen *et al.*, 2015).

3.3 Imunidade adaptativa

A polarização de células TCD4⁺ em determinado subtipo é um dos mecanismos mais importantes da resposta imunológica (Degasperi *et al.*, 2018).

As citocinas são glicoproteínas de modulação imunitária e a sua expressão pode ser regulada por via da transcrição e translação de genes. As quimiocinas são uma subclasse de citocinas que consistem em proteínas segregadas com efeito chamativo da circulação sanguínea para o tecido local, de células que para elas possuem recetores, tais como neutrófilos e monócitos, e são produzidas por APC e linfócitos T polarizados (Huang, 2014).

3.3.1 Linfócitos T reguladores (Treg) e citocinas

Os Treg restringem a inflamação e mantêm a tolerância imunitária através da secreção de IL-10 e TGF- β . A produção destas citocinas também é realizada por outras células e afigura-se necessária para a polarização Treg a partir de células TCD4⁺. A diferenciação pode ocorrer da combinação IL-2 e TGF- β , e, adicionalmente, é requerida a atividade de APC (Huang, 2014; Akdis *et al.*, 2016).

A citocina anti-inflamatória IL-10 suprime as células Th e as respostas das DC, comandadas pelos núocitos, protegendo o indivíduo de respostas inflamatórias excessivas, reduzindo o influxo leucocitário, a inflamação e permitindo a persistência parasitária (Maizels *et al.*, 2014; Akdis *et al.*, 2016; Cruz *et al.*, 2017).

A IL-2, essencial para a polarização Treg e Breg, é produzida por DC e células *natural killer* (NK). Age como regulador de nuócitos e fator promotor de crescimento de células B (Akdis *et al.*, 2016).

A citocina TGF- β é produzida por células epiteliais, fibroblastos, macrófagos, eosinófilos e linfócitos, sendo importante para a polarização Th17, Th9 e Treg. Existem recetores para TGF- β em praticamente todas as células do organismo, para controlo da deposição de matriz extracelular, indução de apoptose, inibição da proliferação e está envolvida na patologia de doenças alérgicas e tumorais (Akdis *et al.*, 2016).

3.3.2 Linfócitos T helper (Th) 17 e citocinas

As células Th17 são as primeiras células T efetoras, indutoras de citocinas quimiotáticas locais para neutrófilos e formação de granulomas, estando, portanto, implicadas na primeira abordagem de combate aos nematodas, mas as suas ações não se restringem ao parasitismo, estando também implicadas em doenças autoimunes e tumorais (Huang, 2014; Cruz *et al.*, 2017; Degasperi *et al.*, 2018).

Para que ocorra a polarização Th17 são necessárias IL-6 em conjunto com IL-1 β , TGF- β e IL-23. A alarmina IL-33 pode alterar a expressão destas citocinas e reverter a polarização para Th2 (Huang, 2014; Akdis *et al.*, 2016; Cruz *et al.*, 2017; Degasperi *et al.*, 2018).

As células Th17 produzem IL-17, que induz uma resposta inflamatória aguda na fase inicial da patologia, controla o microbioma e auxilia na resposta de defesa a antígenos extracelulares bacterianos, víricos e protozoários. A família IL-17 contém elementos que contribuem para o progresso da inflamação, encontrando-se em elevados níveis em patologias como a psoríase, doença inflamatória crónica intestinal e asma alérgica. Adicionalmente produzem IL-6, IL-8, TNF- α , IL-22 e IL-26 (Huang, 2014; Akdis *et al.*, 2016; Degasperi *et al.*, 2018).

Na Fig. 12 expõe-se a sequência de eventos imunológicos após a lesão tecidual provocada por nematoda. Por um lado, promove-se a libertação de alarminas que induzem a polarização Th2, via nuócitos e DC, com desenvolvimento de M2, inibição de Th1 por supressão de IFN- γ , e, por outro, promove-se a diferenciação Th17, na presença de proteína do tipo quitina, derivada de nematodas ou alérgenos, indutora de IL-1. Os neutrófilos e M2 agem concertadamente para a destruição dos parasitas, os neutrófilos libertam armadilhas extracelulares neutrofilicas e os macrófagos

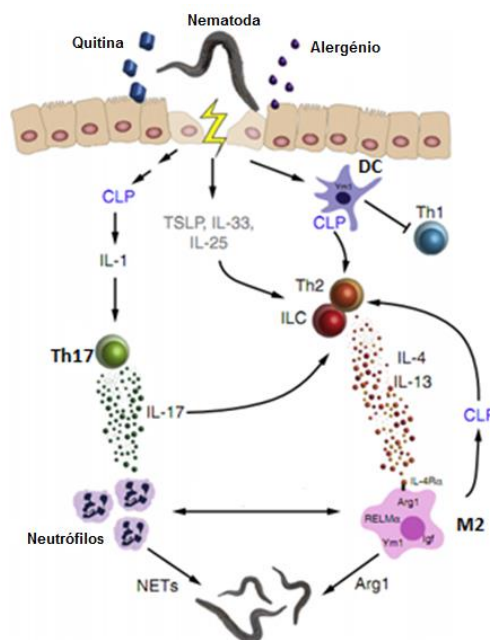


Figura 12 – Modelo da regulação de citocinas tipo 2 e Th17 na presença de quitina parasitária ou alérgenos e lesão tecidual. CLP – proteína tipo-quitina (adaptado de Allen *et al.*, 2015).

através da arginase de tipo 1, importante enzima envolvida no metabolismo do NO e da L-arginina, responsáveis pela resposta de destruição ou de reparação tecidual, respetivamente (Yang & Ming, 2014; Allen *et al.*, 2015).

3.3.3 Resposta de hipersensibilidade do tipo 2

A resposta imunitária do tipo 2 inclui a indução e função de Th2, respostas de nuócitos, com a contribuição de células epiteliais, DC, linfócitos T, eosinófilos, mastócitos, macrófagos, basófilos e inclui as citocinas IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-25, IL-31, IL-33 e TSLP. É a resposta imunitária que visa o combate a helmintes e que se desenvolve na patogenia alérgica. Implica a produção de IgE pelos plasmócitos, eosinofilia e verifica-se também sempre que há necessidade de diminuir as lesões tecidulares decorrentes da inflamação Th1 severa. Esta resposta envolve também os mecanismos indutores da imunossupressão e imunotolerância (anergia), convergindo a polarização para Treg (Neill *et al.*, 2010; Tizard, 2012; Rajamanickam & Babu, 2013; Akdis *et al.*, 2016).

Tem início com o recrutamento e ativação de nuócitos, mastócitos, basófilos e eosinófilos, hiperplasia das células caliciformes nas vias respiratórias e epitélio intestinal, após a infeção por parasitas extracelulares via a libertação de IL-4. A via inata ativada restringe a invasão parasitária antes que ocorra a resposta imune adaptativa (Koyasu & Moro, 2011; Akdis *et al.*, 2016).

Como referido anteriormente, após uma agressão imunológica, IL-25, TSLP, IL-33 são as principais citocinas responsáveis por sinalizar os nuócitos. Na ausência de IL-25 ou de IL-33 é prejudicada a resistência a helmintes. Os nuócitos produzem IL-4, IL-5 e IL-13, entre outras, com conseqüente expansão das populações celulares efetoras como sendo eosinófilos e células caliciformes, maturação e migração de células dendríticas apresentadoras de antígeno e polarização Th2 (Maizels *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2017; Lloyd & Snelgrove, 2018). A Fig. 10 apresenta algumas das interações referidas.

Para diferenciação e evolução de células Th2 é necessária a presença de IL-4 e fator de transcrição GATA-3, sendo que estas promovem a diferenciação, recrutamento e sobrevivência de granulócitos eosinófilos e células Th2, que libertam também IL-6. A IL-4 está também relacionada com mudança de classe de imunoglobulinas em plasmócitos, para IgE, assim como a supressão de Th1 e M1 (Huang, 2014; Akdis *et al.*, 2016;).

As citocinas Th2 têm um efeito direto nas populações parasitárias, verificando-se que animais que não produzem IL-4 ou IL-13 são mais suscetíveis a parasitose, ou pelo menos podem perder a capacidade de expelir os parasitas caso a IL-4 ou o TNF- α sejam neutralizados. A IL-4 é a citocina chave que desencadeia as respostas específicas de antígeno Th2. Estimula a produção de IgE, enquanto a IL-5, também produzida por células Th2, estimula a produção e maturação de eosinófilos e células B (Tizard, 2012; Abbas *et al.*, 2014).

3.3.4 Linfócitos Th1, Th9, Th22 e citocinas

Os linfócitos Th1 expressam IL-2, IL-26, IFN- γ , TFN- α e TFN- β para promover respostas mediadas por células, com hipersensibilidade tardia e ativação de macrófagos, visando a eliminação bacteriana, protozoária e viral. A neutralização da citocina IFN- γ permite a rápida exclusão dos helmintas (Tizard, 2012; Akdis *et al.*, 2016).

Para que ocorra a polarização para células Th1 são necessárias vias de sinalização TLR e a presença de IL-12 e IFN- γ . Indiretamente, IFN- γ suprime a produção de citocinas do tipo Th2 e Th17. IFN- γ também é produzido por células TCD8⁺ citotóxicas e inibe a replicação viral ou de protozoários, sendo essencial para a expressão molecular MHC classe I, e importante ainda para a ativação de macrófagos. Os macrófagos ativados são regulados por células Th1 para minimizar a destruição celular, presente nas reações de hipersensibilidade tardias. As células citotóxicas podem atacar parasitas que estejam profundamente inseridos na mucosa intestinal ou que estejam em migração tecidual (Tizard, 2012; Huang, 2014).

A polarização no sentido Th9 requer IL-4 e TGF- β . Assim como os nuócitos, as células Th9 são produtoras de IL-9, citocina originalmente denominada “p40”, é um fator de crescimento e maturação de mastócitos, que induz a produção de IgG e IgE por plasmócitos, a produção de muco no epitélio pulmonar e a expressão do recetor para IL-5 nos eosinófilos, estando portanto associada a doenças alérgicas, autoimunes e tumorais. Pode exacerbar os efeitos de Th1 ou Th2, pode ainda contribuir para a supressão imunitária, via produção de IL-10 (Akdis *et al.*, 2016; Degasperi *et al.*, 2018).

A polarização Th22 verifica-se conjuntamente com Th2, quando ocorre dermatite atópica clinicamente severa. A IL-22 é expressa por Th22, mas também por ILC3, mastócitos, DC e NK. Esta citocina tem múltiplos efeitos nos queratinócitos, como a indução da sua proliferação, migração celular e remodelação da arquitetura epidérmica, resultando nomeadamente em acantose, paraqueratose e hipogranularidade. Promove também a secreção de citocinas e péptidos antimicrobianos, apresentando efeitos anti-inflamatórios, por antagonizar a IFN- γ , e, ainda, pró-inflamatórios (Dudakov *et al.*, 2015; Akdis *et al.*, 2016).

3.3.5 Imunoglobulina E (IgE)

A produção de IgE pelos plasmócitos e a sua fixação aos agentes parasitários, junto com a ação combinada de mastócitos e eosinófilos, resulta na destruição dos parasitas. As citocinas IL-4, IL-9, IL-13 e IL-25 ativam linfócitos B para a produção de IgE, fundamental nas respostas imunes anti-helmínticas e alérgicas (Abbas *et al.*, 2014; Huang, 2014; Akdis *et al.*, 2016).

As células B possuem uma variedade de funções imunitárias, incluindo a produção de anticorpos, apresentação de antígenos e produção de citocinas, como sendo IL-10. As células B produtoras de IL-10 designam-se Bregs e estão igualmente associadas à redução da patologia alérgica e modulação da resposta celular T (Smits *et al.*, 2010).

As IgE ligam-se a recetores Fc dos mastócitos na mucosa intestinal, respiratória e pele, como já referido. Quando os organismos invasores escapam à exclusão imunitária mediada

pelas IgA, são ativadas respostas mediadas por IgE, que promovem a desgranulação de mastócitos com libertação de moléculas vasoactivas, as quais, juntamente com a intensa resposta inflamatória local e alterações do peristaltismo, forçam os parasitas à exclusão (Tizard, 2012).

Os nematoda promovem o aumento de sIgE. No entanto, isso não se manifesta com aumento da reatividade cutânea, na medida em que promovem o aumento simultâneo da IgE, diminuindo o rácio IgEs/IgEt, ou a atividade específica. Em 2017, baseado em estudos realizados, Herbert inferiu que a diminuição da reatividade cutânea na presença de rácios baixos poderia dever-se à saturação de FcεRI por IgE. Se os recetores estão ocupados por IgE “inespecíficas” não ocorre *cross-linking*, não se promove a desgranulação, e, conseqüentemente, não haverá ativação eosinofílica (Herbert, 2017).

3.4 Imunorregulação por helmintes

Os helmintes não conseguem esgotar o sistema imunitário do hospedeiro, pelo rápido crescimento, pelo que, para a sua sobrevivência, dependem de mecanismos de fuga e imunossupressão. Sumariamente, a imunossupressão parasitária envolve as células TCD4⁺ e TCD8⁺, Treg, Bregs, as células alvo de IL-4, TGF-β, IL-10 e citocinas Th2 e uma miríade de moléculas imunorreguladoras (McSorley *et al.*, 2013; Coakley *et al.*, 2016; Maizels, 2019).

A variação antigénica não é a chave para o escape ao sistema imunitário adaptativo para os helmintes, por serem seres que, individualmente, possuem ciclos de vida longos. Os parasitas suprimem o sistema imunitário do hospedeiro, sobretudo estimulando controlos endógenos imunossupressores, tais como a atividade das células Treg, através da modulação de DC, pelo produto homólogo da TGF-β, nomeado de TGM, e pelo desencadear conseqüente da produção de IL-10 (Huang, 2014; Maizels, 2019).

Na maioria dos casos, o hospedeiro é imunotolerante às parasitoses, ocorrendo como assintomáticas e podendo beneficiar o hospedeiro na redução de respostas alérgicas. Quando não ocorre essa “simbiose”, por exemplo, se a espécie parasitária estiver mal-adaptada à espécie hospedeira, falha a imunomodulação parasitária e a resposta imunitária do indivíduo desenvolve-se por respostas inflamatórias lesivas, como sucede, por exemplo, com *Toxocara canis* em humanos, em que as formas larvares migram erráticamente, não sendo possível estabelecer-se a infeção crónica. A predisposição genética do indivíduo influencia a carga parasitária, assim como a sua resposta imunitária. Verifica-se que indivíduos com cargas parasitárias elevadas apresentam uma resposta celular T diminuída, com diminuição na reatividade cutânea a alérgénios. Adicionalmente, e comprovado em testes *in vivo*, após desparasitação, registou-se a recuperação da responsividade cutânea a alérgénios nos testes cutâneos (Hewitson *et al.*, 2009; Smits *et al.*, 2010; Tizard, 2012; Coakley *et al.*, 2016; Maizels, 2019).

Por exemplo, no estudo de Biggelaar *et al.* (2004), crianças com elevadas cargas parasitárias foram desparasitadas trimestralmente, realizados SPT e determinações sorológicas de sIgE a ácaros domésticos, semestralmente. Verificou-se na população crescentemente

desparasitada, a diminuição gradual nas prevalências parasitárias e a diminuição na IgE após >18 meses (a longa duração) e o número de reações cutâneas positivas aumentou gradualmente. Outros estudos, nos quais a desparasitação foi realizada por um curto período (<12 meses), não demonstraram alteração na sintomatologia atópica, porém quando realizados durante 12 meses observou-se o aumento da reatividade cutânea e, quando efetuada a longa duração (>22 meses), demonstrou-se um efeito protetor na sintomatologia clínica. De onde se inferiu que, possivelmente, o fator protetor das helmintoses ocorrerá apenas quando se estabelece a fase crônica do parasitismo e não na fase aguda do parasitismo. Em suma, estes dados permitem inferir que o parasitismo por helmintes ameniza as respostas alérgicas e que a desparasitação anula esse efeito protetor (Biggelaar *et al.*, 2004; Smits *et al.*, 2010; Coakley *et al.*, 2016).

No que respeita à resposta a larvas migrantes no hospedeiro, os eosinófilos e os macrófagos são os principais protagonistas. Estas células possuem IgE que aderem aos parasitas visando a sua destruição. Os macrófagos aderidos aos parasitas tornam-se células M1 com aumento de enzimas lisossomais, produção de oxidantes, IL-1, leucotrienos, prostaglandinas e fator de ativação de plaquetas (Maizels, 2019).

Quando a morte larvar não ocorre, ativa-se o fenótipo alternativo M2, devido à estimulação de IL-4 e IL-13 (de nuócitos) e na sequência de homólogos MIF parasitários. Os M2 são produtores de arginase que, em presença do substrato arginina, promove a proliferação de fibroblastos com desenvolvimento de granulomas do tipo 2 (Tizard, 2012; Maizels, 2019).

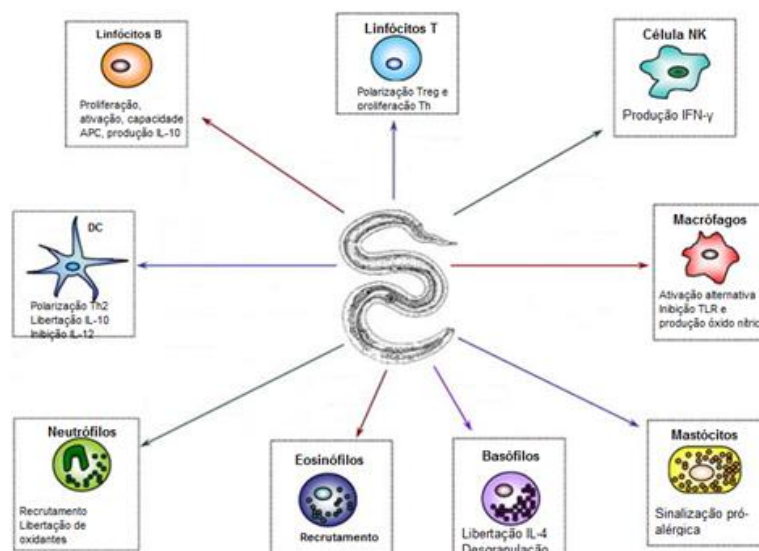


Figura 13 – Exemplos de efeitos imunitários imunossuprimidos por helmintes (adaptado de Hewitson *et al.*, 2009).

Há produtos parasitários que podem ligar-se a receptores celulares de células imunitárias de mamíferos, como por exemplo homólogos MIF, pro-inflamatória em natureza, que conjuntamente com IL-4, induz o desenvolvimento e ativação de macrófagos de modo alternativo

(M2). Assim, num ambiente Th2, o MIF pode prevenir a ativação clássica de macrófagos, pró-inflamatória (M1). Os inúmeros mediadores parasitários ligam-se, ou degradam, moléculas do hospedeiro, ou interagem com as diferentes células de modo a promover a imunomodulação, como se exemplifica na Fig. 13.

A enumeração de todos os compostos parasitários imunomoduladores é demasiado vasta para ser exposta na sua totalidade neste capítulo. Porém, de seguida, salientam-se alguns desses produtos, como por exemplo, as proteases, enzimas que provêm do sistema digestivo parasitário e que degradam citocinas das vias imunitárias do hospedeiro. Outros produtos de helmintes bloqueiam as alarminas das células epiteliais IL-33 e TSLP, e possuem enzimas que degradam a eotaxina, interferindo com a quimiotaxia de eosinófilos, ativação de células dendríticas, função de macrófagos e responsividade das células T. Desta forma, promove-se um ambiente imunorregulador, que protege o hospedeiro contra alterações imunológicas como a alergia, a autoimunidade e a síndrome metabólica. Especificamente, o inibidor da libertação de alarmina (Hp-ARI) neutraliza a ação de IL-33, iniciador da resposta tipo 2 a nível celular, prevenindo a ativação de nuócitos e, subsequentemente, também a eosinofilia nas vias respiratórias a alguns alergénios aerógenos (Hewitson *et al.*, 2009; Maizels, 2019).

Os metabolitos parasitários imunomoduladores são heteroproteínas, mas também polissacarídeos, lípidos, ácidos nucleicos e vesículas lipídicas. A proteína ómega-1 parasitária, diminui a produção de células dendríticas por bloquear IL-12 e promover Th2. A IL-12 visa a polarização de Th1, e especula-se agora se a inibição de IL-12 por helmintas visa bloquear a imunidade antiparasitária ou se visa minimizar o efeito inflamatório colateral nas barreiras epiteliais, que permite a translocação bacteriana. Outro produto parasitário descrito é o p43, uma proteína de *Trichuris muris* que se liga à IL-13, prevenindo a ativação da resposta do tipo 2 (Coakley *et al.*, 2016; Maizels, 2019).

Os compostos parasitários podem interagir com recetores de reconhecimento de padrão inatos, tais como: TLRs e lectinas do tipo-C, proteínas de ligação a carboidratos envolvidas na absorção e apresentação de antigénio, adesão celular, apoptose e polarização de célula T, que ocorrem naturalmente no hospedeiro e são abundantes em *T. canis* e ancilostomatídeos, mas desconhece-se ainda a sua importância biológica; cistatinas e serpinas, dois conjuntos de inibidores de proteases da cisteína, requeridas para a apresentação antigénica, e que solicitam IL-10, inibem diretamente a proliferação de células T, via TGF- β (Hewitson *et al.*, 2009; Maizels *et al.*, 2014; Coakley *et al.*, 2016).

Vesículas extracelulares parasitárias, em particular exossomas, participam na comunicação celular. Os exossomas são nanovesículas que facilitam a transferência de moléculas presentes no seu interior. Recentemente reconheceu-se que os helmintes são capazes de produzir estes produtos na íntegra. A administração profilática de alguns exossomas parasitários suprime a resposta imune inata, uma vez que modula os nuócitos, isto é, bloqueia a libertação de IL-5 promotora da eosinofilia, e reduz a expressão genética que codifica o recetor IL-33, necessária para a iniciação de nuócitos. Outro tipo de exossoma tem a capacidade de

estimular a produção de NO, indicador de polarização Th1. Quanto aos ácidos nucleicos, mRNAs em particular, encontram-se presentes nos exossomas parasitários, sugerindo-se que possam reprimir geneticamente as células alvo do hospedeiro (Coakley *et al.*, 2016).

Os helmintes detetam e respondem a alterações imunitárias do hospedeiro, por exemplo, acelerando a maturação ou a produção de descendência quando ocorrem aumentos de IL-5 (Coakley *et al.*, 2016).

Teoriza-se acerca da utilidade da imunomodulação, na medida em que promove proteção parasitária, em prol da sua sobrevivência, e também da utilidade refletida para o hospedeiro, ocorrendo diminuição de respostas pro-inflamatórias excessivas, como sucede nas patologias alérgicas, e eventualmente prevenindo a sua morte por outras infeções, ou sendo lesiva, por inibir a eficiência imunitária (Tizard, 2012; Rajamanickam & Babu, 2013).

3.4.1 Filarídeos

Os filarídeos modulam o sistema imunitário do hospedeiro, promovendo a hiporresponsividade e beneficiando de tolerância imunitária durante longos períodos. Estudos realizados em humanos demonstraram que nas filarioses as células T periféricas são predominantemente não-responsivas e, inclusive, promovem redução das respostas vacinais e alergénicas. Noutro estudo, inferiu-se que o desenrolar da patologia depende da resposta imunitária do indivíduo, associada ao mecanismo de imunomodulação induzido pelo parasita. Nos indivíduos assintomáticos, ocorre hiporresponsividade, com elevados Treg e IL-10, o que conduz a uma resposta Th2 modificada (Rajamanickam & Babu, 2013).

As prostaglandinas estão associadas à produção de IL-10 na pele, inibindo a migração de DC. Nas filarioses ocorre secreção de prostaciclina, prostaglandinas e secretomas que inviabilizam as células B no processamento da componente proteica de antigénio para apresentação às células T (Hewitson *et al.*, 2009; Coakley *et al.*, 2016; Cruz *et al.*, 2017;).

Algumas das proteínas expelidas por microfilárias são diferentes das expelidas pelos filarídeos adultos, qualitativa e quantitativamente, refletindo, provavelmente, a localização que ocupam no hospedeiro nas diferentes fases do seu ciclo de vida (Hewitson *et al.*, 2009).

3.5 Imunorregulação por protozoários

Geralmente a imunidade adaptativa de combate a protozoários envolve uma resposta polarizada Th1, resultando na ativação de macrófagos, nomeadamente os M1, produtores de NO, particularmente importante nas doenças parasitárias em que estes organismos são resistentes à destruição intracelular, sendo que a interação de radicais de nitrogénio com outros oxidantes é letal para muitos protozoários intracelulares. Portanto, visto que a produção de espécies reativas de oxigénio é uma via primária de ataque a protozoários, muitos destes parasitas expressam elevados níveis de antioxidantes (Hewitson *et al.*, 2009; Tizard, 2012; Abbas *et al.*, 2014).

Os mecanismos de resistência imunitária a protozoários são semelhantes aos que ocorrem perante a infecção bacteriana ou viral, compreendem respostas mediadas por anticorpos, que visam opsonizar, aglutinar ou imobilizá-los. Em conjunto com a resposta imunitária Th1 ocorre a ativação do complemento e de células citotóxicas, e a produção de anticorpos específicos contra protozoários, nomeadamente as ablastinas, visando inibir a reprodução e promovendo-se a destruição dos protozoários (Tizard, 2012).

A infecção protozoária pode melhorar as defesas antibacterianas do hospedeiro, à custa do aumento da resposta inflamatória. Estudos anteriores comprovaram que o *Tritrichomonas* sp. ativa o complexo proteico inflamassoma, responsável por induzir IL-1 β e IFN- γ , que desencadeiam uma resposta Th1 e Th17, ao contrário do que se verifica nos helmintes, que estimulam uma resposta Th2, possivelmente aumentando a suscetibilidade a infecção bacteriana (Loke & Lim, 2016).

Há décadas que é relatado o efeito sinérgico de infeções respiratórias e a exposição a alérgenos em indivíduos asmáticos sensibilizados. Este sinergismo contribui para a exacerbação da sintomatologia, pela promoção de vias pró-inflamatórias. Tendo em consideração que as infeções bacterianas, virais e protozoárias resultam em mecanismos de resposta idênticos por parte do hospedeiro, e tendo em conta vários trabalhos de investigação na área da imunidade aos protozoários, demonstrou-se que os efeitos decorrentes da imunomodulação por protozoários visam a polarização Th2, benéfica para a sua proliferação, uma vez que dela resulta uma resposta Th1 deficiente (Custovic *et al.*, 2005; Fukuyama *et al.*, 2017).

Consequentemente, se ocorrer exacerbação Th2, e/ou diminuição de Treg, pode desenvolver-se a patologia alérgica. Apesar de os mecanismos ainda não serem suficientemente claros, infere-se que os protozoários podem contribuir para a expressão clínica da reatividade alérgica, verificando-se que promovem eosinofilia e sintomatologia pruriginosa (Dilek *et al.*, 2012).

3.5.1 *Leishmania* sp.

No que concerne à leishmaniose canina, quando as formas promastigotas são inoculadas na pele do hospedeiro pelo flebótomo, ocorre fagocitose por neutrófilos, sendo depois libertas após a apoptose dos neutrófilos e novamente fagocitadas por macrófagos, onde evoluem para as formas amastigotas, dando origem à forma cutânea da doença. Em alternativa, podem ser captadas por DC, que migram para linfonodos, sistema circulatório e órgãos internos, originando a forma visceral da doença. Sucede que, em apenas 10 a 15% dos cães, evolui para a forma visceral, sendo esta resistência justificada por vários fatores. Lipofosfoglicanos da *Leishmania* sp. atrasam a maturação de fagossomas, prevenindo a produção de NO, inibindo a resposta de macrófagos a citocinas e suprimindo a expressão de MHC, o que debilita a capacidade das células apresentadoras de antígeno. Por fim, a persistência parasitária desencadeia a formação de granulomas do tipo I. Nos animais resistentes ocorrem títulos de anticorpos baixos, mas uma elevada resposta Th1, com a produção de IFN- γ . Inversamente, nos animais suscetíveis há títulos elevados de anticorpos pela forte resposta Th2, que ocorre na

sequência da supressão da transcrição do gene que codifica para IL-12 e pela ativação de células B implicadas na produção das classes de IgG. Em todo o caso, este processo promove a ocorrência de hiperglobulinemia, com lesões associadas à hipersensibilidade dos tipos II e III. Em suma, os sinais clínicos da leishmaniose estão diretamente relacionados com o tipo de resposta imunitária estabelecida pelo hospedeiro e com a capacidade do protozoário para bloquear a produção de citocinas ou oxidantes (Tizard, 2012).

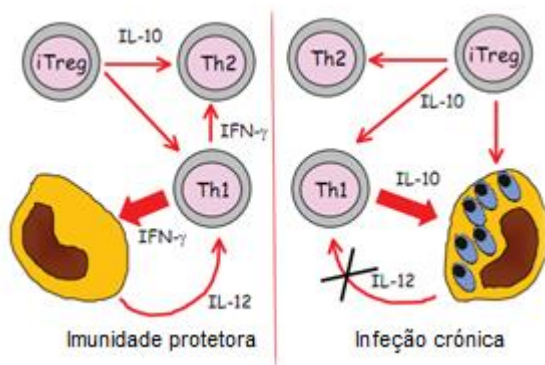


Figura 14 – Imunidade protetora e imunossupressão por leishmaniose (adaptado de Day, 2011).

Como se observa na Fig. 14 a resistência à doença é possível pela ação protetora da resposta Th1, e por outro lado, ocorre predomínio da resposta Th2 nos animais suscetíveis. As moléculas protozoárias tendem a promover imunidade Th2 enquanto suprimem Th1, o que permite um ambiente benéfico para que se estabeleça a infecção intracelular. Esta alteração empurra o balanço imunitário para condições que favorecem a imunopatologia humoral secundária (formação de

autoanticorpo e de complexos imunes) e justifica-se com a função Treg de inibir as células Th1, permitindo a persistência da doença ou Th1 reprogramados para produção de IL-10 (Day, 2011).

Os animais resistentes, assintomáticos, têm maior expressão genética de IFN- γ e TNF- α e baixas cargas parasitárias, enquanto que os animais sintomáticos, onde se verificam elevadas cargas parasitárias e lesões de dermatite exfoliativa, têm maior expressão de imunossupressores IL-10 e TGF- β . Embora as Treg previnam a eliminação completa da infecção, a sua função é crucial para inibir o desenvolvimento de imunopatologia secundária (Day, 2011).

Para além dos lipofosfoglicanos, já mencionados, salientam-se outros produtos parasitários importantes na imunomodulação promovida por *Leishmania* sp., nomeadamente exossomas e homólogos MIF. Os macrófagos infetados por *Leishmania* sp. libertam exossomas com alterações fenotípicas após a infeção. Sendo o macrófago a célula principal no ciclo da leishmaniose no hospedeiro, estes protozoários possuem um homólogo MIF que aumenta a sobrevivência dos macrófagos e protege contra a apoptose induzida por NO, uma vantagem seletiva que garante a replicação das amastigotas (Bozza *et al.*, 2012; Coakley *et al.*, 2016).

3.5.2 *Hepatozoon canis*

Foi verificado que ocorrem aumentos séricos de glutatona, malondialdeído e NO em animais com hepatozoonose, devendo estes aumentos relacionar-se com a prevalência de resposta imunitária Th1 (Kiral *et al.*, 2005; Tizard, 2012).

Verifica-se que os animais permanecem assintomáticos e com baixas parasitémias durante vários anos, resta saber se tal se deve à resposta Th1 do hospedeiro, que é eficaz em

conter a progressão da doença até que ocorra o efeito imunossupressor por doença concomitante, ou se a baixa parasitemia é uma estratégia do protozoário que visa minimizar os efeitos nefastos para o indivíduo, possibilitando a sua disseminação pela hematofagia de ixodídeos durante vários anos (Eiras *et al.*, 2007).

3.5.3 *Giardia* sp.

As giardíoses crônicas podem induzir respostas intestinais pro-inflamatórias, podendo causar disfunção da barreira intestinal. Mas verifica-se também que podem atenuar o recrutamento de leucócitos pró-inflamatórios e diminuir a produção de NO, típica da resposta Th1 (Cotton *et al.*, 2015).

O protozoário intestinal *Giardia* sp. modula ativamente as respostas do hospedeiro, porém, têm sido obtidos resultados conflituosos acerca do modo como os trofozoítos deste parasita afetam a ativação de DC e a sua capacidade de induzir ou modular as respostas imunitárias (Cotton *et al.*, 2015).

3.6 Imunorregulação por ixodídeos

No local de inserção das peças bucais no hospedeiro, verifica-se histologicamente necrose, presença de cemento e infiltração mista inflamatória. A imunidade que visa proteger o hospedeiro da infestação por ixodídeos é a resposta mediada por Th1, uma resposta a compostos salivares, que se comportam como haptenos ligando-se a proteínas, e que desencadeiam uma resposta de hipersensibilidade tardia, conferindo resistência à infestação (Ferreira *et al.*, 2003; Day, 2011; Tizard, 2012).

Tendo em consideração que, para que ocorra a ligação ao hospedeiro e hematofagia durante vários dias, o ixodídeo necessita de ultrapassar as barreiras impostas pelo sistema imunitário do hospedeiro, desenvolveu potentes imunomoduladores que se encontram na saliva. São vários os imunomoduladores salivares que visam minimizar a resposta do hospedeiro: quinases que destroem a bradicinina, intermediária da dor e prurido; proteínas de ligação à histamina; proteínas que interferem na via do complemento; inibição da função de neutrófilos; supressão da atividade de células NK e da produção de NO por macrófagos; outros compostos prejudicam a capacidade apresentadora de antígeno de DC às células T, o que inibe a promoção de respostas Th1 e Th7; secundariamente, a resposta Th1 é inibida também pela supressão de IL-12 e IFN- γ , comprovado especificamente para a espécie *R. sanguineus*, com consequências importantes para o hospedeiro, podendo ocorrer a polarização da resposta imunitária para Th2, com produção de IgE e hipersensibilidade de tipo I (Ferreira *et al.*, 2003; Cavassani, *et al.*, 2004; Tizard, 2012).

Paralelamente, *R. sanguineus* inibe GM-CSF e IL-4, supostamente por ocorrer o seu sequestro por ligação a proteínas específicas da saliva. Estes fatores são essenciais à diferenciação e maturação das DC, pelo que se diminuem, a população DC também diminui. Este processo pode explicar a modulação de citocinas no hospedeiro, imunossupressão e fraca capacidade de resposta a infecções bacterianas, sendo que as DC expressam moléculas

envolvidas na co-estimulação de células T. Se por um lado há menor estimulação de células Th1, por haver menos DC, por outro também está demonstrado que a saliva de ixodídeos aumenta a expressão de MHC II (Tizard, 2012; Abreu *et al.*, 2019).

O paradigma de polarização Th1/Th2, referido anteriormente para a leishmaniose, também pode ser utilizado para compreender a imunomodulação salivar de artrópodes, cujas funções vão claramente para além das ações anticoagulante e anti-inflamatória. Fatores imunomoduladores salivares inibem a diferenciação e maturação de DC e a produção de IL-12, que deriva das respostas Th1, por induzir a secreção de IFN- γ . Em infestações por ixodídeos observa-se a polarização da resposta imunitária no sentido Th2 (Cavassani *et al.*, 2004; Day, 2011).

4. Reações cruzadas

A semelhança estrutural entre os ácaros domésticos é a base molecular da reatividade cruzada nos processos de sensibilização e alergia aos ácaros. Epitopos semelhantes podem ser encontrados em moléculas aparentemente não relacionadas, verificando-se que uma semelhança estrutural superior a 77% pode promover reação cruzada a nível da ligação à IgE. A alergenicidade cruzada entre ácaros do pó domésticos foi demonstrada *in vitro* e *in vivo*. Um estudo realizado em cães de raça Beagle, sensibilizados e expostos a apenas um único ácaro do pó (*D. farinae*), apresentaram frequentes respostas positivas nos TID com extratos de *D. pteronyssinus*, *A. siro*, *T. putrescentiae*, e *L. destructor* (Saridomichelakis *et al.*, 2008).

Por outro lado, existem algumas referências à possibilidade de reações cruzadas entre epitopos de helmintes e de alérgenos, como observado em estudo realizado por Nakazawa *et al.* (2013) que quantificou sorologicamente IgE e IgG específicos, após a imunização de animais com antígenos de *Ascaris lumbricoides*, tendo verificado a produção de anticorpos α -*Ascaris* com reatividade cruzada para antígenos Der f e Der p (Moneret-Vautrin, 2005; Martins *et al.*, 2008; Saridomichelakis *et al.*, 2008; Brazis, 2011; Tizard, 2012).

Os panalérgenos são alérgenos de reatividade cruzada, mediada por IgE, sendo exemplos de panalérgenos as profilinas, as polcalcinas, as proteínas transportadoras de lípidos e as tropomiosinas. As tropomiosinas são proteínas estruturais de ácaros e nematodas, entre outros, incluindo vertebrados, que parecem estar na base de reações cruzadas entre animais. Nos ácaros, as tropomiosinas incluem-se no grupo 10 (e.g. Der p 10, Der f 10, Lep d 10 e Tyr p 10) e apresentam elevada homologia com tropomiosinas de outras origens, podendo detetar-se evidência de reações cruzadas, aquando da determinação de sIgE em provas de inibição e nos TID entre ácaros, ou entre ácaro e nematoda, entre outros. Como consequência podem ocorrer falsos positivos no diagnóstico alergológico e aumento da morbilidade pela resposta inflamatória a alérgenos com grau significativo de homologia (Cosme *et al.*, 2016; Cruz *et al.*, 2017).

5. Predisposição genética

As variáveis genéticas que afetam a resistência ou suscetibilidade a helmintoses e risco de alergia são as que se relacionam com a resposta Th2 e com mecanismos reguladores.

No que respeita à origem das variáveis genéticas predisponentes de alergia, teoriza-se que possam derivar de mecanismos evolutivos, tendo a sua seleção ocorrido na presença de helmintoses disseminadas no organismo, como uma adaptação evolutiva.

As variáveis genéticas identificadas ocorrem nos genes promotores de TGF- β , de IL-3, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-33, cujo polimorfismo é evidente. Vários estudos associaram os polimorfismos destes promotores a asma, patologia atópica e resistência ou suscetibilidade a helmintoses (Cruz *et al.*, 2017).

6. Imunomodulação e terapêutica médica

A terapêutica médica de patologias alérgicas com corticosteroides sistêmicos a doses imunossupressoras aumenta o risco de infeções oportunistas. Infeções por helmintes podem ocasionalmente disseminar-se descontroladamente, resultando numa síndrome de hiperinfeção fatal. Nesta área, as mais recentes terapêuticas têm como alvo as vias de sinalização das células efectoras do sistema imunitário, do tipo 2, como a nova geração de anticorpos monoclonais caninizados, α -IL-31 – lokivetmab (Cytoint, Zoetis, EUA). O fármaco semi-homólogo na medicina humana, o omalizumab (Xolair, Novartis Pharma, França) anticorpo monoclonal humanizado, anti-IgE, pode ter como efeitos secundários o aumento do risco de disseminação parasitária. Por outro lado, o lokivetmab apresenta um conceito farmacocinético diferente, interferindo apenas na via do prurido, não havendo conhecimento da ocorrência de quaisquer efeitos secundários. O aumento de IL-31 ocorre unicamente em canídeos com DAc e sabe-se que, nesses animais, pode ser promovido por bactérias oportunistas concomitantes, nomeadamente *Staphylococcus* sp.. O lokivetmab quebra o ciclo do prurido a nível da via sensorial e, adicionalmente, infere-se que promova a diminuição de infeções bacterianas secundárias promovidas por *Staphylococcus* sp (McCandless *et al.*, 2014; Cruz *et al.*, 2017).

Por outro lado, na terapêutica médica antiparasitária, salienta-se a existência de estudos com vacinas contra artrópodes, cujos resultados preliminares apontam para a possibilidade de redução da fixação dos artrópodes aos hospedeiros, dos períodos de hematofagia, do peso de engurgitamento e da fecundidade, sugerindo que promovem um aumento da resposta imunitária (Day, 2011).

Quanto à imunomodulação de doenças concomitantes, salientam-se os possíveis benefícios das helmintoses em doenças autoimunes como a doença inflamatória crónica do intestino, esclerose múltipla, colite ulcerativa, diabetes mellitus, doenças cardiovasculares, asma e reatividade alérgica. Os ensaios clínicos em humanos têm obtido resultados menos eficientes do que nos decorridos em modelos animais, no que respeita à remissão de sintomatologia pelo uso de helmintes ou dos seus componentes parasitários. Especula-se que tal se deva ao desenho dos estudos em modelos animais, que visam prevenir o desenvolvimento da doença, ao invés de tratar a doença estabelecida. É provável que a chave do sucesso das terapêuticas baseadas em preparados de origem helmíntica seja a administração numa fase da infeção específica e dose-dependente (Cruz *et al.*, 2017).

Um ensaio impressionante, decorreu na espécie humana, em que se obteve a remissão da sintomatologia de esclerose múltipla durante cinco anos, pela infeção controlada de múltiplas espécies de helmintes (Correale & Farez, 2011).

É imperativo para o avanço na alergologia molecular, uma caracterização de alergénios visando a eficácia máxima da ASIT, para cada fonte alergénica, a identificação de alergograma de cada indivíduo, constituindo a medicina de precisão. Deveriam ser o foco dos desenvolvimentos futuros, uma caracterização das moléculas parasitárias, permitindo a formulação de alergénios recombinantes ou vacinas de ADN (Day, 2013; Martins *et al.*, 2016).

IV. Avaliação da sensibilização às fontes alergénicas mais comuns em associação com a prevalência parasitária em cães

O presente estudo foi efetuado num universo aleatório de vinte animais presentes no canil municipal de Lagos, aos quais foram realizados exames de estado geral, colheitas sanguíneas, testes intradérmicos, sob sedação, exames dermatológicos complementares e colheita de fezes para a realização de análises coprológicas, diagnóstico parasitológico e subsequente correlação de dados.

1. Objetivos

Avaliar a sensibilização de um grupo de animais a ácaros do pó e de armazenamento, através da realização de TID, e identificar possíveis correlações com achados diagnósticos parasitológicos no grupo, observados por métodos coprológicos e citologia por esfregaço sanguíneo, no âmbito da imunologia veterinária parasitológica e alergológica, com especial enfoque na relação parasita-hospedeiro e respetivo contexto imunológico.

2. Materiais e Métodos

O Órgão Responsável pelo Bem-estar dos Animais da Universidade de Évora (ORBEA-UÉ) emitiu um parecer favorável a este estudo. Foi obtido consentimento informado do tutor oficial dos animais, à data do estudo, o médico veterinário municipal de Lagos.

A amostra contemplou 20 canídeos selecionados aleatoriamente, presentes no Centro de Recolha Oficial de Lagos (CRO), licença de funcionamento nº PT 07 001 CGM, também designado canil municipal de Lagos. Este canil tem capacidade para albergar 42 cães e 7 gatos, sendo que no primeiro semestre de 2019, contabilizou a entrada de 82 novos animais, 34 dos quais foram reunidos com os respetivos tutores, 82 cães e 18 gatos foram adotados. Neste CRO existe um médico veterinário municipal, um assistente administrativo e quatro assistentes operacionais.

A todos os animais em estudo foram realizadas colheitas sanguíneas das veias cefálicas, safenas ou jugulares, na ordem dos >5 mL, com agulhas de 21 ou 23 Gauge e realizados esfregaços sanguíneos. Os esfregaços foram corados com Diff Quick e observados ao microscópio ótico. As amostras de sangue foram colocadas em tubo seco e tubo com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), os quais foram armazenados à temperatura ambiente no mínimo duas horas, procedendo-se a análise de hemograma em contador hematológico automático (Mindray Bc-2800 Vet). A análise de hemograma incluiu os parâmetros quantificação numérica de leucócitos, linfócitos, monócitos, granulócitos, eritrócitos, hemoglobina (Hgb), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), volume corpuscular médio (MCV), plaquetas, volume plaquetário médio (MPV), índice de distribuição plaquetário (PDW), quantificação percentual de linfócitos, monócitos, granulócitos, eosinófilos, hematócrito, distribuição do volume eritrocitário (RDW), plaquetócrito (PCT) e medição do fibrinogénio.

No que respeita ao fibrinogénio, foi determinado de forma simples, através da diferença da concentração proteica entre plasma e soro, com recurso a refratómetro clínico, após um período de repouso coagulativo mínimo de três horas. O refratómetro foi calibrado com água destilada, foram medidas pequenas amostras de soro e plasma, colhidas por pipeta após centrifugação durante cinco minutos, a 3000 rotações por minuto. Subtraíram-se os resultados obtidos por visualização no refratómetro, entre plasma e soro, e através do fator de multiplicação de 1000 obteve-se a conversão de g/100mL para mg/dL de fibrinogénio; de forma sumária, através da equação $1000 (\text{plasma} - \text{soro}) = x$ (Vecina *et al.*, 2006; Pivari *et al.*, 2016).

Após a determinação dos valores de fibrinogénio, amostras remanescentes de soro sanguíneo foram separadas para tubos de microcentrifuga (*ependorf*, Alemanha) e submetidos a congelação, permitindo a utilização futura para eventuais estudos complementares ao abrigo do consentimento informado.

Os animais foram identificados, sendo-lhes atribuído um número de identificação sequencial de um a vinte, realizado exame físico de estado geral, contemplando parâmetros indicativos do estado de saúde geral, nomeadamente, atitude, pelagem e pele, condição corporal, o peso, auscultação torácica e abdominal, determinação de frequências cardíaca e respiratória, percussão e palpação abdominal, linfonodos, temperatura corporal, otoscopia, avaliação das mucosas, tempo de repleção capilar e tempo de retração da prega cutânea.

Quanto ao exame dermatológico, foram realizados, conforme se observaram alterações dermatológicas, testes complementares, nomeadamente, citologia dermatológica por aposição em lâmina de microscópio, tricograma, teste de fita-cola e citologia auricular.

Para a realização dos testes intradérmicos no grupo (n=20), que visavam avaliar as respostas de sensibilização aos ácaros do pó e de armazenamento *Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae* e *Euroglyphus maynei*, procedeu-se à sedação da maioria dos animais (n=17) com

cloridrato de medetomidina (Orion Pharma, Finlândia) na dose de 0,01-0,02 mg/kg, seguido de tricotomia em retângulo com as dimensões aproximadas de 10 x 5 cm, no tórax lateral. Não se realizou qualquer tipo de antissépsia e marcaram-se os locais de inoculação com caneta de feltro espaçados de aproximadamente 2 cm entre si. As inoculações de 0,05 mL de cada um dos seis extratos alergênicos comerciais (100 unidades de nitrogênio proteico (PNU)/mL – Artuvetrin, ARTU Biologicals, Holanda) foram realizadas com recurso a seringas de 1 mL e agulhas de 29 Gauge. Em cada animal foi também inoculado um controlo positivo (cloridrato de histamina a 0,1 mg/mL) e um negativo (solvente dos extratos). As administrações foram realizadas da esquerda para a direita e de cima para baixo, correspondendo os últimos dois inóculos aos controlos positivo e negativo. Os extratos de alergénios permaneceram armazenados a temperatura de refrigeração, durante toda a duração do estudo (Nuttall *et al.*, 2008; Özkan & Uysal, 2011).

A leitura dos resultados foi realizada após 15 minutos da inoculação e os resultados foram registados, mediante a classificação de 0 a 4+, internacionalmente aceite: as reações foram consideradas positivas quando as pápulas edematosas resultantes foram, pelo menos, iguais ou superiores a metade da diferença entre o controlo negativo e o positivo. As respostas foram pontuadas de 0 (negativo) a 4 (máximo positivo). Foram classificadas como positivas inequívocas as respostas $\geq 2+$, correspondendo, em termos práticos, a classificação máxima (4+) a pápulas de dimensão igual ou superior à do controlo positivo e a mínima (0) a reação idêntica à do controlo negativo.

Salvaguardando a possibilidade de ocorrência de reação anafilática, estavam disponíveis para tratamento médico de emergência, adrenalina (0,01 mg/kg, via IV) e succinato sódico de metilprednisolona (na dose de 1,1 mg/kg, IM; 1,76 mg/kg, IV; ou na dose de 2-120 mg/animal, IM) (Plumb, 2011; Ramsey, 2014).

Para o diagnóstico parasitológico, foram colhidas amostras coprológicas, as quais foram conservadas por congelação, de modo a facilitar a logística necessária para o processamento laboratorial. Na análise às fezes, recorreu-se ao método de Willis utilizando a solução de sulfato de zinco (ZnSO₄) a 35% e observação ao microscópio ótico. O método de Willis é um método qualitativo e representa uma flutuação passiva, em que duas a três gramas de fezes foram homogeneizadas em cerca de 20 mL de solução saturada de ZnSO₄. Este homogeneizado foi vertido para tubo de ensaio até enchê-lo completamente formando um menisco, sobre o qual assenta uma lamela que repousa durante 10 a 15 minutos. A lamela foi cuidadosamente retirada e colocada sobre uma lâmina de microscópio, sendo observada de imediato, de modo a evitar a evaporação e a conseqüente formação de sais por cristalização. Quando necessário, foi pipetado líquido do topo do tubo de ensaio para a periferia da lamela. A observação em microscópio ótico realizou-se com ampliações de 100x e 400x, percorrendo visualmente todos os campos de modo sistemático (Saari *et al.*, 2018).

Para a pesquisa e identificação de *Dipylidium caninum* foi realizada decantação fecal e colhidos os proglotes, após lavagem por água corrente, colocados em lâmina/lamela com líquido esclarecedor (lactofenol de Amann) e visualizados em microscópio ótico.

O tratamento estatístico de dados foi efetuado com recurso aos programas informáticos MedCalc 19.0.5, Analysis ToolPak (Microsoft Excel®, Microsoft Office 365) e GraphPad InStat 3.10.

3. Resultados

A amostra (n = 20) incluiu 13 animais do sexo masculino (fi = 13, fr = 65%) e 7 do sexo feminino (fi = 7, fr = 35%), sendo a idade média estimada dos animais de $4,1 \pm 3,2$ anos e o peso de $19,4 \pm 8,7$ kg. Quanto à raça, o grupo mais prevalente pertencia a raça indeterminada (fi = 7, fr = 35%), havendo outros subtipos com alguma prevalência, tais como cruzados de Pastor Alemão (fr = 20%) e Podengo (fr = 15%). Apresenta-se a análise estatística simples realizada para a variável idade dos animais do grupo (tabela 2 e gráfico 1).

Tabela 2 – Análise estatística da variável idade dos animais do grupo.

Variable	Idade
Sample size	20
Lowest value	1,0000
Highest value	12,0000
Arithmetic mean	4,0500
95% CI for the Arithmetic mean	2,5605 to 5,5395
Median	2,5000
95% CI for the median	2,0000 to 5,0000
Variance	10,1289
Standard deviation	3,1826
Relative standard deviation	0,7858 (78,58%)
Standard error of the mean	0,7117
Coefficient of Skewness	1,3495 (P=0,0130)
Coefficient of Kurtosis	0,8534 (P=0,3134)

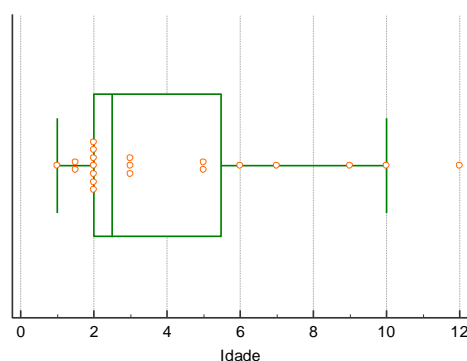


Gráfico 1 – Diagrama de extremos e quartis da idade dos animais no grupo.

Percentiles		95% Confidence interval
2,5	1,0000	
5	1,2500	
10	1,5000	
25	2,0000	1,5000 to 2,0000
75	5,5000	3,0000 to 9,9825
90	9,5000	
95	11,0000	
97,5	12,0000	

3.1 Hemograma

Na tabela 3 encontram-se sumariados os resultados obtidos de hemograma, com os valores médios e desvio padrão (SD), verificando-se que no geral os valores obtidos encontram-se dentro dos limites da normalidade para a espécie, excetuando os valores de MCV e MCHC. Quanto à concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), que indica a proporção média de hemoglobina dentro de cada eritrócito, verificou-se uma média de grupo $292,9 \pm 9,5$ g/L, 7,1 g/L abaixo do limite inferior considerado normal para a espécie (fi = 15). No que respeita ao volume corpuscular médio (MCV), obteve-se uma média de grupo de $74,9 \pm 3,5$ fL, 2,9 fL acima do limite superior considerado normal para a espécie (fi = 16). Os restantes parâmetros de hemograma encontravam-se normais, na análise média, salientando-se, no entanto, a

ocorrência de alguns desvios individuais aos limites da normalidade no que respeita ao hematócrito, que podem ser observados no gráfico 2. A média de hematócrito obtida foi de $53,8 \pm 5,9\%$, porém, alguns indivíduos apresentaram um hematócrito elevado (fi = 9) cuja média de $58,7\%$, se apresenta $2,7\%$ acima do limite superior considerado normal para a espécie.

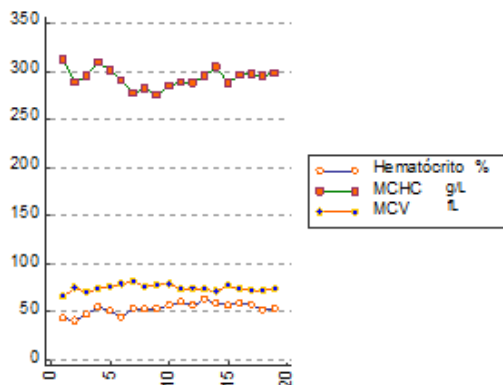


Gráfico 2 – Resultados de hematócrito, concentração de hemoglobina corpuscular média e volume corpuscular médio obtidos para os indivíduos no grupo.

Verificou-se adicionalmente que os animais em estudo nº 2 e 3 (Fig. 15 e 16), apresentaram valores ligeiramente aumentados de leucocitose, $19,7 \times 10^9/L$ e $18,4 \times 10^9/L$, respetivamente, e que o nº 16 (Fig. 17) apresentou uma leucopénia de $5,2 \times 10^9/L$. Estes casos serão abordados com maior detalhe no capítulo 4.1, onde se desenvolverá a discussão.

Tabela 3 – Média e desvio padrão dos valores de hemograma obtidos.

Hemograma	Média ± SD
Leucócitos ($10^9/L$)	$11,5 \pm 3,7$
Linfócitos ($10^9/L$)	$2,7 \pm 1$
Monócitos ($10^9/L$)	$0,6 \pm 0,2$
Granulócitos ($10^9/L$)	$8,2 \pm 2,7$
Linfócitos (%)	$23,2 \pm 3,8$
Monócitos (%)	$5,1 \pm 1,2$
Granulócitos (%)	$71,7 \pm 4,3$
Eritrócitos ($10^{12}/L$)	$7,2 \pm 0,8$
HGB (g/L)	$157,7 \pm 17,8$
Hematócrito (%)	$53,8 \pm 5,9$
MCV (fL)	$74,9 \pm 3,5$
MCH (picogramas)	$21,9 \pm 0,7$
MCHC (g/L)	$292,9 \pm 9,5$
RDW (%)	$15,1 \pm 0,7$
Plaquetas ($10^9/L$)	$252,2 \pm 112,9$
MPV (fL)	$9,2 \pm 0,5$
PDW (fL)	$16,6 \pm 0,4$
PCT (%)	$0,2 \pm 0,1$
Eosinófilos (%)	$9,4 \pm 5,8$

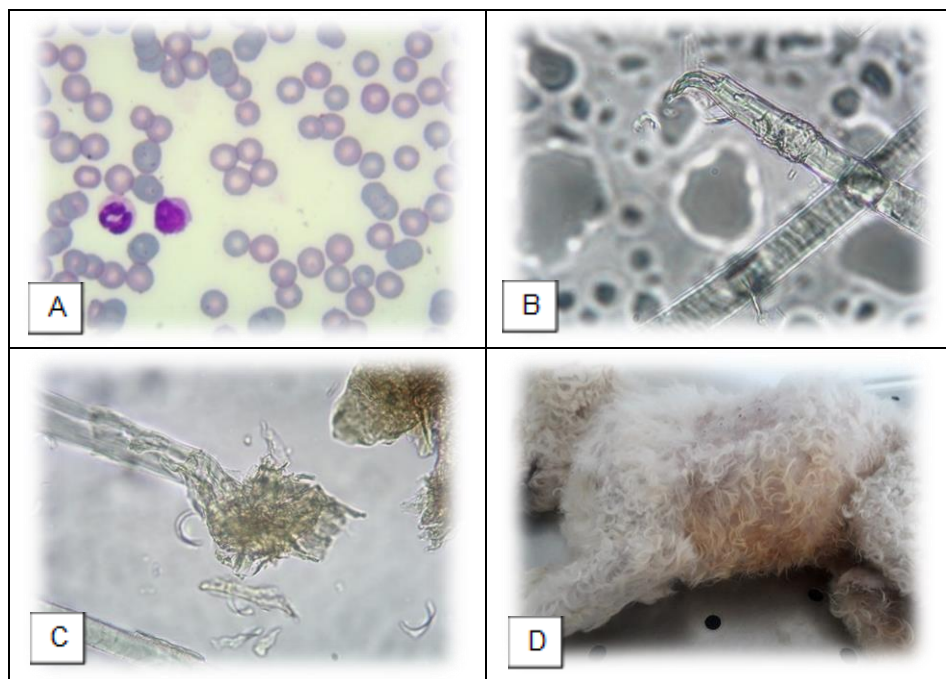


Figura 15 - Esfregaço sanguíneo (ampliação: 1000x), tricograma (ampliação: 100x) e aspeto geral do animal nº 2.

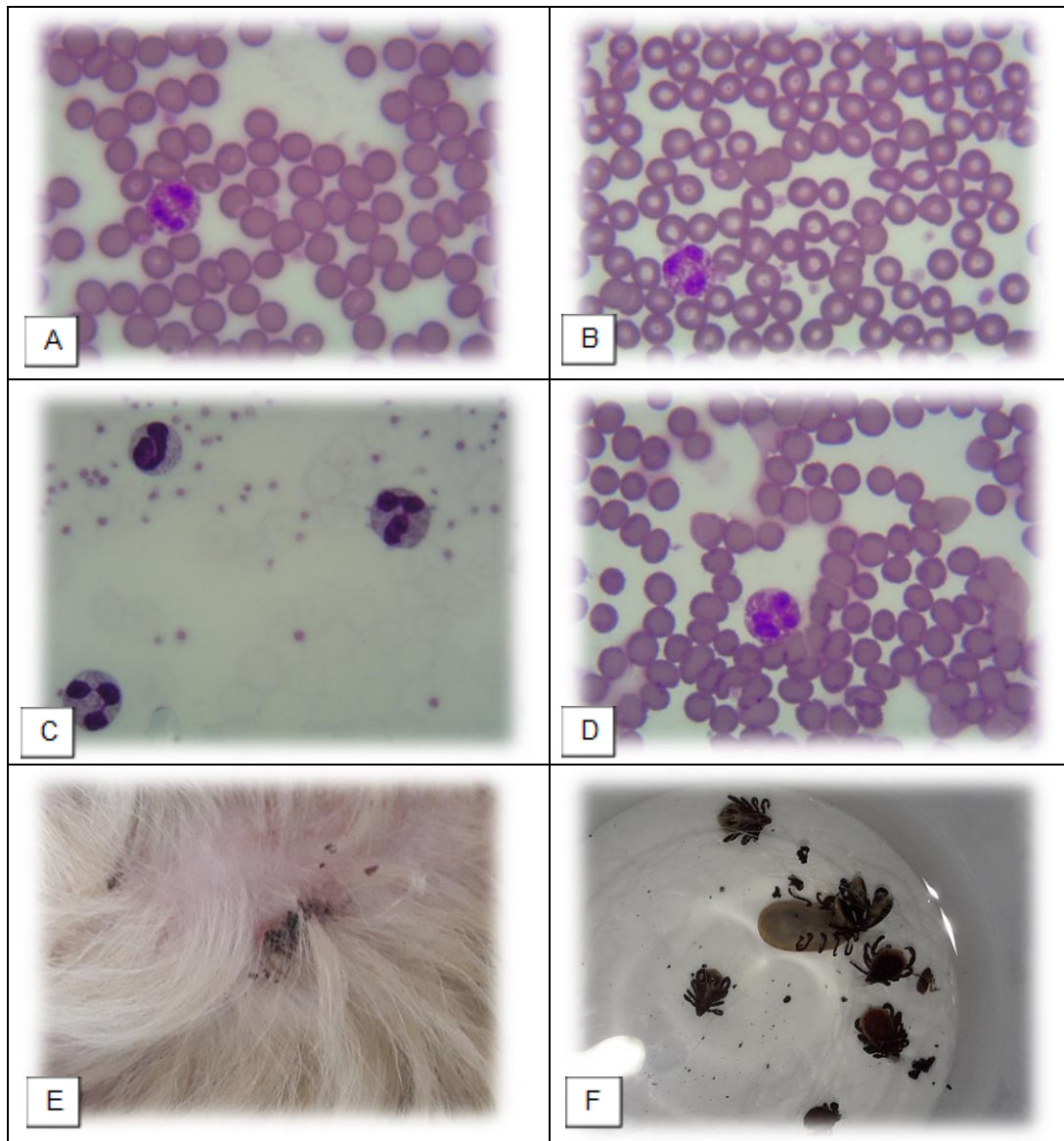


Figura 16 – Esfregaço sanguíneo (ampliação: 1000x), lesão cutânea e *Rhipicephalus sanguineus*, animal nº 3.

A, B e D – eosinófilos; B – codócitos; C – neutrófilos; E – lesão cutânea no local de fixação dos ixodídeos; F – *Rhipicephalus sanguineus*.

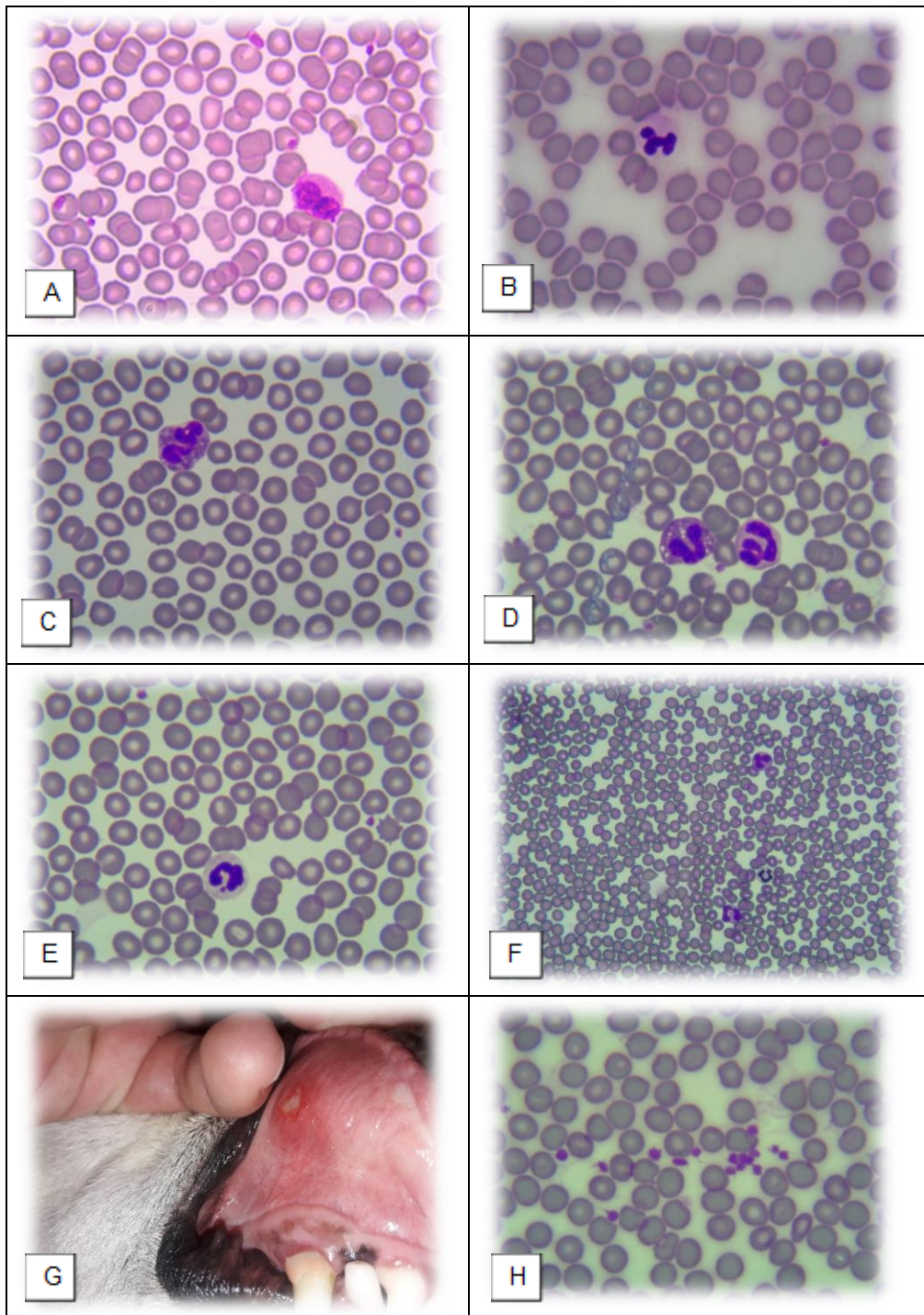


Figura 17 – Esfregaço sanguíneo (ampliações: 1000x e 400x) e úlcera na mucosa do animal nº 16.

Leucopénia (linfopenia) A – neutrófilo jovem; B – neutrófilo; C – eosinófilo; D – eosinófilo e neutrófilo; E – corpúsculo de barr (neutrófilo); F – neutropénia; G – úlcera na mucosa oral; H – plaquetas ativadas.

Quanto à quantificação percentual de eosinófilos, verificou-se eosinofilia em 8 animais do grupo (fr = 40%), veja-se a tabela 4 e o gráfico 3. No subcapítulo seguinte serão apresentados os dados relativos à correlação da eosinofilia com a prevalência parasitária e com a reatividade cutânea aos extratos alergênicos.

Tabela 4 – Análise estatística da percentagem de eosinófilos dos animais do grupo.

Variable	%_Eosinófilos
Sample size	20
Lowest value	2,6000
Highest value	20,8000
Arithmetic mean	9,5750
95% CI for the Arithmetic mean	6,8524 to 12,2976
Median	8,1500
95% CI for the median	4,1527 to 13,8813
Variance	33,8409
Standard deviation	5,8173
Relative standard deviation	0,6076 (60,76%)
Standard error of the mean	1,3008
Coefficient of Skewness	0,4629 (P=0,3452)
Coefficient of Kurtosis	-1,1889 (P=0,0932)

Percentiles		95% Confidence interval
2,5	2,6000	
5	2,9500	
10	3,4000	
25	4,0000	3,3035 to 7,2753
75	14,3000	9,1297 to 17,8965
90	17,8000	
95	19,3500	
97,5	20,8000	

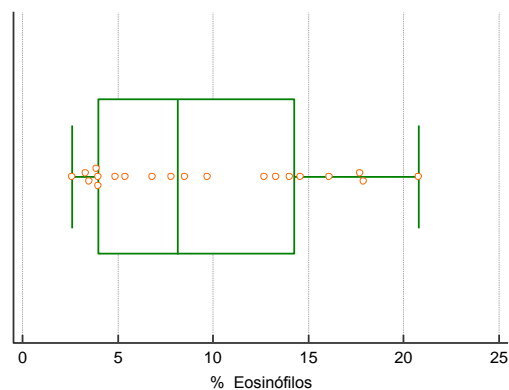


Gráfico 3 – Diagrama de extremos e quartis da percentagem de eosinófilos dos animais do grupo.

Exemplifica-se a confirmação de ocorrência de eosinofilia por citologia de esfregaço sanguíneo, realizado ao animal nº 15, na Fig. 18.

Respeitante ao animal nº 7, na sequência de ter ocorrido formação de coágulo no tubo de EDTA que impossibilitou a contabilização automatizada, foi efetuada contagem manual por visualização do esfregaço sanguíneo (Fig. 19). Quantificaram-se os seguintes valores: neutrófilos 55,7%, eosinófilos 12,7%, monócitos 8,8% e linfócitos 21,5%. Excetuando a eosinofilia, os restantes valores percentuais encontravam-se dentro dos parâmetros considerados normais para a espécie, no entanto, para a realização da tabela 3 e gráfico 2 não foram incluídos os valores obtidos manualmente para este animal.

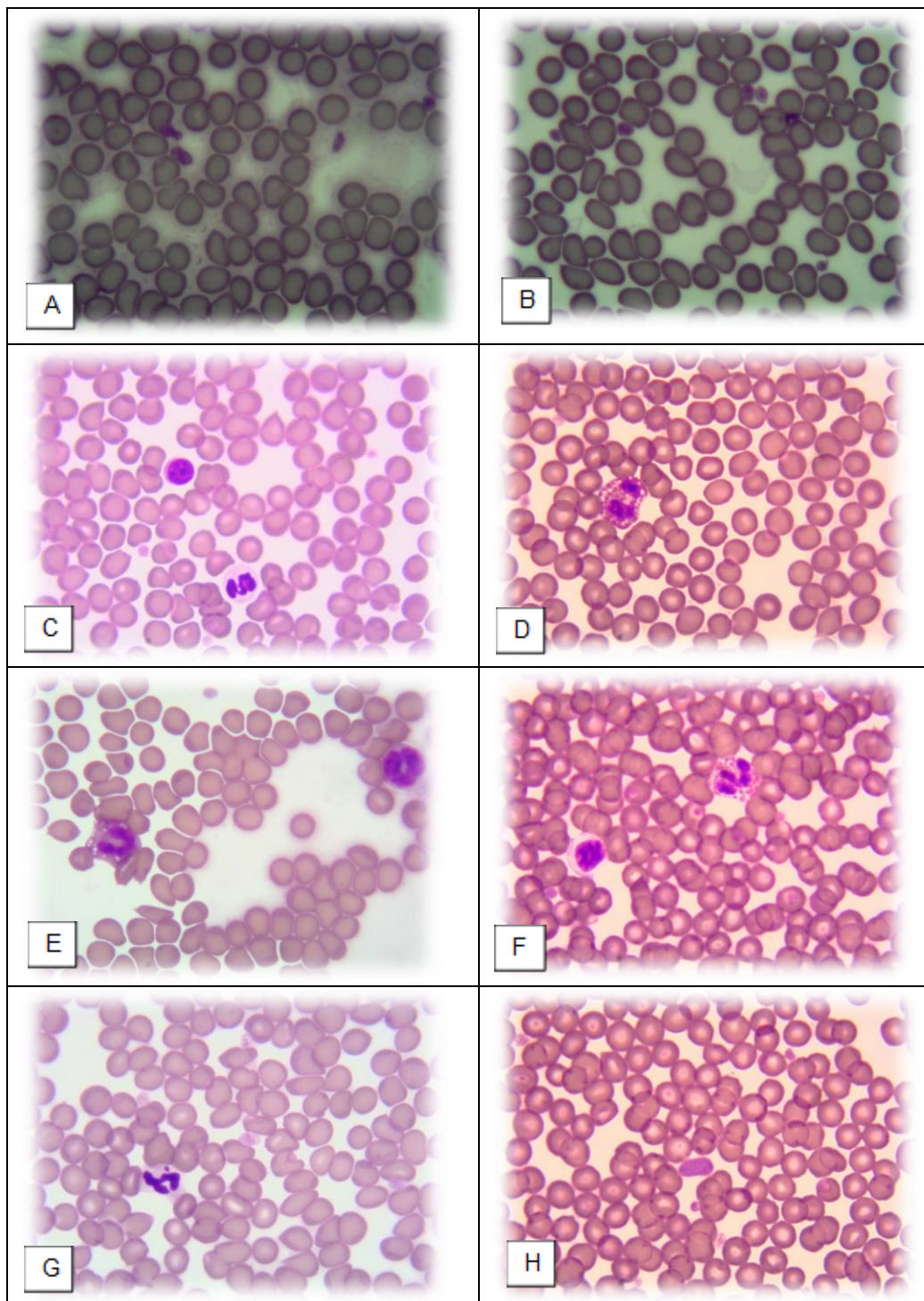


Figura 18 – Esfregaço sanguíneo do animal nº 15 (ampliação: 1000x).

Eosinofilia. A e B – plaquetas; C – linfócito e neutrófilo; D – eosinófilo; E – eosinófilo e monócito; F – linfócito e eosinófilo; G – corpúsculo de barr (neutrófilo); H - megatrombócito.

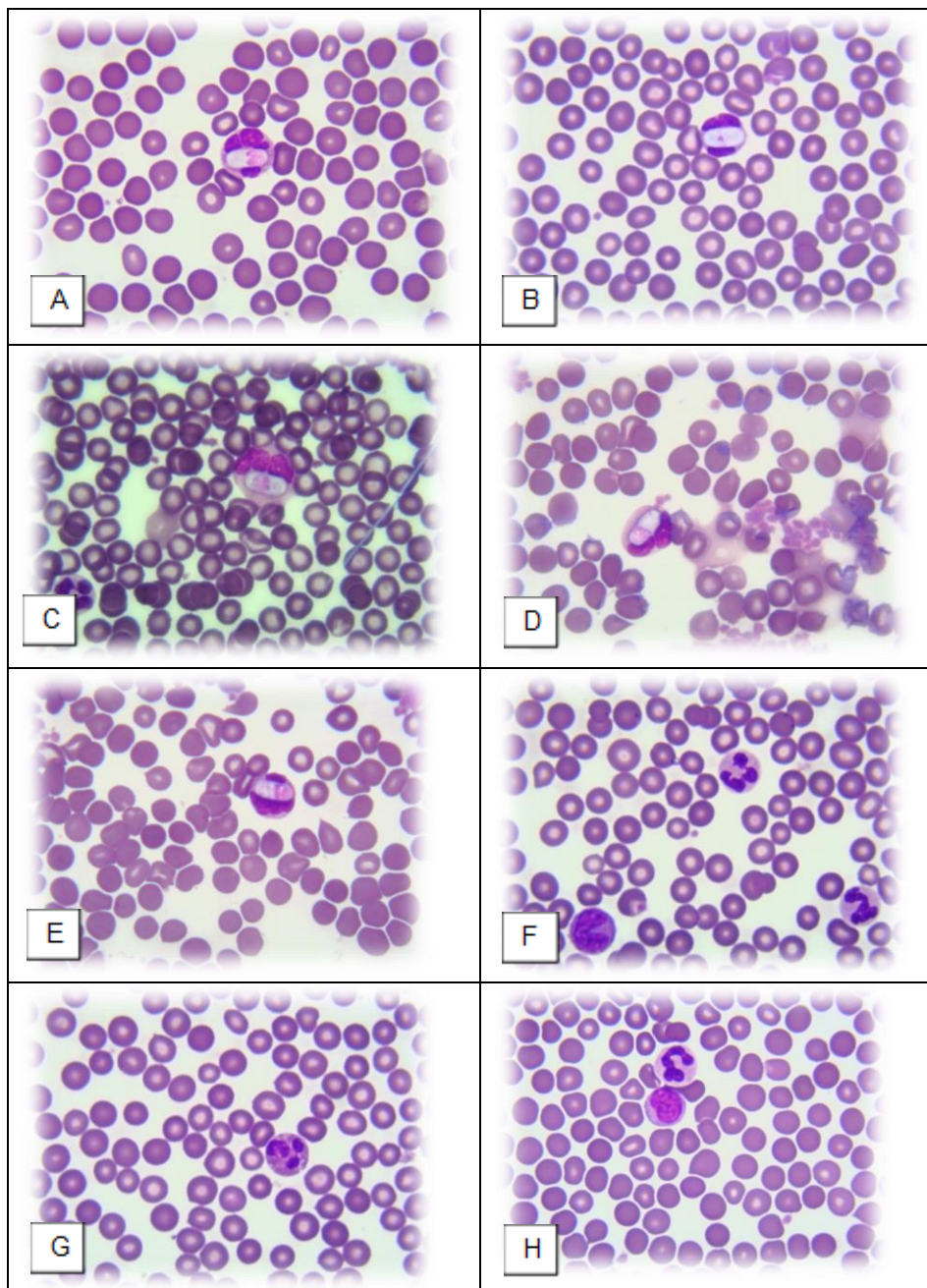


Figura 19 – Esfregaço sanguíneo com *Hepatozoon canis* no animal nº 7 (ampliação: 1000x).

Heterogeneidade cromática eritrocitária e dispersão volumétrica. A a E – gamontes alongados, elipsoidais, rodeados por membrana, com núcleo excêntrico alongado (*Hepatozoon canis*); F – monócito, dois neutrófilos e codócitos; G – eosinófilo; H – neutrófilo e linfócito.

Observe-se o Gráfico 4, onde se destacam as várias eosinofilias presentes no grupo:

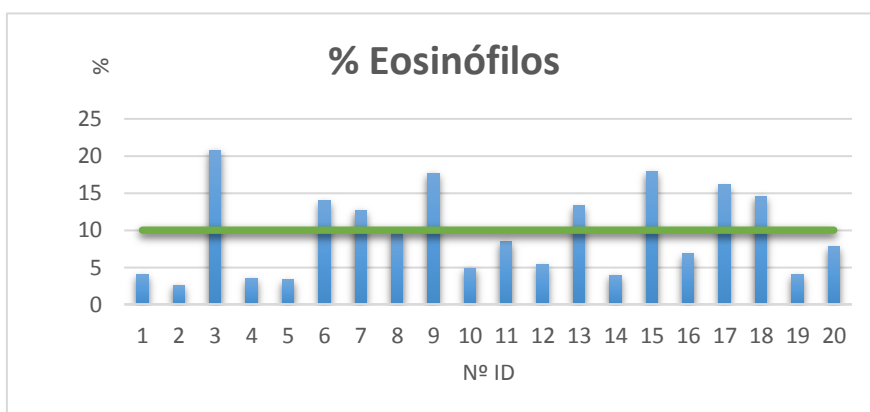


Gráfico 4 – Percentagem de eosinófilos, obtidos para os animais em estudo, e delimitação a verde do limite superior considerado normal para a espécie.

3.2 Fibrinogénio

Os valores de hiperfibrinogénemia obtidos (gráfico 5) podem ser estatisticamente relacionados com a ocorrência de processos inflamatórios, resultados de hemograma e com as respostas aos testes intradérmicos realizados. Verificou-se que existe uma correlação negativa do fibrinogénio com o valor percentual de linfócitos ($r = -0,47$; $p < 0,05$), ocorrendo correlações positivas, estatisticamente significativas para as variáveis fibrinogénio e: valor percentual de granulócitos ($r = 0,45$; $p < 0,05$); concentração de hemoglobina corpuscular média ($r = 0,52$; $p < 0,05$); índice de distribuição plaquetário ($r = 0,50$; $p < 0,05$). Sendo as restantes correlações estatisticamente insignificantes.

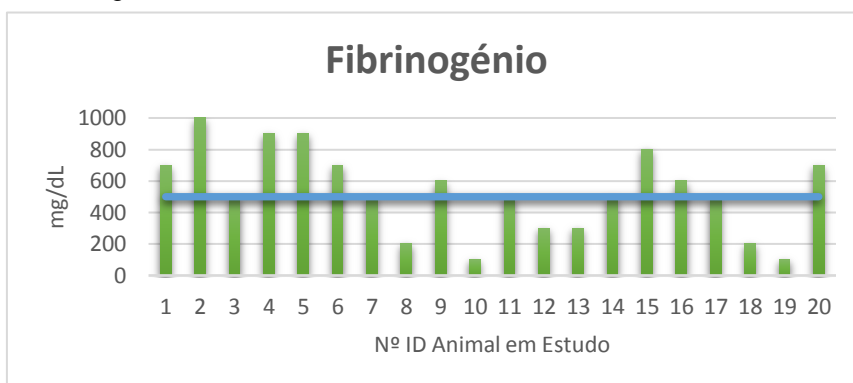


Gráfico 5 – Valores de fibrinogénio em mg/dL obtidos para os animais em estudo, e delimitação a azul do limite superior considerado normal para a espécie.

O valor médio de fibrinogénio obtido pelo grupo foi de $530 \pm 261,0$ mg/dL. O valor médio de proteína no plasma foi de $7,8 \pm 1$ g/100 mL e $7,2 \pm 0,9$ g/100 mL no soro sanguíneo. O limite superior considerado normal na espécie é de 500 mg/dL. Nove animais ultrapassaram esse limite ($fi = 9$, $fr = 45\%$).

Os indivíduos que apresentaram hiperfibrinogénemia foram os animais nº 1, 2, 4, 5, 6, 9, 15, 16 e 20, como se observou no gráfico 5. Diferentes fatores podem estar na origem do

aumento deste indicador de inflamação de fase aguda. Segue-se a exposição dos diferentes achados clínicos dos animais não referidos anteriormente. Os animais nº 1, 2, 15 e 16 serão abordados adiante (capítulos 3.3 e 4.1).

O animal nº 4 apresentava uma lesão ulcerativa no cotovelo esquerdo, à qual foi realizada citologia por aposição, como se pode verificar na Fig. 20, estando presente inflamação supurativa com neutrófilos degenerados, redes de fibrina e células escamosas queratinizadas (detritos epiteliais) e apresentava ainda uma lesão cicatricial no bordo auricular esquerdo. Para além da hiperfibrinogenémia de 900 mg/dL, não apresentou anomalias de hemograma. Foi realizado esfregaço sanguíneo, tricograma (anagéneses) e citologia otológica. Reside no CRO de Lagos desde 2018, sendo sujeito a profilaxias desparasitantes regulares. Não foram diagnosticadas parasitoses e não ocorreu reatividade cutânea nos TID.

O animal nº 5 encontrava-se parasitado por *Dipylidium caninum* e não apresentou reatividade cutânea nos TID, exibiu um exame de estado geral normal, exceto a hiperfibrinogenémia de 900 mg/dL.

A hiperfibrinogenémia de 700 mg/dL do animal nº 6 justificar-se-á pela cicatrização primária que decorria na sequência deste animal apresentar vários traumas por mordedura, nomeadamente lesões de continuidade a nível de membro posterior esquerdo, membro anterior esquerdo e pénis, que foram sujeitas a tratamento cirúrgico, na véspera da sua participação neste estudo. Adicionalmente, este animal encontrava-se desparasitado, tendo sido diagnosticado *Dipylidium caninum* e infestação por *Rhipicephalus sanguineus*. Quanto ao TID, ocorreu reatividade cutânea positiva para *D. farinae*, *A. Siro* e *E. maynei*, conforme se pode observar na Fig. 37.

O animal nº 9 foi resgatado juntamente com o animal nº 6, suspeitando-se que haja entre eles elevada afinidade genética. No entanto, ao contrário do suposto irmão, o animal nº 9 não apresentou reatividade cutânea nos TID. Foi-lhe diagnosticada microfilarémia e infeção por ancilostomatídeos. Apresentou eosinofilia na contabilização automatizada, notória na citologia sanguínea. Este animal tinha parido há 3 meses, tendo sido submetido a profilaxia vacinal no ano anterior (assim como o animal nº 6). Veja-se na Fig. 21, a presença de vários eosinófilos, as microfírias com características compatíveis com a espécie *Dirofilaria immitis*, o tricograma com ciclo de crescimento em telogénese e ponta do pelo danificada, sugestivo de trauma por prurido.

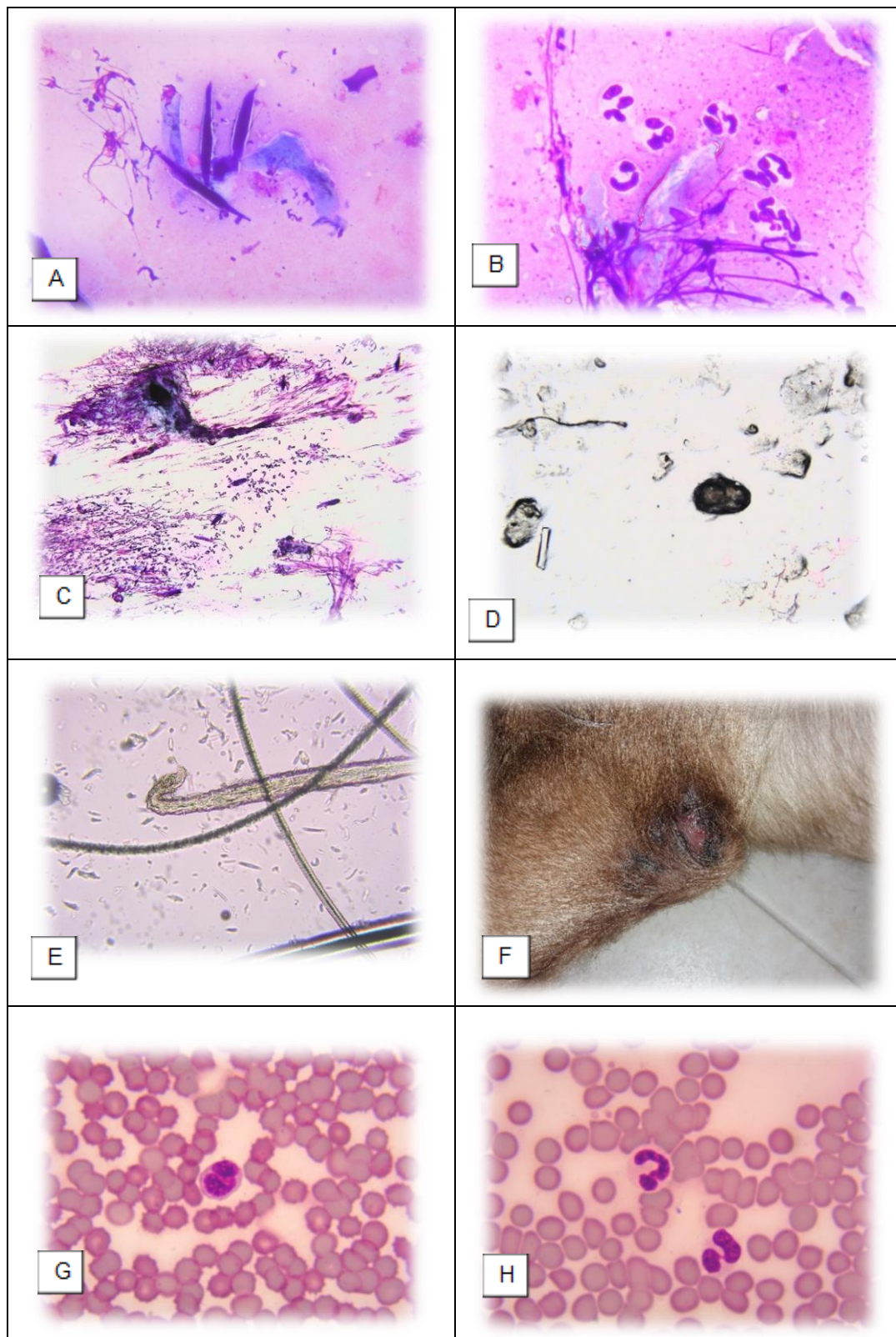


Figura 20 – Citologia de aposição de lesão ulcerativa, citologia otológica e esfregaço sanguíneo, animal nº 4 (ampliações: 100x, 400x, 1000x).

A a C – citologia por aposição de lesão ulcerativa na zona do olecrânio; inflamação supurativa com presença de neutrófilos, redes de fibrina e detritos epiteliais; D – citologia otológica; E – tricograma (anagénesse); F – lesão ulcerativa na zona do olecrânio compatível com ferida de decúbito; G e H – esfregaço sanguíneo.

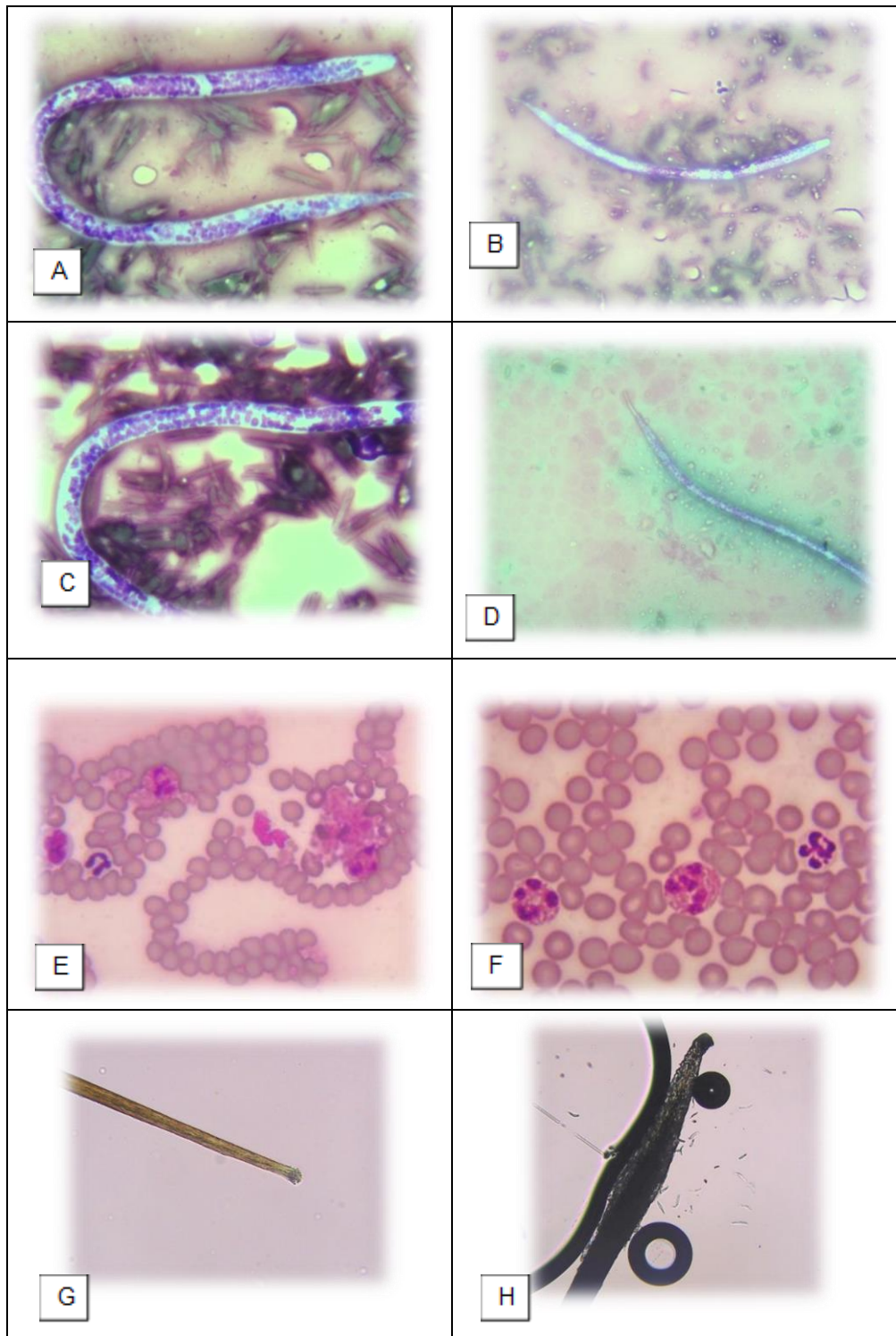


Figura 21 – Esfregaço sanguíneo, microfilarémia e tricograma do animal nº 9 (ampliações: 1000x e 100x).

A a D – microfíliarias, terminação anterior de espaço cefálico curto e desprovido de células, terminação posterior reta, presença de anel nervoso e genitália, técnica de esfregaço de sangue periférico após congelação; E e F – eosinófilia (*feathered edge*); G e H – tricograma com ponta do pelo danificada e telogénese.

O animal nº 20 tinha uma ascite ligeira, soro lipémico, sendo notória a idade avançada. Apresenta-se, em anexo, um quadro com as imagens mais relevantes obtidas no esfregaço sanguíneo realizado a este animal, nomeadamente, a presença de neutrófilos maduros, hipersegmentados, linfócitos atípicos, eosinófilos e monócitos (Fig. 22).

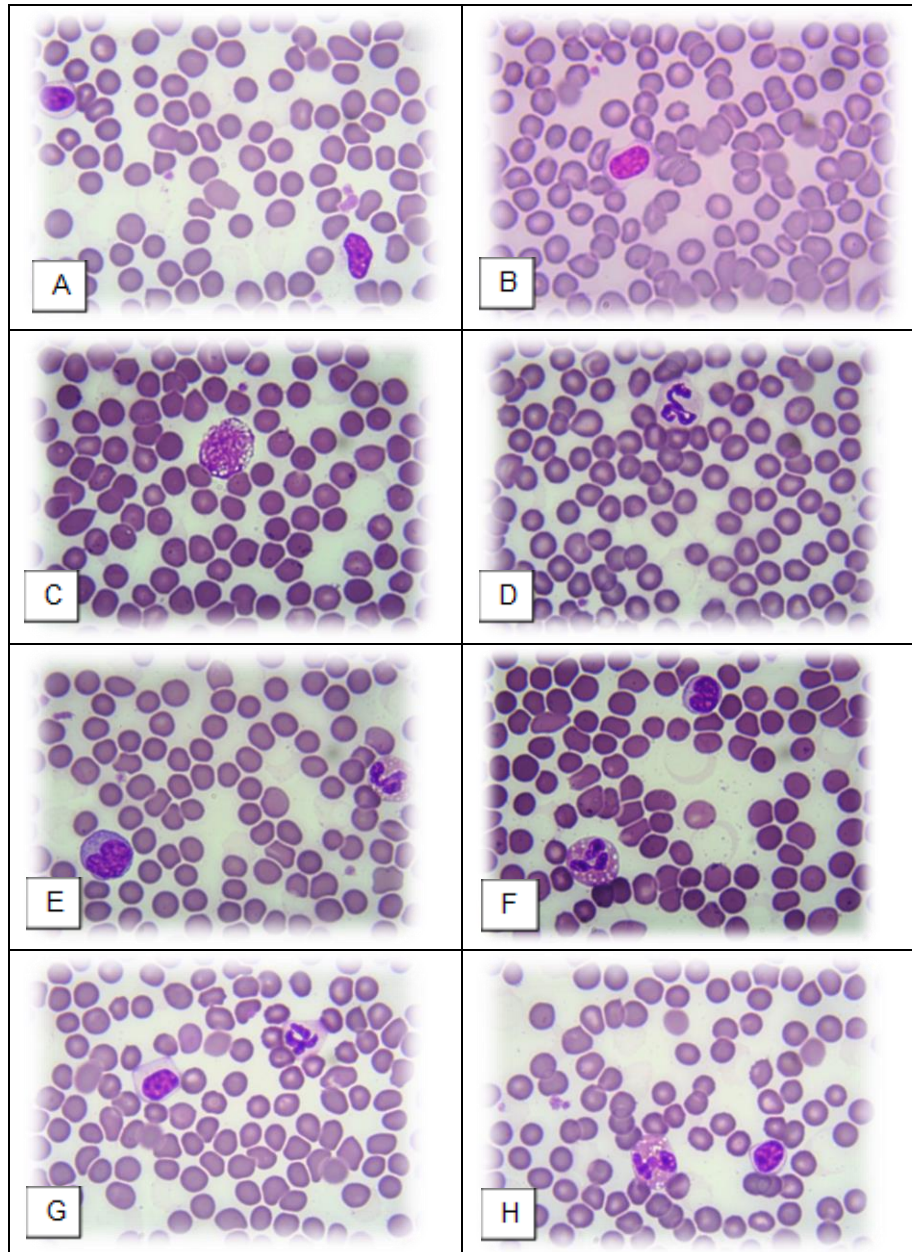


Figura 22 – Esfregaço sanguíneo do animal nº 20 (ampliação: 1000x).

A, B e G – linfócitos reativos (e neutrófilo hipersegmentado); C – monócito com vacúolos citoplasmáticos, possivelmente de material fagocitado; D – neutrófilo hipersegmentado; E – linfócito e eosinófilo; F – eosinófilo e linfócito; H – eosinófilo e linfócito.

Os animais não referidos neste subcapítulo são aqueles em que não se encontraram anomalias hematológicas, nem alterações a nível de fibrinogénemia (animais nº 3, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 17, 18 e 19), excluindo o animal nº 7, já referido no subcapítulo anterior.

3.3 Diagnóstico parasitológico

No presente estudo foi obtida uma prevalência parasitária geral de 50%, na população estudada (n = 20).

A realização de esfregaços sanguíneos e a sua observação ao microscópio, permitiu a confirmação de alguns dos dados obtidos no hemograma, via contador automatizado, mas o mais relevante foi a possibilidade de diagnosticar a presença de hemoparasitas.

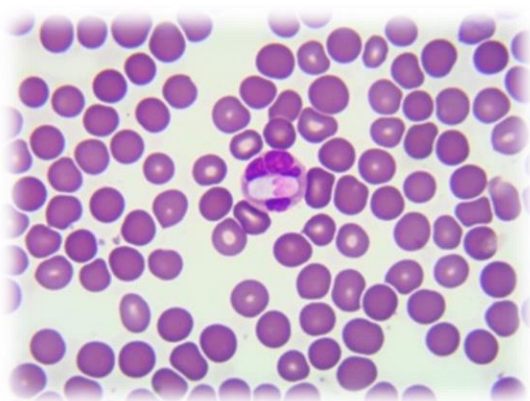


Figura 23 – Gamonte de *Hepatozoon canis* em neutrófilo, animal nº 7 (ampliação: 1000x).

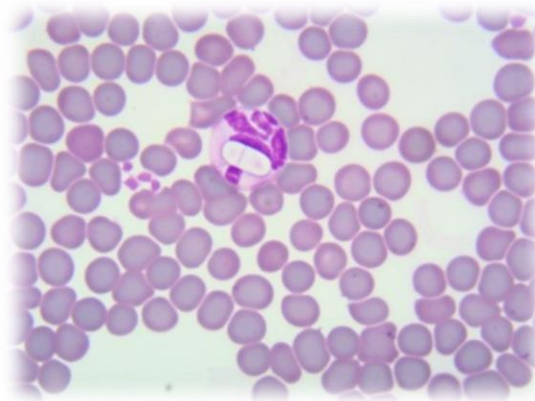


Figura 24 – Gamonte de *Hepatozoon canis* em monócito, animal nº 17 (ampliação: 1000x).

Nos esfregaços sanguíneos realizados ao grupo (n = 20), observaram-se gamontes de *Hepatozoon canis* em neutrófilos e monócitos dos animais nº 7, 17 e 18 (Fig. 19, 25 e 26), obtendo-se uma prevalência de 15% de infeção por *H. canis*. Nas Fig. 23 e 24 evidenciam-se aparentes diferenças morfológicas do gamonte, justificadas pela intensidade de coloração, sendo que na Fig. 23 é visível o núcleo excêntrico alongado, enquanto que na Fig. 24 o núcleo surge pálido, quase indistinguível. Note-se como o parasita promove o afastamento das estruturas nucleares dos leucócitos.

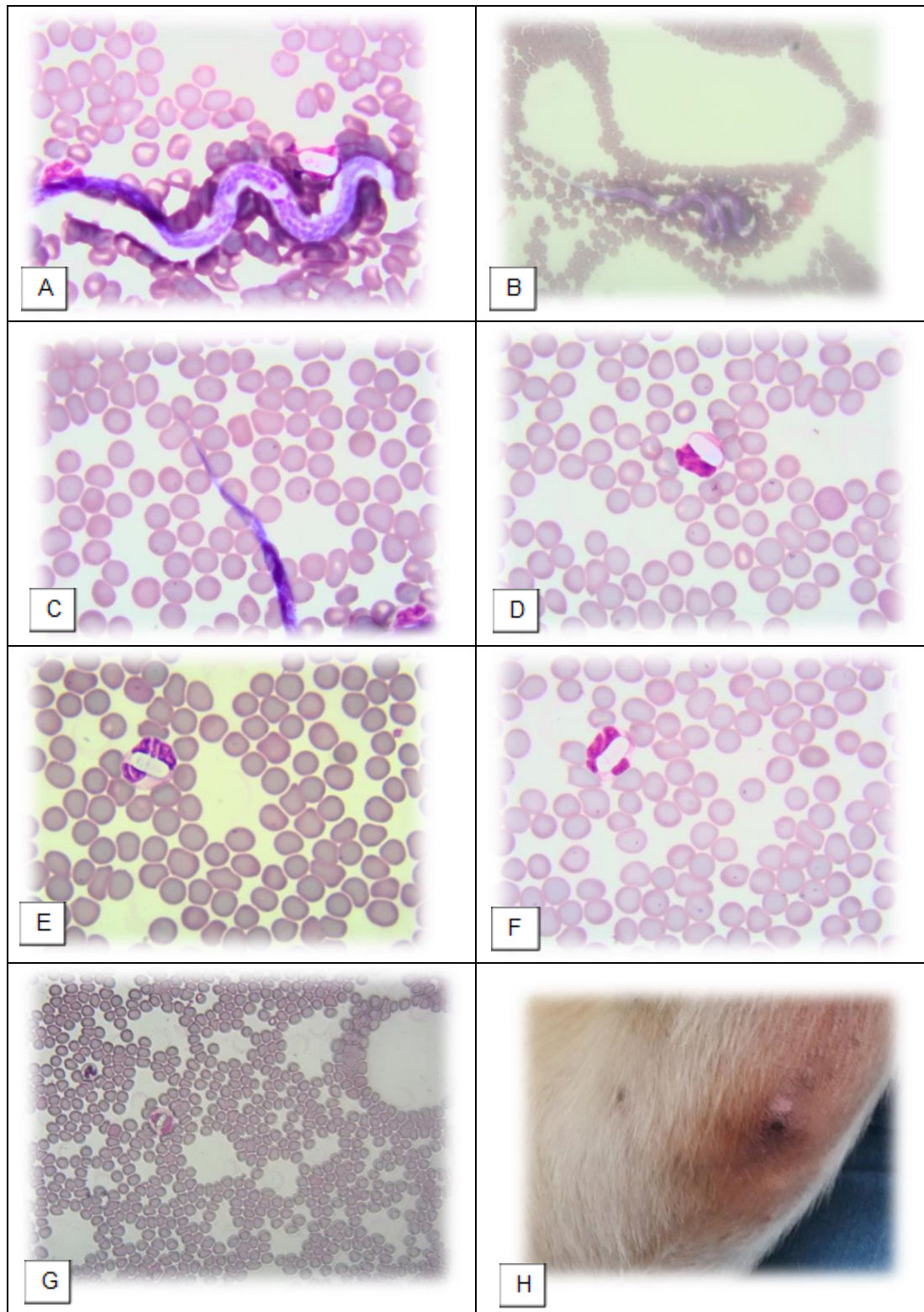


Figura 25 – Esfregaço sanguíneo, microfilarémia, *Hepatozoon canis* (ampliações: 1000x e 400x) e lesão dermatológica esternal do animal nº 17.

A – microfilaria e *H. canis*; B – microfilaria; C – extremidade posterior de microfilaria; D a G – gamontes alongados, elipsoidais, rodeados por membrana, com núcleo excêntrico alongado (*H. canis*); H – lesão dermatológica esternal.

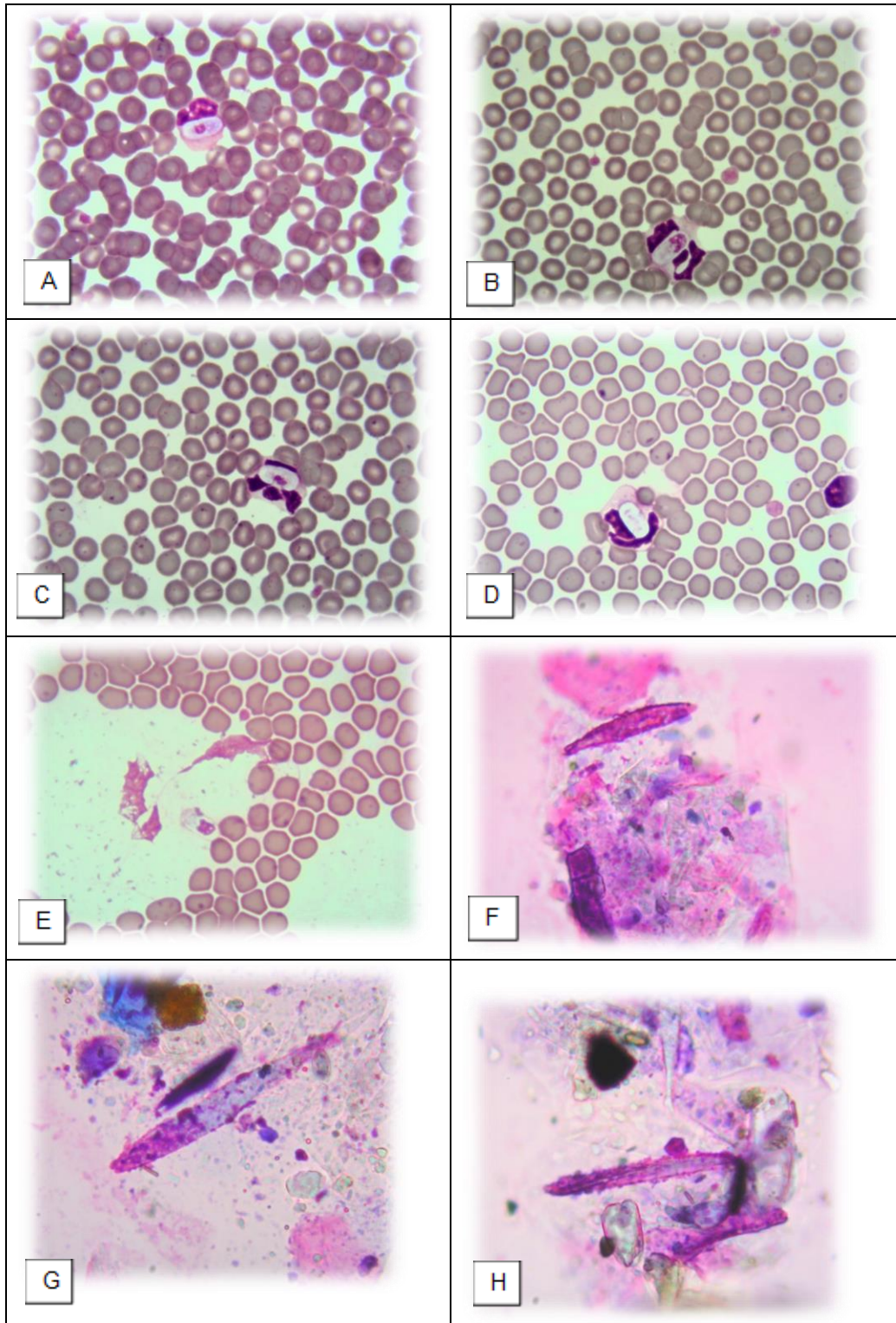


Figura 26 – Esfregaço sanguíneo, *Hepatozoon canis* e citologia por aposição do animal nº 18 (ampliação: 1000x).

A a E – gamontes de *H. canis*; F, G e H – contaminação fúngica da citologia por aposição (fungos ambientais).

A prevalência de microfilarémia nos esfregaços sanguíneos realizados foi de 15%, (positividade nos animais nº 8, 9 e 17, Fig. 21, 25, 27, 28 e 29). As microfílarias foram diagnosticadas como pertencentes à espécie *Dirofilaria immitis* pela observação de características fenotípicas, nomeadamente terminação anterior de espaço cefálico curto e desprovido de células, terminação posterior reta, presença de anel nervoso e genitália como se pode observar nas Fig. 27 e 28, onde se destaca adicionalmente o grande contraste produzido pela técnica de citologia de esfregaço sanguíneo após descongelação da amostra (Liotta, *et al.*, 2013).



Figura 27 – Microfilaria em esfregaço sanguíneo, animal nº 9, terminação posterior (ampliação: 1000x).

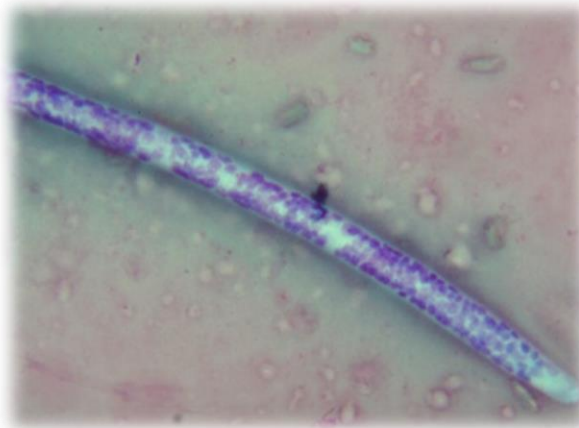


Figura 28 – Microfilaria em esfregaço sanguíneo, animal nº 9, terminação anterior (ampliação: 1000x).

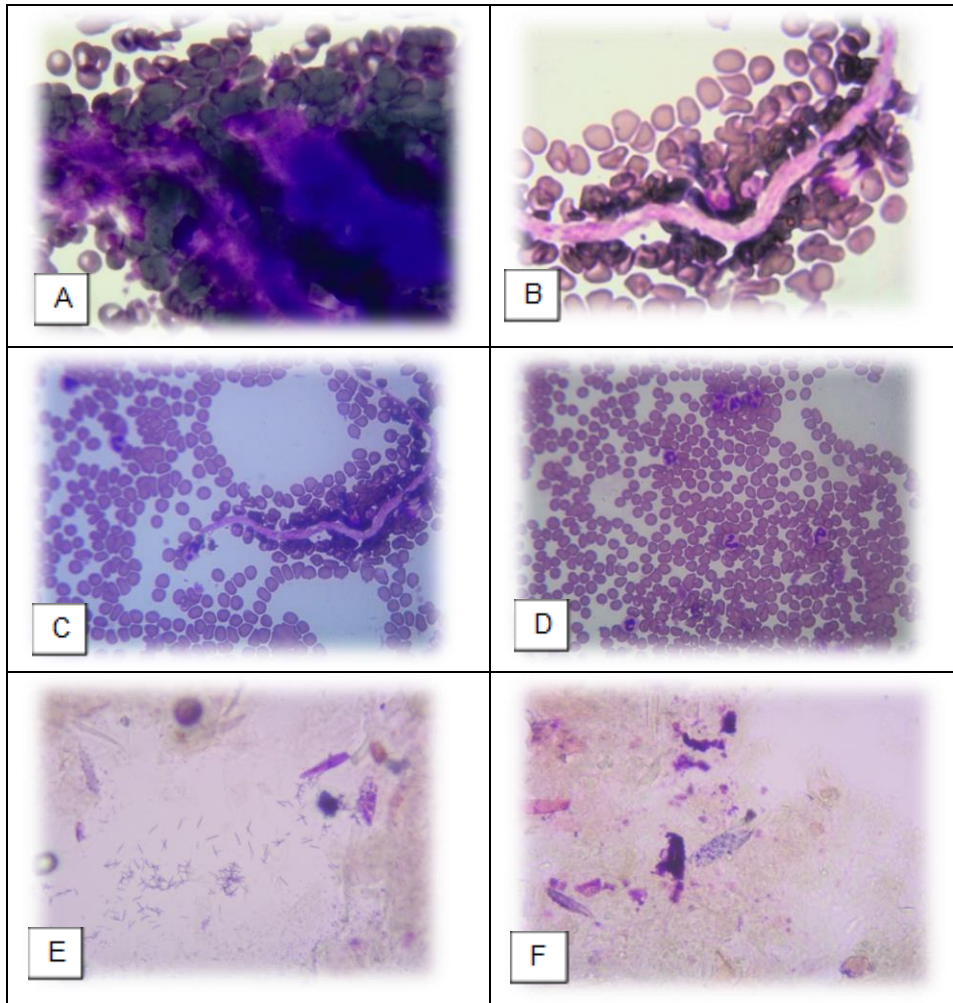


Figura 29 – Esfregaço sanguíneo, microfilarémia e citologia por aposição de lesão do animal nº 8 (ampliações: 400x e 1000x).

A a C – microfíliarias; D – população leucocitária normal visível na *feathered edge* do esfregaço sanguíneo; E e F – citologia por aposição de lesão cutânea, detritos epiteliais e contaminantes artefactuais.

No que respeita aos parasitas gastrointestinais, registou-se uma prevalência de 15% de infeção por *Dipylidium caninum*, justificada pela presença de proglotes nas fezes dos animais nº 5, 6 e 18, por observação direta em dois dos casos e confirmado no laboratório de parasitologia da Universidade de Évora para o nº 18, seguindo o protocolo de decantação, conforme descrito anteriormente. Na Fig. 30, evidencia-se a presença das cápsulas ovíferas no interior do proglote ovífero de *D. caninum*.

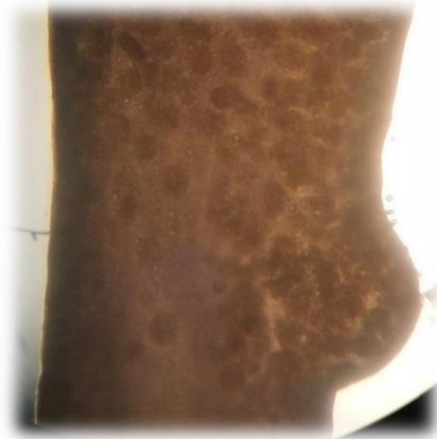


Figura 30 – Proglote ovífero de *Dipylidium caninum* (ampliação: 40x).

A prevalência de infeção por ancilostomatídeos foi de 10%, tendo sido identificados ovos nas amostras fecais dos animais nº 7 e 9 (Fig. 31). Foram identificados ovos de *Trichuris vulpis* no animal nº 7 (Fig. 32), correspondendo a uma prevalência de infeção de 5%. Na Fig. 32 verifica-se a morfologia característica do ovo de *T. vulpis*, destacando-se os opérculos bipolares transparentes, sendo observável uma ligeira deformação na estrutura externa, possivelmente devido ao processo de congelação a que foram sujeitas as amostras.



Figura 31 – Ovo de ancilostomatídeo (ampliação: 100x).



Figura 32 – Ovo de *Trichuris vulpis* (ampliação: 100x).

Foi encontrada uma forma suspeita de *Toxocara canis* no animal nº 2; forma suspeita de *Cystispora* sp. no cachorro do animal nº 3; suspeita de quistos de *Giardia* sp. no nº 1. As formas suspeitas não foram tidas em consideração para a análise estatística realizada no subcapítulo 3.5, Correlação sensibilização TID e diagnóstico parasitário.

No que respeita a ectoparasitas, foram detetados ixodídeos por exame visual, nos indivíduos nº 3, 6, 7 e 20, correspondendo a uma prevalência de infestação de 20% de *Rhipicephalus sanguineus*, identificados pelas características morfológicas descritas anteriormente.

Foi realizada profilaxia ectoparasitária a alguns dos animais do grupo, previamente à sua participação no estudo, com administrações tópicas de fipronil (Eliminall®, Pfizer, EUA), imidaclopride a 10% e permetrina a 50% (Advantix®, Bayer, Alemanha) e desparasitação interna através da administração oral de comprimidos de praziquantel, fenbendazol e pirantel (Praziquan®, CEVA, França), previamente à recolha de amostras fecais para diagnóstico parasitológico e realização dos testes intradérmicos, por se tratar de uma medida implementada no manejo dos animais no canil. Verificou-se que nos animais sujeitos a profilaxias antiparasitárias (fi = 12), ocorreu uma prevalência de parasitas gastrointestinais e/ou ectoparasitas de 33% (4 indivíduos em 12 desparasitados).

O animal nº 1 obteve o diagnóstico sorológico de leishmaniose, em data posterior ao estudo, e previamente teve o diagnóstico de onchocercose, por histopatologia. À data da realização do estudo tinha sido realizado tratamento médico para esta última parasitose, num estudo paralelo realizado por outra instituição com as substâncias de moxidectina e imidaclopride. Na Fig. 33 é visível a uveíte causada por *Onchocerca lupi* (tendo-se verificado a recuperação ocular completa, em data posterior), imagens da citologia por aposição realizada a uma das várias lesões ulcerativas que este animal apresentava, com presença de inflamação piogranulomatosa, população mista neutrofílica e macrófagos, queratinócitos e material proteico fagocitado intracitoplasmático suspeito de amastigotas de *Leishmania* sp.

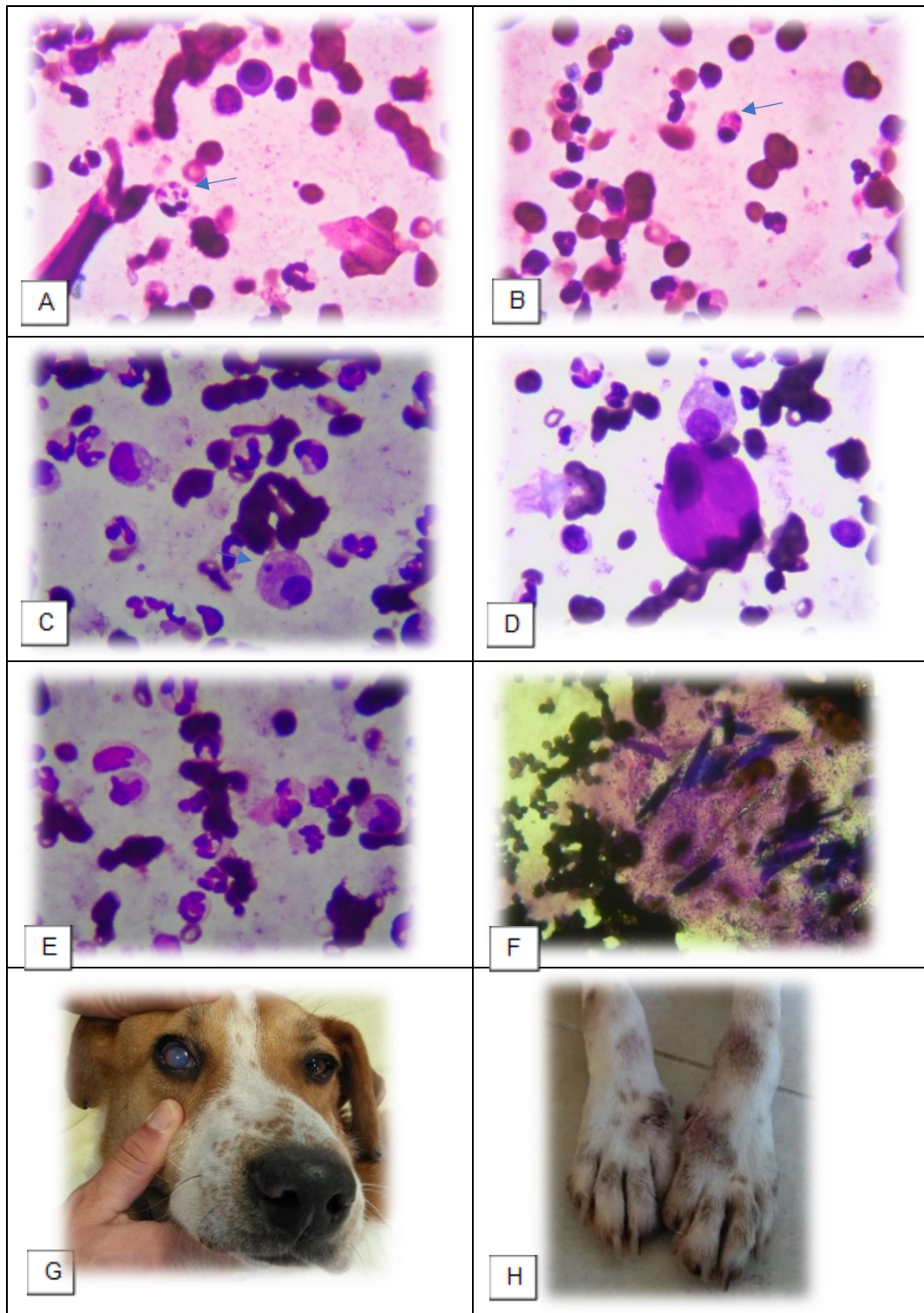


Figura 33 – Citologia por aposição de lesão cutânea e esfregaço sanguíneo do animal nº 1 (ampliações: 1000x e 400x).

A a F – citologia de processo inflamatório do tipo piogranulomatoso. Observam-se vários polimorfonucleares neutrófilos, macrófagos com vacúolos evidentes, linfócitos, queratinócitos e material proteico fagocitado, intracitoplasmático, suspeito de amastigotas de *Leishmania* sp. (setas); G – uveíte por *Onchocerca lupi* e dermatite ulcerativa das margens auriculares, por *Leishmania* sp.; H – lesões distais nos membros torácicos.

3.4 Testes intradérmicos

Considerando as respostas de reatividade cutânea aos extratos comerciais dos ácaros do pó e de armazenamento em estudo, via teste intradérmico, obtida por indivíduo, e, consistindo o espaço amostral em respostas avaliadas subjetivamente de 0 a 4+ (sendo 0 e 1+ consideradas respostas negativas e 2+, 3+ e 4+ consideradas respostas positivas), obtiveram-se os seguintes resultados: 12 indivíduos ($f_i = 12$, $f_r = 60\%$) do grupo ($n = 20$) apresentaram respostas positivas aos extratos alergénicos testados; a média de número de respostas positivas por indivíduo foi de $1,4 \pm 1,3$; a média do número de respostas negativas por indivíduo foi de $4,6 \pm 1,3$; o somatório da ocorrência do número mínimo de respostas no grupo foi 51 ($\Sigma 0 = 51$; $n = 120$; 42,5%); o somatório da ocorrência de número máximo de respostas no grupo foi 15 ($\Sigma 3+ = 15$; $n = 120$; 12,5%); o somatório de indivíduos que tiveram pelo menos uma resposta TID classificada como o valor mínimo do espaço amostral foi de 19 indivíduos ($\Sigma 0 = 19$; $n = 20$; 95%); e o somatório de indivíduos que tiveram pelo menos uma resposta TID classificada com o valor máximo verificado neste estudo, correspondente a 3+, foi de 7 indivíduos ($\Sigma 3+ = 7$; $n = 20$; 35%). Por fim, salienta-se que todos os animais apresentaram reatividade positiva ao controlo positivo e reatividade negativa ao controlo negativo, conforme pode ser verificado na tabela 5.

Tabela 5 – Classificações aos testes intradérmicos do grupo.

ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Der p	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+
Der f	+++	+++	++	+	+	++/+++	-	+	+	+
Aca s	++	+++	+	-	+	++/+++	-	-	-	-
Lep d	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
Tyr p	++/+++	+++	+	+	+	+	+	-	-	-
Eur m	-	-	-	-	+	++/+++	+	-	-	-
Controlo positivo	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Controlo negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ID	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Der p	-	-	-	-	-	-	+	-/+	-	-
Der f	++	+++	++	+	+	++	+ / ++	+	-	++
Aca s	+	++	-	++	+	-	-	++/+++	-	+
Lep d	+	+++	+	+	+	-	-	+++	-	+++
Tyr p	++	+	+++	-	+	-	++/-	+	-	-
Eur m	-	++	-	-	+	++/+++	++	-	-	-
Controlo positivo	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
Controlo negativo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ocorreram respostas de reatividade cutânea positivas a cinco dos seis ácaros em estudo, tendo sido apenas para o extrato de *D. pteronyssinus* que ocorreu a ausência de respostas positivas. Para esse extrato comercial, as respostas obtidas foram classificadas em 0 ($f_i = 13$) e 1+ ($f_i = 7$). Nos restantes extratos testados, ocorreram respostas dentro do espaço amostral (0 a 4+), salientando-se que para os extratos de *L. destructor* não se verificaram respostas classificáveis como 2+. Por fim, refere-se que nenhum teste obteve a classificação de nível 4+ para os extratos alergénicos testados.

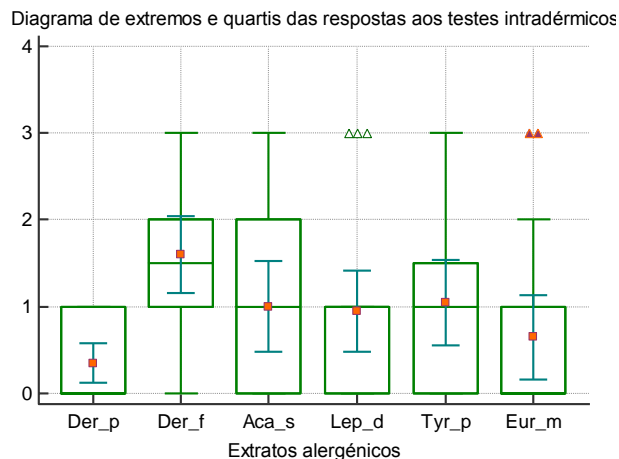


Gráfico 6 – Diagrama de extremos e quartis das respostas aos testes intradérmicos, por extrato alergénico.

A média das respostas cutâneas nos TID, considerando todas as respostas possíveis por extrato alergénico, está graficamente demonstrada no diagrama de extremos e quartis, apresentado no gráfico 6 e consiste nos seguintes resultados médios: *D. pteronyssinus* ($0,35 \pm 0,48$); *D. farinae* ($1,6 \pm 0,92$); *A. siro* ($1 \pm 1,1$); *L. destructor* ($0,95 \pm 0,97$); *T. putrescentiae* ($1,05 \pm 1,02$) e *E. maynei* ($0,65 \pm 1,01$).

Cruzando a informação disponível no gráfico 6 e na tabela 6, salienta-se que se verificaram as respostas médias mais elevadas para os extratos de *D. farinae*, com reações positivas ocorrendo em metade dos indivíduos do grupo ($fi = 10$, 50%) e que os extratos de *D. pteronyssinus* e *E. maynei* foram os que apresentaram as respostas médias mais baixas, com apenas quatro respostas positivas para este último ($fi = 4$; 20%).

Foi realizada uma análise estatística simples, na qual se comparou o subgrupo de animais de raça indeterminada ($fi = 7$) com o subgrupo de animais filogeneticamente pertencentes a uma determinada raça ($fi = 13$) e de onde se obteve que os animais de raça indeterminada apresentaram menor frequência de reações positivas aos extratos alergénicos ($fi = 3$; 43%) quando comparados ao subgrupo de raças ($fi = 8$; 61%). No entanto, realizando uma correlação de *Pearson*, obtiveram-se valores de $r = 0,30$ ($p < 0,2$) e $r = 0,25$ ($p < 0,3$), respetivamente, para o número de respostas positivas e para a positividade observada, ou seja, valores considerados estatisticamente pouco expressivos.

Tabela 6 – Frequências absoluta e relativa para as diferentes respostas verificadas nos testes intradérmicos, por extrato alergénico.

Resposta IDT	Frequência absoluta	Frequência relativa (%)
<i>Dermatophagoides pteronyssinus</i>		
0	13	65
1	7	35
<i>Dermatophagoides farinae</i>		
0	2	10
1	8	40
2	6	30
3	4	20
<i>Acarus siro</i>		
0	9	45
1	5	25
2	3	15
3	3	15
<i>Lepidoglyphus destructor</i>		
0	7	35
1	10	50
3	3	15
<i>Tyrophagus putrescentiae</i>		
0	7	35
1	8	40
2	2	10
3	3	15
<i>Euroglyphus maynei</i>		
0	13	65
1	3	15
2	2	10
3	2	10

Quanto à idade, não se observou correlação significativa com o número de respostas positivas TID ($r = 0,16$; $p < 0,5$) ou com a positividade ($r = 0,12$; $p < 0,6$) dos TID.

No que respeita ao sexo, obteve-se $r = 0,46$ ($p < 0,05$) entre o sexo masculino e o número de respostas positivas nos TID. No entanto, não se verificou correlação entre o sexo e a positividade TID ($r = 0,26$; $p < 0,3$).

Relativamente à possibilidade de reações cruzadas e/ou co-sensibilização entre os extratos alergénicos em estudo, avaliou-se a possibilidade de ocorrência de correlação entre a intensidade da resposta nos TID, entre as espécies alergénicas, aos pares. Os valores de correlação (r) obtidos encontram-se representados na tabela 7, permitindo a construção do gráfico 7. O coeficiente de correlação para cada par de variáveis foi considerado estatisticamente significativo para os pares *A. siro* – *L. destructor* ($r = 0,61$; $p < 0,01$), *A. siro* – *D. farinae* ($r = 0,55$; $p < 0,05$) e *D. farinae* – *T. putrescentiae* ($r = 0,55$; $p < 0,05$).

Tabela 7 – Correlação de pares para as reatividades cutâneas obtidas para os diferentes extratos alergénicos em estudo.

Correlation table

		Der_p	Der_f	Aca_s	Lep_d	Tyr_p	Eur_m
Der_p	Correlation coefficient		-0,023	0,287	0,038	0,169	0,253
	Significance Level P n		0,9237 20	0,2197 20	0,8746 20	0,4763 20	0,2811 20
Der_f	Correlation coefficient	-0,023		0,548	0,370	0,554	0,334
	Significance Level P n	0,9237 20		0,0124 20	0,1084 20	0,0112 20	0,1505 20
Aca_s	Correlation coefficient	0,287	0,548		0,610	0,312	0,090
	Significance Level P n	0,2197 20	0,0124 20		0,0043 20	0,1803 20	0,7057 20
Lep_d	Correlation coefficient	0,038	0,370	0,610		0,053	-0,068
	Significance Level P n	0,8746 20	0,1084 20	0,0043 20		0,8254 20	0,7744 20
Tyr_p	Correlation coefficient	0,169	0,554	0,312	0,053		-0,080
	Significance Level P n	0,4763 20	0,0112 20	0,1803 20	0,8254 20		0,7389 20
Eur_m	Correlation coefficient	0,253	0,334	0,090	-0,068	-0,080	
	Significance Level P n	0,2811 20	0,1505 20	0,7057 20	0,7744 20	0,7389 20	

Pearson correlation coefficient

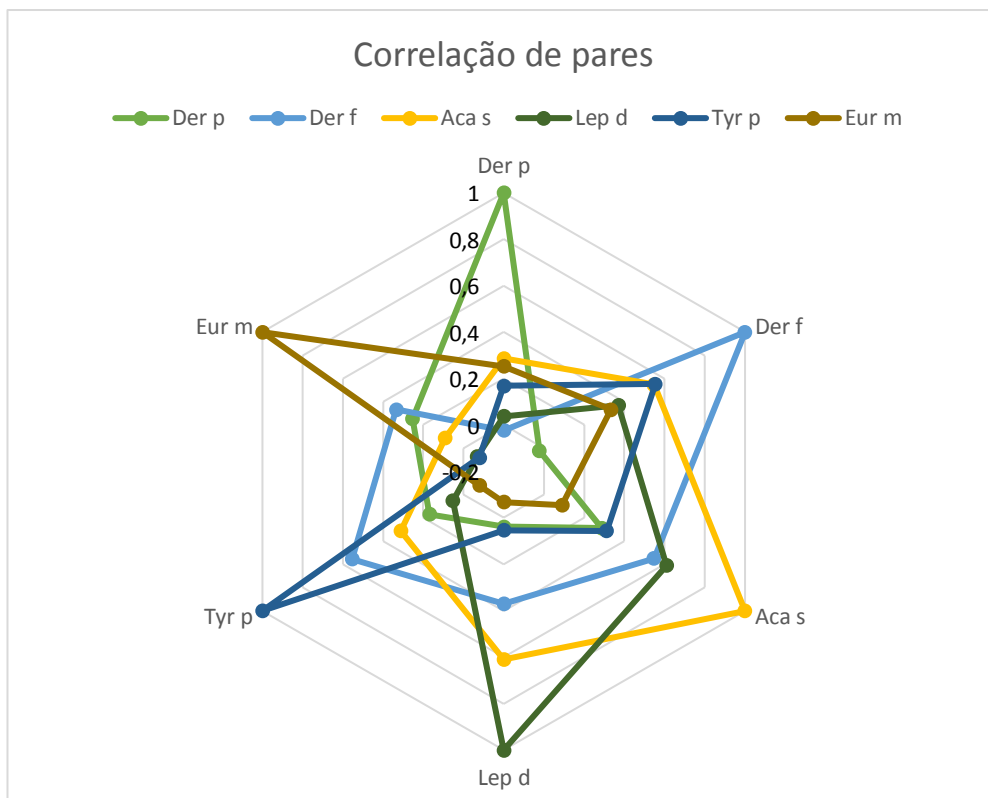


Gráfico 7 – Correlação de pares para as diferentes respostas por extrato alergénico.

Nas figuras abaixo são exemplificadas as respostas TID obtidas no grupo. Na Fig. 34, observa-se um teste intradérmico com respostas negativas aos extratos alergénicos em estudo, referente ao indivíduo nº 8, apresentando apenas uma resposta 1+ (considerado negativo) no segundo ponto de inoculação, relativo a *D. farinae*, uma resposta 4+ ao controlo positivo, no sétimo ponto de inoculação, e resposta 0 nos restantes pontos de inoculação, incluindo no oitavo ponto de inoculação, relativo ao controlo negativo.



Figura 34 – Teste intradérmico negativo aos extratos alergénicos em estudo.

Na Fig. 35 observam-se duas respostas positivas 2+, nos pontos de inoculação dois e cinco, correspondentes a *D. pteronyssinus* e *T. putrescentiae*, para o indivíduo nº 11.



Figura 35 – Teste intradérmico positivo aos extratos alergénicos *Dermatophagoides pteronyssinus* e *Tyrophagus putrescentiae*.

Enquanto nas Fig. 36, 37, 38 e 39, correspondentes aos TID realizados aos indivíduos nº 2, 6, 12 e 13, podemos observar respostas positivas 2+ e 3+, para vários dos extratos alergénicos testados, a título exemplificativo.



Figura 36 – Teste intradérmico positivo a *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro* e *Tyrophagus putrescentiae*.



Figura 37 – Teste intradérmico positivo a *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro* e *Euroglyphus maynei*.



Figura 38 – Teste intradérmico positivo a *Dermatophagoides farinae* e *Tyrophagus putrescentiae*.



Figura 39 – Teste intradérmico positivo a *Dermatophagoides farinae*, *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor* e *Euroglyphus maynei*.

3.5 Correlação entre sensibilização (TID) e diagnóstico parasitário

Não se observou correlação entre a ocorrência de parasitismo, no geral, e a sensibilização (mínimo uma resposta positiva a um extrato alergénico nos TID) ($r = 0$; $p = 1$). Para a mesma variável de parasitismo correlacionada com a variável número de respostas positivas verificadas por indivíduo aos extratos alergénicos, obteve-se um resultado igualmente não significativo. No entanto, quando se correlacionaram apenas as espécies parasitárias pertencentes à filo Nematoda e excluindo todas as restantes espécies parasitárias diagnosticadas, obteve-se uma correlação negativa ($r=-0,41$) significativa (para um nível de significância a 10%, $p<0,08$). Adicionalmente, para as mesmas variáveis obteve-se um valor estatisticamente significativo, para o coeficiente de correlação de postos de Kendall, de ($\tau = -0.371$; $p< 0,05$), como pode ser verificado na tabela 8.

Tabela 8 – Correlação entre a prevalência de Nematoda e reatividade cutânea positiva aos testes intradérmicos.

Rank Correlation

Variable Y	Nematoda
Variable X	Positividade
Sample size	20
Spearman's coefficient of rank correlation (rho)	-0,380
Significance level	P=0,0981
95% Confidence Interval for rho	-0,704 to 0,0747
Kendall's Tau	-0,371
Significance level	P=0,0180
95% Confidence Interval for Tau ^a	-0,689 to 0,190

^a BC_a bootstrap confidence interval (500 iterations; random number seed: 978).

No entanto, considerando a variável prevalência parasitária, tendo em conta a espécie parasita e o efeito imunológico esperado, correlacionada com a variável resposta positiva aos extratos alergénicos em estudo, obtém-se um coeficiente de correlação de $r = -0,7$ ($p < 0,001$), para $n = 20$, com intervalo de confiança de 95% de -0,87 a -0,37 (tabela 9) e coeficiente de determinação (r^2) de 0,4898.

A probabilidade de significância traduz-se no valor p obtido, geralmente estabelecido pelos valores padrão $<5\%$ ou $<1\%$, sendo que quanto mais se aproxima de zero, maior a significância estatística de se rejeitar a hipótese nula, ou seja, que não existe relação entre as variáveis em estudo. Como se verifica na tabela 9 o valor p obtido foi de 0,0006, considerado extremamente significativo, numa relação inversa, uma vez que o r obtido apresentava um valor negativo.

Tabela 9 – Correlação entre as variáveis reatividade cutânea positiva aos testes intradérmicos e efeito parasitário imunológico.

Variable Y	Positividade
Variable X	Parasitas_Efeito
Sample size	20
Correlation coefficient r	-0,6999
Significance level	P=0,0006
95% Confidence interval for r	-0,8722 to -0,3728

Na variável anteriormente referida de efeito imunológico parasitário, foi tido em consideração o possível efeito imunológico provocado pelas diferentes espécies parasitárias diagnosticadas, de acordo com a bibliografia consultada, na sequência da exposição efetuada no capítulo referente à Imunologia Veterinária e será abordado mais detalhadamente no subcapítulo seguinte, relativo à discussão.

No caso de se considerar que as variáveis têm uma distribuição não-normal, pode expressar-se esta relação, aplicando o coeficiente de correlação não-paramétrico “rho” de Spearman (ρ). Neste caso, obtém-se $\rho = -0.694$ ($p < 0,001$), conforme se verifica na tabela 10. Este valor é muito aproximado do coeficiente de correlação obtido anteriormente, mantendo-se um elevado grau de significância estatística.

Tabela 10 – Correlação entre as variáveis reatividade cutânea positiva aos testes intradérmicos e efeito imunológico parasitário.

Variable Y	Positividade
Variable X	Parasitas_Efeito
Sample size	20
Spearman's coefficient of rank correlation (ρ)	-0,694
Significance level	P=0,0007
95% Confidence Interval for ρ	-0,870 to -0,364
Kendall's Tau	-0,660
Significance level	P<0,0001
95% Confidence Interval for Tau ^a	-0,800 to -0,420

^a BC_a bootstrap confidence interval (500 iterations; random number seed: 978).

Ao alterar a variável positividade TID anteriormente utilizada pelo número de respostas positivas aos extratos alergénicos e correlacionando-a com a variável prevalência parasitária tendo em conta o efeito imunológico, obteve-se um valor de correlação de $r = -0,61$ ($p < 0,001$), estatisticamente significativo.

Recorde-se que foram efetuadas as correlações de pares para os diferentes extratos de ácaros testados, no subcapítulo anterior, assim como as correlações entre a variável fibrinogénio e as variáveis em valor percentual de linfócitos, granulócitos e concentração de hemoglobina corpuscular média, no subcapítulo 3.2.

Por último, foi possível relacionar a quantificação percentual de eosinófilos com as variáveis obtidas para os TID, verificando-se que, tanto para a positividade nos TID, como para o número de resultados TID positivos, não se observou correlação estatisticamente relevante. No entanto, quando comparado a mesma variável percentual de eosinofilia com a prevalência parasitária, verificou-se uma correlação positiva ($r = 0,56$; $p < 0,05$).

4. Discussão

Tendo em conta a natureza permissiva, ausência de *stress* e um nível de dor provocado pelos testes intradérmicos considerado irrelevante, três dos animais em estudo (nº 9, 13 e 14) não foram sedados para a realização dos TID, tal como no estudo efetuado por Özkan & Uysal (2011). Não se observaram alterações nos testes em face desta abordagem, tendo em conta a avaliação semi-objetiva das respostas ao controlo positivo (4+). Nos animais que foram sedados, respeitou-se a dose recomendada pela literatura e referida anteriormente, sendo que a via subcutânea utilizada para administração de medetomidina resultou num início de ação tardio, na maioria dos animais, mas foi considerado eficaz para a técnica pretendida, escolhendo-se a dose entre os limites inferior e superior do recomendado, de acordo com a atitude e carácter dos indivíduos (Plumb, 2011; Ramsey, 2014).

Diferentes predisposições fenotípicas são, por vezes, referidas nos estudos de sensibilização a alérgenos e de patologias alérgicas. De acordo com o grupo dos animais em estudo, aceita-se que, como refere Babić *et al.* (2018), as raças mais prevalentes numa determinada área geográfica sejam aquelas em que se verificará uma maior prevalência de doença atópica canina, assim como de outras patologias alérgicas. Enquanto muitos autores concordam que raças como West Highland Terrier, Labrador Retriever, Golden Retriever, Boxer, Pastor Alemão, Bulldog Francês e Cocker Spaniel apresentam predisposição para DAC, um estudo levado a cabo na Hungria reconheceu a raça Vizsla como uma das mais afetadas e, na Austrália, a raça Cavalier King Charles. Implicitamente, e tendo em conta os resultados obtidos no presente estudo, podemos colocar duas questões: i) As raças de cães portuguesas apresentam predisposição genética e elevada prevalência de DAC? ii) Apresentará a indeterminação de raça um efeito protetor face à predisposição alérgica? No grupo estudado verificaram-se respostas de positividade nos TID menos prevalentes nos animais de raça indeterminada, quando comparados com os indivíduos de cruzados identificados com Pastor Alemão, Podengos e outras. No entanto, o grupo em estudo, relativamente pequeno, apresentou um caráter de *screening*, funcionando sobretudo como preliminar, pelo que não é possível retirar conclusões definitivas. Sugere-se que sejam realizados estudos adicionais para o desenvolvimento desta temática, com um grupo maior de animais, para averiguar a prevalência da condição alérgica nas raças nacionais e regionais, tais como Podengo, Cão-de-Água e Cão do Barrocal Algarvio, bem como estudos de correlação na prevalência de DAC entre raças indeterminadas e as raças mais prevalentes geograficamente. Igualmente, deverão realizar-se determinações das sIgE, bem como estudos de inibição da determinação de sIgE, para pesquisar fenómenos de reatividade cruzada entre espécies alérgicas e entre estas e as diferentes espécies de parasitas mais comuns (Özkan & Uysal, 2011; Bizikova *et al.*, 2015; Mueller *et al.*, 2016; Babić *et al.*, 2018).

Quanto à prevalência das respostas positivas por sexo, ainda que muitos autores apontem para a não ocorrência de predileção de género para DAC, outros testemunham um aumento de prevalência nas fêmeas e outros autores nos machos. Os resultados obtidos neste estudo, ainda que o número de animais testados seja muito limitado, estão em concordância com os resultados obtidos por Muller *et al.* (2000), num estudo realizado a 1000 canídeos, que refere uma maior prevalência de respostas positivas TID em machos (Özkan & Uysal, 2011; Bizikova *et al.*, 2015).

Por fim, para além da dificuldade encontrada na obtenção de uma anamnese razoavelmente completa, salienta-se que se verificaram lesões dermatológicas às quais não foi possível associar uma etiologia infecciosa ou alérgica. Considera-se que se possam ter desenvolvido na sequência das condições de alojamento e/ou eventualmente vícios comportamentais. As boxes em que os animais estão alojados são higienizadas diariamente, possuindo uma estrutura de madeira na qual se podem deitar. Em detrimento deste facto, verifica-se que frequentemente adotam posições de decúbito sob o pavimento rígido e molhado o que pode estar na etiologia das lesões dermatológicas verificadas e compatíveis com feridas

de decúbito. Por outro lado, não se pode excluir para alguns animais a presença de dermatite acral por lambedura, tendo em conta as condições de clausura a que estão sujeitos.

4.1 Hemograma

Quanto à leucocitose de $19,7 \times 10^9/L$ verificada no animal nº 2, esta deveu-se provavelmente a um aumento da população de granulócitos, acompanhado por valores hematológicos sugestivos de ligeira anemia regenerativa, hipocrômica macrocítica, trombocitose e aumento de plaquetócrito. Por visualização de esfregaço sanguíneo, observou-se heterogeneidade cromática e a presença de poucos neutrófilos em banda, insuficientes para se considerar um desvio à esquerda. Não se verificou eosinofilia (2,6%), nem foi confirmado a presença de infecção parasitária, ainda que neste animal tenha sido detetada uma forma suspeita de *Toxocara canis*, insuficiente para declarar o animal parasitado. O aumento de fibrinogénio verificado, foi o maior dentro do grupo, com um valor de 1000 mg/dl, quantificada a proteína plasmática 8,5 g/100 mL e sorológica de 7,5 g/100 mL. No exame do estado geral foi possível verificar a ocorrência de um ligeiro sopro cardíaco, corrimento ocular bilateral mucopurulento, prurido e diarreia intermitente alternada por períodos de obstipação. Quanto ao prurido, a sua identificação via tricograma foi impossibilitada pelo facto de ter sido realizada recentemente a tosquia do animal, no entanto, foram visíveis ao exame de estado geral a pseudo-pigmentação do pelo pela saliva, sugestivo de prurido e coincidente com as localizações anteriormente referidas de DAc, veja-se a Fig. 15. À data do estudo, o animal tinha sido resgatado pelo canil há 13 dias e o seu estado de desparasitação era desconhecido. No TID ocorreu reatividade cutânea a *D. farinae*, *A. siro* e *T. putrescentiae* (Fig. 36).

Quanto ao animal nº 3, verificou-se uma leucocitose de $18,4 \times 10^9/L$, acompanhada de eosinofilia de $20,9 \times 10^9/L$ e ligeira trombocitose. Esta lactante, acompanhada por um cachorro de aproximadamente um mês de idade, apresentava com uma infestação intensa de *Rhipicephalus sanguineus* e lesões dermatológicas nos locais de fixação dos parasitas, como se observa na Fig. 16. Nos exames dermatológicos complementares realizados, como o teste de fita-cola, citologia por aposição e tricograma, encontrou-se a fase de desenvolvimento piloso, maioritariamente em telogénese, não sendo observadas alterações clinicamente relevantes. A análise coprológica não relevou a presença de parasitas, porém no cachorro que a acompanhava encontrou-se uma forma suspeita de *Cystispora sp.* O animal deu entrada no canil no dia em que se efetuou o estudo, não estando desparasitado, mas havendo registo de imunização realizada para o vírus da esgana, adenovírus canino tipo 2, parvovírus canino, e vírus da parainfluenza canina. Apresentou reatividade cutânea positiva nos TID, para o extrato de *D. farinae*.

O único animal do grupo em que se verificou leucopénia ($5,2 \times 10^9/L$) foi o nº 16, traduzindo-se esta por uma ligeira diminuição da população total de granulócitos e encontrando-se a população de linfócitos quantificada no limite inferior ($1,0 \times 10^9/L$), confirmado por esfregaço sanguíneo (Fig. 17). Ao exame do estado geral, verificou-se espessamento auricular unilateral e estenose do canal auditivo, indicativo de sequela por otomatoma não sujeito a terapêutica

médica, eritema do plano nasal e dos espaços interdigitais, que aquando da reavaliação persistiram, feridas de decúbito bilaterais na zona dos olecrânios, ligeiro corrimento ocular bilateral seroso, úlceras na mucosa oral e ligeiro sopro cardíaco. Não foram encontradas formas parasitárias e testou positivamente ao TID aos extratos alergénicos de *D. farinae* e *E. maynei*. Encontrava-se no canil há 15 dias, à data do estudo, e desconhecia-se a realização de profilaxias anteriores.

Quanto ao animal nº 7, referido anteriormente na sequência de ter sido realizada a contagem leucocitária manual, obtendo-se valores de eosinofilia de 12,7%, neutrófilos de 55,7%, monócitos de 8,8% e linfócitos de 21,5%, verificou-se que a população eritrocitária apresentava heterogeneidade cromática, dispersão volumétrica e codócitos (raros), indicando resposta regenerativa, conforme representado na Fig. 19. A nível parasitológico, foram observados por técnica coprológica de flutuação, ovos de ancilostomatídeo e de *Trichuris vulpis*, gamontes de *Hepatozoon canis* por esfregaço sanguíneo e infestação por *Rhipicephalus sanguineus*. Encontrava-se no canil há 10 dias relativamente à data do estudo, desconhecendo-se antecedentes profiláticos. Do exame de estado geral destacou-se a presença de um corpo estranho na cavidade oral, que foi removido. Por último, não apresentou reatividade cutânea nos TID.

No que respeita à eosinofilia no grupo, confirmou-se neste estudo a sua relação com a prevalência parasitária ($r = 0,56$; $p < 0,05$), verificando-se como exceção o animal nº 15, que apresentou uma eosinofilia de 17,9% (Fig. 18), não se tendo diagnosticado quaisquer formas parasitárias. Neste animal não se verificaram outras alterações hematológicas, mas uma hiperfibrinogénemia de 800 mg/dl, acima do limite de normalidade para a espécie. O exame de estado geral apresentou-se normal.

Por outro lado, não foi possível relacionar a eosinofilia com a positividade nos TID.

Ao contrário do que sucede nas análises sanguíneas de humanos, para as quais o armazenamento a temperatura ambiente durante mais de um dia é aceitável, com poucas limitações para determinação dos parâmetros de hemograma e indiferente para os parâmetros leucocitários, no que respeita às amostras sanguíneas de canídeos, as variações no hemograma revelam-se significativas com a progressão do tempo de armazenamento, sobretudo se à temperatura ambiente. Realizaram-se estudos em que se calcularam quocientes de variação para amostras sanguíneas refrigeradas e mantidas à temperatura ambiente, analisadas às 0, 24 e 48 horas pós colheita, sendo que todos os parâmetros hematológicos demonstraram alterações exceto nos obtidos para os reticulócitos, nas amostras mantidas a 4º C. Ocorreram alterações na contagem de plaquetas a temperatura ambiente, na ordem dos 5%, e acima dos 10% nas subpopulações leucocitárias, às 48h, para conservação, tanto refrigeradas como à temperatura ambiente.

A premissa deste estudo é a de que os parâmetros hematológicos diferem consoante a conservação das amostras e o tempo de espera até à sua análise, e demonstrou-se que

variações moderadas podem ocorrer na análise sanguínea de canídeos, nomeadamente a nível de hematócrito, MCV, reticulócitos e MCHC. Tendo em conta que as amostras do grupo foram analisadas >12 horas após a sua colheita e sofreram variações nas temperaturas de armazenamento, uma vez que foram colhidas em Lagos e a analítica realizada em Loulé, a cerca de 80 Km de distância, justificam-se os valores obtidos, com ligeiros aumentos de hematócrito, diminuição da CHCM e aumento do VCM, sugerindo que, devido às condições de armazenamento e transporte podem ter ocorrido alterações de natureza hemolítica, interferentes, o que pode resultar em aumento irreal da CHMC, por exemplo (Bourgès-Abella *et al.*, 2014; Lee & Kang, 2016).

4.2 Fibrinogénio

As proteínas de fase aguda são produzidas em resposta a qualquer tipo de lesão tecidual, alterações metabólicas, endócrinas e imunológicas. A quantificação destas proteínas tem especificidade baixa, mas é um marcador sensível de inflamação, indicador de prognóstico e é utilizado para monitorizar diversas patologias. A função do fibrinogénio é a sua conversão em fibrina insolúvel durante a cascata da coagulação, permitindo a formação do coágulo (McGrotty *et al.*, 2016).

Pode estimar-se o valor da concentração de proteína para obtenção dos valores de fibrinogénio, com recurso ao refratómetro, que permite quantificar os solutos, através da refração produzida sobre a luz que atravessa o seu sistema prismático calibrado. São considerados fatores de interferência para a sua determinação no soro, a presença de hemólise e hiperlipidémia, entre outros, a ter, por isso, em consideração, apesar do refratómetro ser um método de densidade, não colorimétrico.

Os métodos convencionais para quantificação de fibrinogénio são o método de precipitação pelo calor e o método de Von Clauss. Valores elevados de fibrinogénio ocorrem na sequência de estímulo IL-6 e fator de necrose tecidual, com aumento da produção hepática de proteínas de fase aguda. Ocorre previamente a alterações leucocitárias de origem inflamatória e como tal, é um importante indicador diagnóstico precoce de processos inflamatórios. No presente estudo, foi ensaiada uma técnica alternativa para a quantificação do fibrinogénio, cuja replicabilidade dos valores obtidos pela técnica clássica já foi avaliada no estudo de Pivari *et al.*, (2016), como bons resultados ($r = 0,47$). A nova técnica revelou ser muito mais rápida e simples, sendo que, ao eliminarmos a necessidade de executar banhos-maria, e ao trocar a centrífuga de microhematócrito pela centrífuga de tubo, torna-se mais exequível na prática clínica de rotina (McGrotty *et al.*, 2016).

No estudo realizado por Vecina *et al.* (2006), observou-se hiperfibrinogénemia em 45.9% dos cães com leucogramas normais, em hemogramas realizados em triagem de ambiente hospitalar. Os valores obtidos na amostragem em estudo para esta dissertação foram muito semelhantes, sendo que 9 em 20 animais apresentaram hiperfibrinogénemia (gráfico 5), apenas um apresentou leucocitose, resultando, dessa forma, que 40% dos cães com leucogramas normais apresentaram hiperfibrinogénemia, consentaneamente com o estudo referido.

4.3 Diagnóstico parasitológico

É referido que temperaturas de congelação não são consideradas adequadas para conservação de amostras parasitológicas, no entanto, demonstrou-se ser possível efetuar com sucesso técnicas como a flutuação e decantação em amostras previamente sujeitas a congelação, tendo em conta os achados parasitológicos obtidos. As alterações que ocorreram durante o processo de congelação revelam-se em algumas alterações morfológicas nas formas parasitárias, podendo ainda influenciar os resultados nas análises quantitativas. Esse o motivo por se ter optado apenas pela análise qualitativa (Saari *et al.*, 2018).

Bowman (2013) refere que os ovos de *Ancylostoma* sp. são destruídos pela congelação, enquanto que os de *Uncinaria* sp. são muito resistentes a esse método de conservação. Por este motivo, pode inferir-se que o diagnóstico parasitológico de ancilostomatose consiste especificamente no diagnóstico de uncinarose.

Não foi possível confirmar o diagnóstico de *Giardia* sp., possivelmente devido à técnica de conservação das amostras. Zajac & Conboy (2012) referem que para a observação ao microscópio ótico de trofozoítos ou quistos de *Giardia* sp., as amostras fecais devem ser observadas até 30 minutos após a colheita da amostra fecal porque são muito perecíveis.

As prevalências obtidas no presente estudo foram semelhantes às prevalências parasitárias obtidas noutros estudos parasitológicos realizados no território nacional e na região sul do país, conforme se apresenta na tabela 11. Ainda que elevados, supõe-se que estes valores possam ser subestimados, nomeadamente no que respeita aos protozoários intestinais, devido às condicionantes de sensibilidade das técnicas utilizadas.

Salienta-se a importância da realização de esfregaços sanguíneos, como meio diagnóstico complementar, sempre que se realize uma colheita sanguínea. Apesar de apresentar taxas de sensibilidade limitadas, é um teste altamente específico para detetar hemoparasitas. A importância da realização deste exame complementar de diagnóstico não se limita ao diagnóstico parasitológico e permite identificar inúmeras alterações e anormalidades através da avaliação morfológica celular, permitindo adicionalmente monitorizar a evolução clínica dos animais.

A prevalência de parasitas gastrointestinais e/ou ectoparasitas em 33% dos animais sujeitos previamente a profilaxia desparasitante alerta-nos para a importância das medidas profiláticas realizadas adequadamente, sendo que as falhas na profilaxia podem culminar no desenvolvimento de resistências aos fármacos e surgimento de estirpes resistentes, com risco acrescido de doença para animais e humanos.

Tabela 11 – Prevalências das espécies parasitárias diagnosticadas no presente estudo, em Portugal continental e nas cidades de Lagos, Beja, Serpa e na região do Algarve, Portugal.

Parasita	Prevalência	Universo estatístico	Localização	Fonte
<i>Ancylostomatinae</i>	10%	20	Lagos	Presente estudo
	3,7%	27	Lagos	(Owen, 2017)
	25%	122	Beja	(Braga, 2017)
	24%	50	Serpa	(Silva, 2017)
<i>Trichuris vulpis</i>	5%	20	Lagos	Presente estudo
	3,7%	27	Lagos	(Owen, 2017)
	2%	122	Beja	(Braga, 2017)
<i>Dipylidium caninum</i>	15%	20	Lagos	Presente estudo
	4%	50	Serpa	(Silva, 2017)
Microfilarémia	15%	20	Lagos	Presente estudo
	5,3%	331	Portugal continental	(Menn, Lorentz & Naucke, 2010)
<i>Dirofilaria immitis</i>	15,1%	696	Portugal continental	(Alho <i>et al.</i> , 2014)
	14,8%	135	Algarve	(Ferrão, 2018)
	21,4%	14	Lagos	(Ferrão, 2018)
	2,1%	331	Portugal continental	(Menn <i>et al.</i> , 2010)
	5%	266	Beja	(Braga, 2017)
<i>Hepatozoon canis</i>	15%	20	Lagos	Presente estudo
	21,1%	331	Portugal continental	(Menn <i>et al.</i> , 2010)
	3,1%	1010	Portugal continental	(Almeida, 2015)

Cabe ao médico veterinário a importante função de sensibilizar os tutores de animais de companhia para a aplicação de medidas de controlo nos animais e, quando necessário também no ambiente, selecionar e indicar os princípios ativos mais adequados, respeitando a dosagem indicada para o peso do animal, bem como oferecendo indicações específicas no tempo de ação dos fármacos utilizados.

Evidencia-se a importância da realização de despistes diagnósticos parasitários, tendo em conta o potencial zoonótico de algumas parasitoses e, particularmente, que muitas infeções parasitárias são assintomáticas.

Espera-se que este estudo seja uma contribuição para a consciencialização das prevalências parasitárias elevadas, existentes no Sul de Portugal, e a instituição de futuros programas de controlo.

4.4 Testes intradérmicos

A sensibilização, traduzida laboratorialmente por níveis de sIgE >0,35 kU/L ou resposta positiva em teste intradérmico, é um dado diagnóstico e não traduz a presença ou severidade

dos sintomas. A resposta positiva nos TID, por si só, não fornece o diagnóstico definitivo de DAC por apresentar baixa correspondência à ocorrência de alergia clínica, sendo que, um elevado número de cães saudáveis estão sensibilizados pelos alérgenos ambientais e apresentam reatividade cutânea. Tendo isto em consideração, os objetivos na realização dos TID são a identificação do espectrotipo, visando a formulação da imunoterapia dessensibilizante específica ou a evicção do contacto com espécies alérgicas identificadas. É impossível determinar se os resultados positivos se traduzem em DAC sem ter conhecimento da anamnese dos animais (Custovic *et al.*, 2005; Favrot, 2015; Mueller *et al.*, 2016).

Nos animais em estudo, que vivem em regime de resgate temporário em canil, e tendo em conta que não é possível obter a história clínica, na grande generalidade dos casos, a tarefa diagnóstica foi dificultada. Porém, tendo em conta os exames dermatológicos complementares executados, podemos aferir que, dos 12 animais com comprovada reatividade cutânea a ácaros domésticos, o animal nº 2 foi o que apresentou o fenótipo mais compatível com DAC.

Ainda que a prevalência de ácaros domésticos em Portugal seja praticamente desconhecida, concentrando-se os dados disponíveis em poucas cidades portuguesas e datados de há algumas décadas, de acordo com o referido no capítulo referente aos ácaros domésticos, aceita-se que existam variações geográficas de maior predominância para *D. pteronyssinus* e para *D. farinae*. No entanto, é comum que em canídeos ocorra reatividade mais consistentemente a *D. farinae* do que a *D. pteronyssinus* (Mueller *et al.*, 2016).

Nos processos alérgicos, Mueller *et al.* (2000) estudou a sensibilidade de 1000 cães a aero-alérgenos, concluindo que um terço dos animais atópicos respondem a *D. farinae*, sendo estes ácaros do pó doméstico os alérgenos mais comuns. Este estudo não foi exceção, sendo que efetivamente ocorreram respostas de positividade consistentes nos TID a *D. farinae*.

No que respeita às concentrações dos extratos alérgicos, recorde-se que para todos os extratos comerciais utilizados a concentração era de 100 PNU/ml, salientando-se que as unidades PNU/mL indicam apenas a quantidade de proteínas presentes no extrato e a quantidade de proteínas não está necessariamente relacionada à quantidade de alérgenos presentes no extrato. Vários estudos visaram determinar as concentrações ótimas para a administração dos extratos alérgicos em TID, em canídeos, obtendo-se valores ótimos na ordem de 100-250 PNU/mL para *D. pteronyssinus*, 75-100 PNU/mL para *D. farinae*, *T.putrescentiae* e *L. destructor*, de 50 PNU/mL para *A. siro*, não se tendo encontrado referência para estudos com concentração ótima de *E. maynei* em canídeos (Hensel *et al.*, 2004; Bauer *et al.*, 2010; Cunha *et al.*, 2012).

Paralelamente, também para *T.putrescentiae*, num estudo com animais saudáveis e atópicos, foi verificado que não houve diferença na incidência de reações positivas, sendo que um terço dos animais, de ambos os grupos, demonstraram reatividade cutânea à administração TID de 1000 PNU/mL (Mueller *et al.*, 2005). Adicionalmente, no estudo de Koebrich *et al.* (2012),

verificou-se a reatividade cutânea em 7 de 17 beagles saudáveis utilizando concentrações de 250 PNU/mL.

Algumas questões se colocaram: i) Será possível que se a concentração do extrato comercial de *D. pteronyssinus* utilizado neste estudo fosse mais elevada, teríamos observado maior reatividade no grupo?; ii) Será que a prevalência do ácaro é baixa e os animais não se encontram sensibilizados aos seus alérgenos? Ou iii) Estarão presentes os grupos alérgicos *major* presentes na forma intacta/sensibilizante do extrato comercial utilizado? Considera-se que as concentrações utilizadas foram adequadas, exceto para Der p. No entanto, não se descarta a hipótese de que se fossem mais elevadas para os restantes extratos de ácaros, teriam ocorrido reações cutâneas de maiores dimensões e possivelmente em maior número, sem que esses aumentos correspondessem a falsos positivos devido a reação irritante. Para definir o limite inferior das concentrações tidas como irritantes (ITC) para TID em canídeos, Bauer *et al.* (2010) utilizou concentrações 1000-8000 PNU/mL, concluindo que apesar de serem concentrações muito elevadas, pode-se testar os animais com concentrações mais elevadas, sem que isso provoque uma reação irritante. Este estudo contraria o pressuposto que falsos positivos podem ocorrer se concentrações TID elevadas forem utilizadas. Portanto, é mais assertivo que uma reação de positividade se deve a sensibilização, ainda que o animal se apresente assintomático, do que a reação irritante. Para responder à questão da prevalência colocada seria necessário realizar estudos adicionais e para saber se os grupos *major* estão presentes na formulação, seria necessário realizar a purificação dos extratos e a identificação dos grupos presentes via SDS-PAGE (Mueller *et al.*, 2005).

Por fim, no que respeita à ocorrência de reações cruzadas e/ou sensibilização, vários estudos relatam as diferentes co-sensibilizações/reações cruzadas entre *D. farinae*, *D. pteronyssinus*, *E. maynei*, *A. siro*, *T. putrescentiae* e *L. destructor*. Mas de facto não é feita a distinção, i.e., não é possível justificar se as múltiplas reações cutâneas ocorridas se devem a co-sensibilização pelos respetivos ácaros ou se existem reações cruzadas. De onde se conclui que o fenómeno das reações cruzadas dificulta a interpretação clinicamente relevante dos testes intradérmicos, tendo em conta as homologias existentes (Mueller *et al.*, 2005; Nuttall *et al.*, 2008; Buckley *et al.*, 2013; Mueller *et al.*, 2016).

Alguns autores propõem a ocorrência de reações cruzadas de *D. farinae*, e ainda entre *A. siro* e *L. destructor*, o que foi verificado no presente estudo (Nuttall *et al.*, 2008).

Existe homologia de 80-90% entre *Dermatophagoides pteronyssinus* e *D. farinae*. Globalmente, pode inferir-se que os componentes alérgicos de *L. destructor*, e *T. putrescentiae* estão mais relacionados entre si do que se comparados a *A. siro*, não ocorrendo diferenças no número de reações positivas TID a Tyr p e Lep d, entre cães normais e atópicos. No que respeita a *E. maynei*, ainda que pertença à mesma família dos géneros *Dermatophagoides*, está descrito que entre eles existe pouca reação cruzada antigénica (Nuttall *et al.*, 2008).

No presente estudo observou-se correlação significativa para os pares *A. siro* – *L. destructor*, *A. siro* – *D. farinae* e *D. farinae* – *T. putrescentiae*, não ocorrendo correlação para os restantes pares. O gráfico 7, apresentado anteriormente, foi importante para demonstrar esta correlação, consistente e em concordância com os artigos científicos consultados.

Os grupos *major* de Der f e Der p para humanos são o 1 e 2, enquanto que para os canídeos são 15 e 18, a grande diferença entre estes dois grupos é o seu peso molecular, como referido anteriormente. O conhecimento destas especificidades alérgicas entre espécies é deveras importante, tendo em consideração que as terapêuticas específicas de imunoterapia veterinária utilizam tradicionalmente os preparados alérgicos para terapêutica humana, facto que pode prejudicar a eficiência do tratamento.

Aprofundar conhecimentos moleculares relativos aos subgrupos alérgicos, ocorrência de co-sensibilização e reações cruzadas, permitirão diminuir o número de extratos testados, assim como os utilizados na ASIT, melhorando a eficácia terapêutica e reduzindo os custos inerentes (Buckley *et al.*, 2013).

4.5 Correlação entre sensibilização (TID) e diagnóstico parasitário

Uma diversidade de estudos estabeleceu uma associação negativa entre reatividade alérgica e helmintes, enquanto outros estudos não conseguiram estabelecer qualquer relação. Argumenta-se que é necessária uma carga parasitária mínima para estabelecer o efeito protetor e que a duração da parasitose no hospedeiro é um fator influente, sendo que a associação estabelecida difere numa infeção aguda em detrimento de crónica (Biggelaar *et al.*, 2004; Smits *et al.*, 2010; Zakzuk *et al.*, 2018; Maizels, 2019).

A particularidade do presente estudo reside no facto de terem sido obtidas correlações estatisticamente significativas entre as respostas nos testes intradérmicos e a prevalência parasitária de nematodas, cestodes, protozoários e ixodídeos. O que o distingue dos estudos anteriormente publicados, é que nesses as correlações são geralmente realizadas quando está presente o parasitismo por nematodas, ou eventualmente, por helmintes. O vasto grupo de espécies parasitárias diagnosticado no grupo de animais aos quais se realizaram os TID, permitiu uma revisão dos princípios mais recentes da imunoparasitologia e imunoalergologia com subsequente aplicação estatística. Como demonstraram os resultados estatisticamente insignificantes obtidos, não se pode correlacionar a prevalência parasitária com as respostas cutâneas de sensibilização alérgica, uma vez que às diferentes espécies de parasitas o sistema imunitário adota diferentes tipos de resposta. E por outro lado, porque as diferentes espécies parasitárias possuem diferentes mecanismos de imunomodulação no hospedeiro.

Como foi extensivamente descrito no capítulo referente à imunoparasitologia, os nematoda e cestodes promovem imunossupressão da resposta imunitária Th2, a resposta do sistema imunitário associada ao combate parasitário de helmintes e que se verifica igualmente nos processos alérgicos, e fazem-no quer pela influência que exercem para aumentar a população reguladora Treg, aumentando a produção de citocinas endógenas

imunossupressoras, quer pelos desvios imunitários que ocorrem em detrimento dos seus produtos parasitários imunomoduladores, alterando as quimiotaxias, a ativação de macrófagos, competindo com as citocinas do hospedeiro, entre outras, visando a diminuição da resposta Th2. Evidentemente compreende-se que os helmintas bem-adaptados ao hospedeiro, ao terem sucesso na sua estratégia imunomoduladora, conquistam os seus objetivos de completar o ciclo de vida, executando despercebidamente as funções de nutrição e reprodução, enquanto aumentam a imunotolerância do indivíduo, diminuindo o risco de resposta alérgica exacerbada.

Por outro lado, tendo em consideração que a resposta imunitária eficaz contra protozoários e ixodídeos é, no geral, a Th1, idêntica à despoletada no combate a bactérias e vírus, e que, a imunomodulação que estes agentes podem promover ocorre no sentido de despolarizar Th1, seja quer por diminuírem a população de Treg e as citocinas endógenas imunossupressoras, ou por redirecionarem a polarização para Th2, facto é que essa é a génese imunitária da patologia alérgica e como tal estas parasitoses promovem um risco acrescido de resposta alérgica. Verifica-se que das infeções por protozoários e ixodídeos poderá resultar uma maior reatividade cutânea do indivíduo sensibilizado.

Portanto, que a reatividade a testes dermatológicos de sensibilização cutânea é inferior em grupos parasitados por helmintas, e que grupos desparasitados apresentam respostas de hipersensibilidade acrescidas, é ponto assente. Boas correlações já foram obtidas entre a inibição alérgica e a produção de IL-10, após estimulação por antigénios parasitários. Estudou-se a diminuição dos processos alérgicos pelos nematodas intestinais, em humanos, ancilostomatídeos que parecem produzir este efeito enquanto que *Ascaris* sp. aumenta a resposta alérgica. Provavelmente porque os helmintes intestinais podem ser mais eficientes em suprimir a sensibilização atópica do que a controlar os mecanismos de patogenia já instalados. Foi sugerido que seria a carga parasitária o fator necessário para a supressão alérgica, e que seria necessária uma meta-análise que contemplasse intensidades baixas e elevadas de carga parasitária. Adicionalmente, verificou-se em estudo *cohort*, após tratamento desparasitante, que o grupo recidivava na sintomatologia em contraste com os indivíduos que permaneciam infetados (McSorley & Maizels, 2012).

A atribuição de valores quantificáveis para a variável efeito parasitário utilizada nas correlações efetuadas, teve em consideração a revisão bibliográfica realizada no capítulo da Imunologia Veterinária. Sumariamente, testou-se a hipótese de que os helmintes exercem, tendencialmente, um efeito protetor à patologia alérgica, sendo atribuído o valor um aos nematoda e cestodes diagnosticados, e por outro lado, por apresentarem risco de exacerbação inflamatória, aos animais diagnosticados com infeções por protozoários e infestações por ixodídeos foi atribuído o valor um negativo. Seguindo a mesma lógica, na ausência de parasitas atribuiu-se o valor de zero. Por fim, na ocorrência de poliparasitismo, foi efetuado o somatório para ponderação, ou seja, gerado um índice cumulativo parasitário para cada indivíduo.

Os resultados obtidos foram surpreendentemente significativos. Estatisticamente, foi demonstrada uma correlação negativa entre a prevalência de parasitoses por helmintes e

sensibilização alérgica a ácaros domésticos, e uma correlação positiva entre sensibilização alérgica e prevalência de infecção por protozoários e infestação por ixodídeos. Ainda que o valor r final fosse negativo, e que estaticamente isso represente uma correlação inversa, foi possível determinar a validade da hipótese, porque se atribuiu uma escala de valores inversa para as diferentes espécies parasitárias.

De onde se conclui que protozoários e ixodídeos têm uma correlação positiva com resposta cutânea de sensibilização a ácaros domésticos por teste intradérmico, enquanto os helmintes apresentam uma correlação negativa. No entanto, esta conclusão geral deve ser interpretada cuidadosamente, tendo em consideração que vários fatores cruciais, desconhecidos na execução desta dissertação, provavelmente influenciarão a relação entre parasitas e doenças alérgicas.

Por outro lado, se ignorássemos a prevalência parasitária de ixodídeos e protozoários neste estudo e assumíssemos apenas a prevalência de helmintes para a realização da correlação às respostas de sensibilização cutânea por TID, seria necessária uma amostragem de maiores dimensões para que o poder estatístico tivesse um $p\text{-value} < 5\%$.

Alguns autores referem que a realização de correlações entre a prevalência de helmintes e processos alérgicos é problemática, tendo em conta que as teorias imunológicas relacionadas com os conceitos envolvidos apresentam uma enorme complexidade, e que a viabilidade dos estudos pode ser comprometida porque os efeitos clínicos das diferentes citocinas são difíceis de avaliar (Herbert, 2017).

Parece-nos fundamental destacar que uma compreensão detalhada das vias imunitárias e as interferências que os parasitas nelas promovem é um desafio inerente às crescentes alterações alcançadas pela evolução do conhecimento científico, verificando-se que ainda existem hipóteses por definir e testar. Por exemplo, no que respeita à imunomodulação promovida por *Hepatozoon* sp., que comprovadamente possui mecanismos eficientes de fuga às respostas do sistema imunitário do indivíduo, na medida em que provoca infeções crónicas assintomáticas, verifica-se uma lacuna de investigação científica a nível imunológico, no que respeita às vias utilizadas para a supressão Th1 e os seus produtos imunomoduladores.

Paralelamente, verifica-se que relativamente a espécies parasitárias com interesse zoonótico decorrem inúmeras investigações que visam a expansão do conhecimento imunológico, nomeadamente, referentes a *Leishmania* sp., *Giardia* sp., ixodídeos e filárias. As espécies parasitárias de importante interesse veterinário, sem interesse zoonótico, têm sido negligenciadas nas investigações de foro alérgico e imunológico.

As novas descobertas científicas nos domínios referidos permitirão avanços importantes na produção de novas terapêuticas, relevantes não só para o tratamento de patologias alérgicas, como também na descoberta de novos medicamentos anti-inflamatórios, anti-infecciosos e anti-tumorais, pela ação imunomodulatória previsível de produtos moleculares parasitários específicos.

Por outro lado, verificou-se que a possibilidade das parasitoses exibirem uma dualidade de efeito imunológico não é um ponto de vista muito popular na comunidade científica, sendo que a discussão extensiva da temática durante décadas tem sido no sentido de polarizar o efeito parasitário para “benéfico” ou para “prejudicial”. No entanto, é importante repensar esta polarização benefício/prejuízo, apesar de essa ter sido a via condutora da correlação realizada no presente estudo, tendo em conta que é demasiado simplista para representar a realidade das relações parasita/sistema imunitário/patologia alérgica e o modo como estes interagem num processo dinâmico no qual interferem inúmeros fatores. Há investigadores que atestam hipóteses alternativas visando repensar as bases destas relações, como sendo, Herbert (2017), McConchie *et al.* (2006), Smits *et al.* (2010), entre outros.

Uma questão pertinente para o final desta discussão é o porquê da prevalência de patologias atópicas ser tão elevada. Se a maioria dos autores retratam a atopia como uma disfunção, outros, como Colloff (2009), que a define como a capacidade de produção de IgE a diferentes alérgenos, ou seja, reatividade cutânea verificada a extratos alérgenos de *Dermatophagoides spp.*, aborda esta temática num prisma diferente. Este autor refere que a atopia é uma evolução genética adaptativa, exemplificando com o caso na Austrália central, num local inóspito para ácaros do pó, uma população aborígine apresenta uma prevalência de sensibilização para o ácaro referido de 21-34% e argumenta que a atopia é um traço genético fortemente adaptativo, que se mantém na população como uma vantagem seletiva, sendo a alergia o preço a pagar para uma vigilância imunitária mais eficiente. A sua hipótese é que a capacidade de responder prontamente a alérgenos de ácaros, pode ter sido uma evolução do sistema imunitário à ingestão de alimentos contaminados, potencialmente fatal, onde se encontrariam toxinas de fungos, bactérias e alérgenos. Segundo o mesmo autor, neste cenário, a capacidade de responder prontamente é uma vantagem genética.

Se extrapolarmos este conceito para o binómio atopia e doenças parasitárias caninas, é possível reverter a ordem do influenciador e influenciado e questionar, e se, ao invés de ser a prevalência parasitária o fator protetor das patologias atópicas, for a predisposição genética atópica o fator que visa proteger o indivíduo das doenças parasitárias? É uma perspetiva deveras diferente, mas refutada pela evolução.

Herbert (2017) justifica a elevada prevalência de patologias de base atópica pela teoria da saturação de FcεRI, considerando que na sociedade moderna industrializada, se verificam elevados rácios sIgE/IgEt (1-10%, níveis a que ocorre o aumento mais evidente da desgranulação da célula efetora), elevada clonalidade e baixa afinidade da IgE. Em contraste, em algumas áreas rurais ou em vias de desenvolvimento, a baixa prevalência de doença atópica dever-se-á, entre outros fatores, a uma proteção associada ao baixo rácio sIgE/IgEt (<1%), para a promoção do qual não se exclui o envolvimento parasitário, com redução na ativação de DC, alteração das funções Treg, produção de citocinas ou proteínas parasitárias, não sendo de excluir a existência de vias de proteção ainda desconhecidas, capazes de atenuar a resposta alérgica.

Conclusões

A componente do estágio curricular realizada no Hospital Veterinário de Loulé permitiu o desenvolvimento de competências em várias áreas da medicina veterinária, com o acompanhamento de uma equipa multidisciplinar. A componente do estágio realizado na Câmara Municipal de Lagos consistiu na realização do trabalho prático que levou à concretização da presente dissertação e permitiu o acompanhamento do médico veterinário municipal na realização das variadas funções inerentes à promoção da saúde pública. A nível de prática laboratorial, o trabalho realizado com os orientadores internos permitiu o desenvolvimento de competências a nível de alergologia, no que respeita à realização de testes intradérmicos, de exames complementares citológicos e diagnósticos parasitológicos, que permitiram o desenvolvimento de competências essenciais para a realização desta dissertação.

No capítulo inicial desta dissertação, foram sumarizadas as espécies parasitárias abordadas na temática alergia/parasitismo, referindo aspetos gerais da sua biologia, patogenia, diagnóstico e terapêutica.

No capítulo seguinte, caracterizaram-se os ácaros utilizados nos testes intradérmicos, bem como a patologia para a qual este método de diagnóstico complementar é usualmente utilizada, a dermatite atópica canina. Foi referida a hipótese da higiene, importante base para compreender o rumo teórico que tem guiado investigadores na construção do conhecimento acerca da alergologia veterinária, tendo em conta que as doenças alérgicas são cada vez mais frequentes em canídeos.

No que concerne à imunologia, foram descritas as diversas vias imunitárias envolvidas na resposta do indivíduo a parasitoses, à semelhança do que ocorre nas doenças alérgicas. Enfatizaram-se os diferentes métodos imunomodulatórios que estes organismos apresentam, concluindo-se que protozoários e ixodídeos podem ter uma correlação positiva às respostas cutâneas a ácaros domésticos por teste intradérmico, enquanto os helmintes podem apresentar uma correlação negativa. A prevalência parasitária, *per se*, não reflete a atividade imunitária do indivíduo, uma vez que diferentes parasitas apresentam diferentes efeitos sobre o indivíduo. Estatisticamente foi demonstrada a correlação negativa entre a prevalência de infeção por helmintes e sensibilização alérgica a ácaros domésticos, e uma correlação positiva entre sensibilização alérgica e prevalência de protozoários e ixodídeos, tendo-se obtido um coeficiente de correlação de $r = -0,7$ ($p < 0,001$), para $n = 20$, com intervalo de confiança de 95% de $-0,87$ a $-0,37$, considerando a variável prevalência parasitária por espécie e o efeito imunológico esperado. Para o número de respostas positivas aos extratos alérgicos correlacionado com a variável prevalência parasitária tendo em conta o efeito imunológico, obteve um valor $r = -0,61$ ($p < 0,001$), estatisticamente significativo.

Ao terminarmos este estudo, podemos concluir que a nível do hemograma, no geral, os valores obtidos encontraram-se dentro dos parâmetros considerados normais para a espécie canina, excetuando os valores de MCV e MCHC, justificando-se essas alterações com as

variações na temperatura de armazenamento das amostras, o tempo que decorreu entre as colheitas e a análise.

Verificou-se o aumento da concentração de eosinófilos nas amostras sanguíneas de oito animais ($fr = 40\%$; $n = 20$) e uma prevalência parasitária geral de 50% ($n = 20$), tendo-se correlacionado positivamente a eosinofilia com a prevalência parasitária ($r = 0,56$; $p < 0,05$). Por outro lado, não foi possível relacionar a eosinofilia com as respostas cutâneas aos testes intradérmicos.

Apurou-se que existe uma correlação negativa do fibrinogénio com o valor percentual de linfócitos ($r = -0,47$; $p < 0,05$) e correlações positivas, estatisticamente significativas para as variáveis fibrinogénio e: valor percentual de granulócitos ($r = 0,45$ $p < 0,05$); concentração de hemoglobina corpuscular média ($r = 0,52$ $p < 0,05$); índice de distribuição plaquetário ($r = 0,50$ $p < 0,05$). Os valores obtidos de hiperfibrinogénemia estarão relacionados com processos inflamatórios na maioria dos indivíduos. Este estudo comprovou a validade da metodologia para quantificação de fibrinogénio e foram apresentadas as vantagens da sua utilização.

Relativamente aos diagnósticos parasitológicos obteve-se uma prevalência de infeção de 15% de *Hepatozoon canis*, 15% de microfilarémia, 10% de ancilostomatídeos, 5% de *Trichuris vulpis*, 15% de *Dipylidium caninum* e de infestação de *Rhipicephalus sanguineus* em 20% dos animais do grupo ($n = 20$). Verificou-se a ocorrência de leishmaniose e de onchocercose num animal, não se obtendo um valor de prevalência para o grupo uma vez que os restantes animais não foram testados para estas parasitoses. As prevalências obtidas no presente estudo foram semelhantes às prevalências parasitárias obtidas em estudos parasitológicos homólogos realizados no território nacional e na região sul do país. Supõe-se que estes valores possam ser subestimados, devido às condicionantes de sensibilidade das técnicas utilizadas.

Verificou-se que, nos animais sujeitos a profilaxia antiparasitária ($fi = 12$), ocorreu, ainda assim, uma prevalência de parasitas gastrointestinais e/ou ectoparasitas de 33% (4 indivíduos em 12 desparasitados). Espera-se que este estudo seja uma contribuição para a consciencialização das prevalências parasitárias elevadas, existentes no Sul de Portugal, a importância das práticas profiláticas adequadas e eventualmente para a instituição de futuros programas de controlo.

Ressalva-se a importância da realização de esfregaços sanguíneos na prática clínica, para diagnóstico de hemoparasitas, avaliação morfológica celular, e monitorização da evolução clínica dos animais.

No que respeita aos testes intradérmicos, 12 indivíduos ($fi = 12$; 60%) do grupo ($n = 20$) apresentaram respostas positivas aos extratos alergénicos testados, tendo ocorrido uma maior prevalência de respostas positivas TID em machos e uma menor prevalência de respostas positivas TID nos animais de raça indeterminada. A média de número de respostas positivas por indivíduo foi de $1,4 \pm 1,3$; a média do número de respostas negativas por indivíduo foi de $4,6 \pm 1,3$.

A nível de concentrações dos extratos intradérmicos, observou-se a reatividade cutânea a 100 PNU/mL para os extratos alergénicos comerciais em estudo, exceto para *Dermatophagoides pteronyssinus*, não sendo possível definir se tal ocorreu pela baixa concentração utilizada, ou se pela ausência de sensibilização ao referido ácaro.

Ocorreram respostas de reatividade cutânea positivas a cinco dos seis ácaros em estudo, nomeadamente *D. farinae*, *Acarus siro*, *Lepidoglyphus destructor*, *Tyrophagus putrescentiae* e *Euroglyphus maynei* e respostas negativas para *D. pteronyssinus*. As médias e desvios padrões calculadas para as respostas aos testes intradérmicos foram: *D. pteronyssinus* ($0,35 \pm 0,48$); *D. farinae* ($1,6 \pm 0,92$); *A. siro* ($1 \pm 1,1$); *L. destructor* ($0,95 \pm 0,97$); *T. putrescentiae* ($1,05 \pm 1,02$) e *E. maynei* ($0,65 \pm 1,01$).

Relativamente à correlação de pares para os diferentes ácaros em estudo obteve-se os seguintes valores estatisticamente relevantes: *A. siro* – *L. destructor* ($r = 0,61$; $p < 0,01$), *A. siro* – *D. farinae* ($r = 0,55$; $p < 0,05$) e *D. farinae* – *T. putrescentiae* ($r = 0,55$; $p < 0,05$). A importância do estudo de correlação de pares entre os diferentes ácaros é pertinente para a realização dos testes intradérmicos, para a formulação da imunoterapia específica de antigénio e permite um maior conhecimento das possibilidades de ocorrência do fenómeno das reações cruzadas, que dificulta a interpretação clinicamente relevante dos testes intradérmicos.

As dificuldades sentidas na execução da dissertação incluíram a impossibilidade de realizar uma anamnese completa dos animais, inviabilizando a utilização dos critérios de Favrot, o número limitado de participantes, as alterações verificadas nas amostras sanguíneas, em detrimento das variações de temperaturas a que foram sujeitas, e a presença de formas parasitárias suspeitas, relativamente às quais não foi possível realizar um diagnóstico parasitológico conclusivo.

Ao longo desta dissertação, foram propostos estudos futuros, que contemplem um grupo maior de animais, visando averiguar: i) a prevalência de ácaros domésticos; ii) a prevalência de afeções alérgicas nas raças nacionais, tais como Podengo, Cão-de-Água e Cão do Barrocal Algarvio, entre outras; iii) estudos de correlação a nível da prevalência de DAC entre raças indeterminadas e as raças mais prevalentes no território nacional (e a nível regional) e a respetiva sensibilização a nível dos TID, determinações das sIgE, bem como estudos de inibição da determinação de sIgE, para pesquisar fenómenos de reatividade cruzada entre espécies alergénicas e entre estas e as diferentes espécies de parasitas mais comuns; iv) realizar a purificação de extratos alergénicos e identificação via SDS-PAGE, para averiguar a presença de grupos *major* para canídeos, nas formulações comerciais e v) clarificar os mecanismos de imunomodulação associados a *Hepatozoon canis*.

Esta dissertação pretendeu contribuir para uma melhor compreensão da medicina de precisão que constitui a alergologia, com especial enfoque nas relações imunitárias estabelecidas entre os canídeos e as diferentes espécies parasitárias prevalentes, tendo em

conta o modo como se correlacionam com as respostas cutâneas a testes intradérmicos a ácaros domésticos.

Bibliografia

- Abbas AK, Lichtman A & Pillai S (2014) *Cellular and Molecular Immunology*, 8.^a Edição, Elsevier, Philadelphia, EUA. ISBN: 978-0-323-47978-3, pp. 348-352, 417-434.
- Abreu MR de, Pereira MC, Simioni PU, Nodari EF, Paiatto LN & Camargo-Mathias MI (2019) Immunomodulatory and morphophysiological effects of *Rhipicephalus sanguineus* s. l. (Acari: Ixodidae) salivary gland extracts. *Vet Immunol Immunopathol* **207**: 36–45.
- Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Crameri R, Duan S, Eiwegger T, Eljaszewicz A, Ferstl R, Frei R, Garbani M, Globinska A, Hess L, Huitema C, Kubo T, Komlosi Z, Konieczna P, Kovacs N, Kucuksezer UC, Meyer N, Morita H, Olzhausen J, O'Mahony L, Pezer M, Prati M, Rebane A, Rhyner C, Rinaldi A, Sokolowska M, Stanic B, Sugita K, Treis A, van de Veen W, Wanke K, Wawrzyniak M, Wawrzyniak P, Wirz OF, Zakzuk JS & Akdis CA (2016) Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol* **138**: 984–1010.
- Alho AM, Landum M, Ferreira C, Meireles J, Gonçalves L, de Carvalho LM & Belo S (2014) Prevalence and seasonal variations of canine dirofilariasis in Portugal. *Vet Parasitol* **206**: 99–105.
- Allen JE, Sutherland TE & Rückerl D (2015) IL-17 and neutrophils: unexpected players in the type 2 immune response. *Curr Opin Immunol* **34**: 99–106.
- Almeida, BFM (2015) Detecção molecular de protozoários e bactérias transmitidos por artrópodes vetores em cães do sul de Portugal. Tese de Mestrado de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, Portugal, pp. 5, 79.
- Assunção DL, Farias MR, Barbosa MCR & Machado LHA (2017) Evaluation of the concentration of allergens from mites in fur and households dust of dogs with atopic dermatitis. *Pesqui Veterinária Bras* **37**: 41–46.

- Babić S, Pašić Š & Zahirović A (2018) Determination of allergens involved in canine atopic dermatitis in Bosnia and Herzegovina. *Veterinaria* **67**: 139–145.
- Barta JR, Schrenzel MD, Carreno R & Rideout BA (2005) The genus *Atoxoplasma* (Garnham 1950) as a junior objective synonym of the genus *Isospora* (Schneider 1881) species infecting birds and resurrection of *Cystoisospora* (Frenkel 1977) as the correct genus for *Isospora* species infecting mammals. *J Parasitol* **91**: 726–727.
- Bauer CL, 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. *Vet Dermatol* **21**: 192–197.
- Beer KD, Collier SA, Du F, and Gargano JW (2017) Giardiasis Diagnosis and Treatment Practices Among Commercially Insured Persons in the United States. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* **64**:1244–1250.
- Biggelaar AHJ, Rodrigues LC, Ree R, Zee JS, Hoeksma-Kruize YCM, Souverijn JHM, Missinou MA, Borrmann S, Kreamsner PG & Yazdanbakhsh M (2004) Long-term treatment of intestinal helminths increases mite skin-test reactivity in Gabonese schoolchildren. *J Infect Dis* **189**: 892–900.
- Bizikova P, Santoro D, Marsella R, Nuttall T & Eisenschenk MNC (2015) Review: Clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* **26**: 79-e24.
- Bloomfield SF, Rook GA, Scott EA, Shanahan F, Stanwell-Smith R & Turner P (2016) Time to abandon the hygiene hypothesis: new perspectives on allergic disease, the human microbiome, infectious disease prevention and the role of targeted hygiene. *Perspect Public Health* **136**: 213–224.
- Bogitsh BJ, Carter CE & Oeltmann TN (2012) Intestinal Tapeworms. In *Human Parasitology*, 4^a Edição, Academic Press, Boston, EUA. ISBN: 978-0-12-415915-0, pp 237–249.
- Bourgès-Abella NH, Geffré A, Deshuillers PL, Braun J-PD & Trumel C (2014) Changes in hematology measurements in healthy and diseased dog blood stored at room temperature for 24 and 48 hours using the XT-2000iV analyzer. *Vet Clin Pathol* **43**: 24–35.
- Bowman DD (2013) *Georgis' Parasitology for Veterinarians*, 10^a Edição, Saunders, St. Louis, EUA. ISBN: 978-1-4557-4006-2, pp. 58-63, 89-109, 153, 179, 200-226, 332-346.

- Bozza MT, Martins YC, Carneiro LAM & Paiva CN (2012) Macrophage migration inhibitory factor in protozoan infections. *J Parasitol Res* **2012**: 1-12.
- Braga MIFL (2017) Prevalência e sazonalidade de parasitoses gastrointestinais, cardiovasculares e hemáticas em cães do distrito de Beja, Portugal. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Portugal, pp. 55, 57, 66.
- Brazis P (2011) O papel dos ácaros de armazenamento na dermatite atópica canina. *Vet Focus* **21**: 42–46.
- Buckley L, Schmidt V, McEwan N & Nuttall T (2013) Cross-reaction and co-sensitization among related and unrelated allergens in canine intradermal tests. *Vet Dermatol* **24**: 422–427, e91-92.
- Campino L & Maia C (2010) Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. *Acta Médica Port* **23**: 859–64.
- Cavassani KA, Aliberti JC, Dias ARV, Silva JS & Ferreira BR (2004) Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology* **114**: 235–245.
- Chermpapai S, Broere F, Gooris G, Schlotter YM, Rutten VPMG & Bouwstra JA (2018) Altered lipid properties of the stratum corneum in Canine Atopic Dermatitis. *Biochim Biophys Acta BBA - Biomembr* **1860**: 526–533.
- Coakley G, Buck AH & Maizels RM (2016) Host parasite communications-Messages from helminths for the immune system: Parasite communication and cell-cell interactions. *Mol Biochem Parasitol* **208**: 33–40.
- Coles TB & Dryden MW (2014) Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. *Parasit Vectors* **7**: 8.
- Colloff MJ (2009) Dust Mites. 1ª Edição, Springer, Netherlands. ISBN: 978-90-481-2223-3, pp. 407-408, 437.
- Correale J & Farez MF (2011) The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* **233**: 6–11.
- Cosme J, Santos AS & Barbosa MP (2016) A tropomiosina como um panalergénio: Revisão. *Rev Port Imunoalergologia* **24**: 143–153.

- Cotton JA, Amat CB, Buret AG & Chadee K (2015) Disruptions of Host Immunity and Inflammation by *Giardia Duodenalis*: Potential Consequences for Co-Infections in the Gastro-Intestinal Tract, In Conferência: *Pathogens*, Doi: 10.3390/pathogens4040764
- Cruz AA, Cooper PJ, Figueiredo CA, Alcantara-Neves NM, Rodrigues LC & Barreto ML (2017) Global issues in allergy and immunology: Parasitic infections and allergy. *J Allergy Clin Immunol* **140**: 1217–1228.
- Cunha VES, Chagas MV, Ferreira RR & Faccini JLH (2012) Dermatite Atópica Canina e Ácaros Domésticos: revisão. *MedVet Derm - Rev Educ Contin Em Dermatol E Alergol Veterinária* **2**: 172–179.
- Custovic A, Murray C & Simpson A (2005) Allergy and infection: understanding their relationship. *Allergy* **60**: 10–13.
- Dantas-Torres F, Giannelli A & Otranto D (2012) Starvation and overwinter do not affect the reproductive fitness of *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol* **185**: 260–264.
- Day MJ (2013) Introduction: the immunological basis of allergic diseases. In *Veterinary Allergy*, Noli C, Foster A & Rosenkrantz W, Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 978-1-118-73881-8, pp XV–XX.
- Day MJ (2011) The immunopathology of canine vector-borne diseases. *Parasit Vectors* **4**: 48.
- Day MJ & Schultz RD (2011) *Veterinary Immunology: Principles and Practice*. Manson Publishing, Bristol, UK, ISBN: 978-1-84076-143-6, pp.120-130, 166-174.
- DeBoer DJ (2013) Introduction: Canine Atopic Dermatitis as an Evolving, Multifactorial Disease. In *Veterinary Allergy*, Noli C, Foster A & Rosenkrantz W, Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 978-1-118-73881-8 pp 5–7.
- Degasperi GR, Camargo RC, Ribeiro TCS, Rodrigues TCR & Barille G (2018) Polarização de linfócitos: Relevância fisiopatológica de Th9 e Th17. *Saúde St Maria* **44**: 1-9.
- Dilek AR, Dilek N, Saral Y & Ekşi S (2012) The role of protozoa in the etiology of chronic urticaria. *Dermatol Sin* **30**: 90–92.
- Dubey JP (2019) Re-evaluation of merogony of a *Cystoisospora ohioensis*-like coccidian and its distinction from gametogony in the intestine of a naturally infected dog. *Parasitology* **146**: 740–745.

- Dudakov JA, Hanash AM & van den Brink MRM (2015) Interleukin-22: immunobiology and pathology. *Annu Rev Immunol* **33**: 747–785.
- Eiras DF, Basabe J, Scodellaro CF, Banach DB, Matos ML, Krimer A & Baneth G (2007) First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. *Vet Parasitol* **149**: 275–279.
- Elliott DE & Weinstock JV (2012) Where are we on worms? *Curr Opin Gastroenterol* **28**: 551–556.
- European Scientific Counsel Companion Animal Parasites (2016) Control of Ectoparasites in Dogs and Cats, in *Modular Guide Series* **3**: 1-24.
- Favrot C (2015) Clinical signs and diagnosis of canine atopic dermatitis. In: 3. *Congresso Latinoamericano de Dermatologia Veterinaria*, Buenos Aires, Argentina. Doi: info:doi/10.5167/uzh-116541
- Ferrão JRSS (2018) Prevalência da dirofilariose canina em sete concelhos da região do Algarve. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Portugal, pp. 66-67.
- Ferreira BR, Szabó MJP, Cavassani KA, Bechara GH & Silva JS (2003) Antigens from *Rhipicephalus sanguineus* ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals. *Vet Parasitol* **115**: 35–48.
- Ferreira FS, Pereira-Baltasar P, Parreira R, Padre L, Távira LT, Atouguia J & Centeno-Lima S (2011) Intestinal parasites in dogs and cats from the district of Évora, Portugal. *Vet Parasitol* **179**: 242–245.
- Fukuyama T, Ganchingco JR, Mishra SK, Olivry T, Rzagalinski I, Volmer DA & Bäumer W (2017) Janus kinase inhibitors display broad anti-itch properties: A possible link through the TRPV1 receptor. *J Allergy Clin Immunol* **140**: 306-309.
- Genchi C, Kramer LH & Rivasi F (2011) Dirofilarial infections in Europe. *Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N* **11**: 1307–1317.
- Genchi M, Vismarra A, Lucchetti C, Viglietti A, Crosara S, Gnudi G, Quintavalla C, Schaper R & Kramer L (2019) Efficacy of imidacloprid 10%/moxidectin 2.5% spot on (Advocate®),

- Advantage Multi®) and doxycycline for the treatment of natural *Dirofilaria immitis* infections in dogs. *Vet Parasitol* **273**: 11–16.
- Hammerberg B (2013) Canine Immunoglobulin E. In *Veterinary Allergy*, Noli C, Foster A & Rosenkrantz W, Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 978-1-118-73881-8 pp 8–15.
- Hassan HK, Bolcen S, Kubofcik J, Nutman TB, Eberhard ML, Middleton K, Wekesa JW, Ruedas G, Nelson KJ, Dubielzig R, De Lombaert M, Silverman B, Schorling JJ, Adler PH, Unnasch TR & Beeler ES (2015) Isolation of *Onchocerca lupi* in Dogs and Black Flies, California, USA. *Emerg Infect Dis* **21**: 789–796.
- Hensel P, Austel M, Medleau L, Zhao Y & Vidyashankar A (2004) Determination of threshold concentrations of allergens and evaluation of two different histamine concentrations in canine intradermal testing. *Vet Dermatol* **15**: 304–308.
- Hensel P, Santoro D, Favrot C, Hill P & Griffin C (2015) Canine atopic dermatitis: Detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Vet Res* **11**: 1-13.
- Herbert O (2017) Immunological peculiarities in a “traditional” worm infested Papua New Guinean society and possible implications for the increase of allergies in fast changing “modern” societies. Dissertação de Doutorado em Saúde Pública (Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde durch den Promotionsausschuss Dr. Public Health der Universität Bremen), Universidade de Bremen, Alemanha, pp. VIII-16, 22-26, 42, 72-74, 83-124, 129-130.
- Hewitson JP, Grainger JR & Maizels RM (2009) Helminth immunoregulation: the role of parasite secreted proteins in modulating host immunity. *Mol Biochem Parasitol* **167**: 1–11.
- Huang X (2014) Immune modulators with parasite infections. Dissertação de Doutorado em Ciências Naturais (Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften), Faculdade de Matemática e Ciências (Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät), Tübingen, Alemanha, pp. 10-18.
- Jackson JA, Friberg IM, Little S & Bradley JE (2009) Review series on helminths, immune modulation and the hygiene hypothesis: Immunity against helminths and immunological phenomena in modern human populations: coevolutionary legacies? *Immunology* **126**: 18–27.

- Joachim A, Altreuther G, Bangoura B, Charles S, Daugschies A, Hinney B, Lindsay DS, Mundt H-C, Ocak M & Sotiraki S (2018) W A A V P guideline for evaluating the efficacy of anticoccidials in mammals (pigs, dogs, cattle, sheep). *Vet Parasitol* **253**: 102–119.
- Kiral F, Karagenc T, Pasa S, Yenisey C & Seyrek K (2005) Dogs with *Hepatozoon canis* respond to the oxidative stress by increased production of glutathione and nitric oxide. *Vet Parasitol* **131**: 15–21.
- Koebrich S, Nett-Mettler C, Wilhelm S & Favrot C (2012) Intradermal and serological testing for mites in healthy beagle dogs. *Vet Dermatol* **23**: 192-e39.
- Kommenou AT, Thomas ALN, Papadopoulos E & Koutinas AF (2016) Intraocular localization of *Onchocerca lupi* adult worm in a dog with anterior uveitis: A case report. *Vet Ophthalmol* **19**: 245–249.
- Koyasu S & Moro K (2011) Type 2 innate immune responses and the natural helper cell. *Immunology* **132**: 475–481.
- Langgartner D, Lowry CA & Reber SO (2019) Old Friends, immunoregulation, and stress resilience. *Pflugers Arch* **471**: 237–269.
- Latrofa MS, Annoscia G, Colella V, Cavallera MA, Maia C, Martin C, Šlapeta J & Otranto D (2018) A real-time PCR tool for the surveillance of zoonotic *Onchocerca lupi* in dogs, cats and potential vectors. Doi: 10.1371/journal.pntd.0006402
- Lee J-M & Kang JS (2016) Changes of hematological references depends on storage period and temperature conditions in rats and dogs. *Lab Anim Res* **32**: 241–248.
- Licona-Limón P, Arias-Rojas A & Olgún-Martínez E (2017) IL-9 and Th9 in parasite immunity. *Semin Immunopathol* **39**: 29–38.
- Liotta JL, Sandhu GK, Rishniw M & Bowman DD (2013) Differentiation of the microfilariae of *Dirofilaria immitis* and *Dirofilaria repens* in stained blood films. *J Parasitol* **99**: 421–425.
- Lloyd CM & Snelgrove RJ (2018) Type 2 immunity: Expanding our view. Doi: 10.1126/sciimmunol.aat1604
- Loke P & Lim YAL (2016) A Commensal Protozoan Strikes a Balance in the Gut. *Cell Host Microbe* **20**: 417–419.
- Lopes MF, Zamboni DS, Lujan HD & Rodrigues MM (2012) Immunity to Protozoan Parasites. *J Parasitol Res* **2012**: 1-3.

- Maizels RM (2009) Parasite immunomodulation and polymorphisms of the immune system. *J Biol* **8**: 62–62.
- Maizels RM (2019) Regulation of Immunity and allergy by helminth parasites. Doi: 10.1111/all.13944.
- Maizels RM, McSorley HJ & Smyth DJ (2014) Helminths in the hygiene hypothesis: sooner or later? *Clin Exp Immunol* **177**: 38–46.
- Marsella R, Olivry T, Carlotti D-N & International Task Force on Canine Atopic Dermatitis (2011) Current evidence of skin barrier dysfunction in human and canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol* **22**: 239–248.
- Martinez FO & Gordon S (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. Doi: 10.12703/P6-13
- Martins L (2018) Alergênios em Medicina Veterinária: Pensar diferente, mudar o conceito. Jornal do Congresso, *Child Med.* **7**: 6-8.
- Martins L, Bento OP & Inácio FF (2016) Veterinary allergy diagnosis: past, present and future perspectives. *Allergo J Int* **25**: 238–250.
- Martins L, Rejas J & Valdevira AG (2008) Allergy Diagnosis – An Application to Dog. *Experimental Pathology and Health Sciences* **2**: 51-60.
- McCall C, Hunter S, Stedman K, Weber E, Hillier A, Bozic C, Rivoire B & Olivry T (2001) Characterization and cloning of a major high molecular weight house dust mite allergen (Der f 15) for dogs. *Vet Immunol Immunopathol* **78**: 231–247.
- McCall JW, Alva R, Irwin JP, Carithers D & Boeckh A (2004) Comparative Efficacy of a Combination of Fipronil/(S)-Methoprene, a Combination of Imidacloprid/Permethrin, and Imidacloprid Against Fleas and Ticks When Administered Topically to Dogs. *Int J Appl Res Vet Med* **2**: 74.
- McCandless EE, Rugg CA, Fici GJ, Messamore JE, Aleo MM & Gonzales AJ (2014) Allergen-induced production of IL-31 by canine Th2 cells and identification of immune, skin, and neuronal target cells. *Vet Immunol Immunopathol* **157**: 42–48.
- McConchie BW, Norris HH, Bundoc VG, Trivedi S, Boesen A, Urban JF & Keane-Myers AM (2006) *Ascaris suum*-Derived Products Suppress Mucosal Allergic Inflammation in an

- Interleukin-10-Independent Manner via Interference with Dendritic Cell Function. *Infect Immun* **74**: 6632–6641.
- McGrotty Y, Bell R & McLauchlan G (2016) Disorders of plasma proteins. In *BSAVA Manual of Canine and Feline Clinical Pathology*, 3ª Edição, Villiers E & Ristic J, BSAVA Library, Gloucester, UK, ISBN: 9781905319633, pp. 123-135.
- McSorley HJ, Hewitson JP & Maizels RM (2013) Immunomodulation by helminth parasites: defining mechanisms and mediators. *Int J Parasitol* **43**: 301–310.
- McSorley HJ & Maizels RM (2012) Helminth infections and host immune regulation. *Clin Microbiol Rev* **25**: 585–608.
- Mehlhorn H (2016) *Animal Parasites: Diagnosis, Treatment, Prevention*. 7.ª Edição, Springer, Cham, Suíça. ISBN: 978-3-319-46403-9, pp.46-65, 76-79, 114-118, 198-201, 392- 397, 453-457, 663-665.
- Meireles J, Paulos F & Serrão I (2014) Dirofilariose em cães e gatos. *Rev Port Ciênc Vet Fev* **109**: 70–78.
- Menn B, Lorentz S & Naucke TJ (2010) Imported and travelling dogs as carriers of canine vector-borne pathogens in Germany. *Parasit Vectors* **3**: 34.
- Miller SI, Ernst RK & Bader MW (2005) LPS, TLR4 and infectious disease diversity. *Nat Rev Microbiol* **3**: 36–46.
- Miró G & López-Vélez R (2018) Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting “One Health” principles into practice. *Vet Parasitol* **254**: 151–159.
- Moneret-Vautrin DA (2005) Cross reactivity of food allergens and its clinical relevance. *Bull Acad Natl Med* **189**: 1491–1502.
- Moron-Soto M, Gutierrez L, Sumano H, Tapia G & Alcala-Canto Y (2017) Efficacy of nitazoxanide to treat natural *Giardia* infections in dogs. *Parasit Vectors* **10**: 52.
- Moya R, Carnés J, Sinovas N, Ramió L, Brazis P & Puigdemont A (2016) Immunoproteomic characterization of a *Dermatophagoides farinae* extract used in the treatment of canine atopic dermatitis. *Vet Immunol Immunopathol* **180**: 1–8.
- Mueller RS, Bettenay SV & Tideman L (2000) Aero-allergens in canine atopic dermatitis in southeastern Australia based on 1000 intradermal skin tests. *Aust Vet J* **78**: 392–399.

- Mueller RS, Fieseler KV, Rosychuk RAW & Greenwalt T (2005) Intradermal testing with the storage mite *Tyrophagus putrescentiae* in normal dogs and dogs with atopic dermatitis in Colorado. *Vet Dermatol* **16**: 27–31.
- Mueller RS, Janda J, Jensen-Jarolim E, Rhyner C & Marti E (2016) Allergens in veterinary medicine. *Allergy* **71**: 27–35.
- Mullen GR & OConnor BM (2019) Mites (Acari). In *Medical and Veterinary Entomology*, 3.^a Edição, Mullen GR & Durden LA, Elsevier, London, UK, ISBN: 978-0-12-814043-7, pp 533–596.
- Nakazawa T, Khan A, Yasueda H, Saito A, Fukutomi Y, Takai T, Zaman K, Yunus M, Takeuchi H, Iwata T & Akiyama K (2013) Immunization of Rabbits with Nematode *Ascaris lumbricoides* Antigens Induces Antibodies Cross-Reactive to House Dust Mite *Dermatophagoides farinae* Antigens. *Biosci Biotechnol Biochem* **77**: 145-150.
- Neill DR, Wong SH, Bellosi A, Flynn RJ, Daly M, Langford TKA, Bucks C, Kane CM, Fallon PG, Pannell R, Jolin HE & McKenzie ANJ (2010) Nuocytes represent a new innate effector leukocyte that mediates type-2 immunity. *Nature* **464**: 1367-70.
- Nicholson WL, Sonenshine DE, Noden BH & Brown RN (2019) Ticks (Ixodida). In *Medical and Veterinary Entomology*, 3.^a Edição, Mullen GR & Durden LA, Elsevier, London, UK, ISBN: 978-0-12-814043-7, pp 603–672.
- Nussbaum JC & Ortiz-Carpena JF (2018) Isolation and Identification of Group 2 Innate Lymphoid Cells in Settings of Type 2 Inflammation. *Methods Mol Biol* **1799**: 93–107.
- Nuttall TJ, Hill PB, Bensignor E & Willemse T (2008) House dust and forage mite allergens and their role in human and canine atopic dermatitis. In *Veterinary Allergy*, Noli C, Foster A & Rosenkrantz W, Wiley-Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 978-1-118-73881-8, pp 32-41.
- Olivry T & Banovic F (2019) Treatment of canine atopic dermatitis: time to revise our strategy? *Vet Dermatol* **30**: 87–90.
- Olivry T, Dunston SM, Favrot C, Prélaud P & Tsukui T (2017) The novel high molecular weight *Dermatophagoides farinae* protein Zen-1 is a major allergen in North American and European mite allergic dogs with atopic dermatitis. *Vet Dermatol* **28**: 177-e38.

- Otranto D, Dantas-Torres F, Cebeci Z, Yeniad B, Buyukbabani N, Boral OB, Gustinelli A, Mounir T, Mutafchiev Y & Bain O (2012) Human ocular filariasis: further evidence on the zoonotic role of *Onchocerca lupi*. *Parasit Vectors* **5**: 84.
- Otranto D, Dantas-Torres F, Giannelli A, Latrofa MS, Papadopoulos E, Cardoso L & Cortes H (2013) Zoonotic *Onchocerca lupi* Infection in Dogs, Greece and Portugal, 2011–2012. *Emerg Infect Dis* **19**: 2000–2003.
- Otranto D, Giannelli A, Scotty Trumble N, Chavkin M, Kennard G, Latrofa MS, Bowman DD, Dantas-Torres F & Eberhard ML (2015) Clinical case presentation and a review of the literature of canine onchocercosis by *Onchocerca lupi* in the United States. *Parasit Vectors* **8**: 89.
- Owen SP (2017) The first epidemiological study on the prevalence of cardiopulmonary and gastrointestinal parasites in cats and dogs from the Algarve region of Portugal using FLOTAC technique. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Portugal, pp.41-47.
- Özkan B & Uysal A (2011) Some Allergens in Dogs and Their Evaluation via Hematologic, Immunologic and Intradermal Skin Test Methods. *J Anim Vet Adv* **10**: 1760–1773.
- Pereira A, Martins Â, Brancal H, Vilhena H, Silva P, Pimenta P, Diz-Lopes D, Neves N, Coimbra M, Alves AC, Cardoso L & Maia C (2016) Parasitic zoonoses associated with dogs and cats: a survey of Portuguese pet owners' awareness and deworming practices. Doi: 10.1186/s13071-016-1533-2.
- Pivari AAO, Lima GR de SL, Pandolfi KT, Oliveira RE, Porfirio-Passos G & Porfirio LC (2016) Novo método de mensurar fibrinogênio no plasma de cães. Doi: <http://dx.doi.org/10.18066/revistaunivap.v22i40.473>
- Plumb DC (2011) Plumb's Veterinary Drug Handbook. 7.^a Edição, PharmaVet Inc., Wisconsin, USA, ISBN: 978-0-470-95965-7, pp. 512-515, 903-906.
- Rajamanickam A & Babu S (2013) Immunomodulation by Filarial Parasites. *International Trends in Immunity* **1**:12-20.
- Ramsey I (2014) *BSAVA Small Animal Formulary*, 8.^a Edição, BSAVA Library, Gloucester, UK, ISBN: 978-1-905319-65-7, pp 5-6, 254-255.

- Resch Y, Blatt K, Malkus U, Fercher C, Swoboda I, Focke-Tejkl M, Chen K-W, Seiberler S, Mittermann I, Lupinek C, Rodriguez-Dominguez A, Ziegelmayer P, Ziegelmayer R, Keller W, Krzyzanek V, Valent P, Valenta R & Vrtala S (2016) Molecular, Structural and Immunological Characterization of Der p 18, a Chitinase-Like House Dust Mite Allergen. Doi: 10.1371/journal.pone.0160641.
- Roach JC, Glusman G, Rowen L, Kaur A, Purcell MK, Smith KD, Hood LE & Aderem A (2005) The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9577–9582.
- Roberts L & Janovy Jr. J (2008) *Foundations of Parasitology*. 8.^a Edição, McGraw-Hill, Boston, EUA, ISBN: 978-0-07-302827-9, pp. 419-425, 463-475.
- Saari S, Näreaho A & Nikander S (2018) *Canine Parasites and Parasitic Diseases*, 1.^a Edição, Academic Press, San Diego, USA, ISBN: 978-0-12-814112-0, pp. 5-7, 19-25, 29-32, 67-69, 83-88, 97-106, 121-126, 137-139, 196-198, 233-236, 238, 247-249.
- Sabaté D, Llinás J, Homedes J, Sust M & Ferrer L (2014) A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Prev Vet Med* **115**: 56–63.
- Saridomichelakis MN, Marsella R, Lee KW, Esch RE, Farmaki R & Koutinas AF (2008) Assessment of cross-reactivity among five species of house dust and storage mites. *Vet Dermatol* **19**: 67–76.
- Scheffers JP, Moran RR, Ribeiro SN, Vale DF, Hyppolyto WC & Oliveira AL de A (2013) Tratamento cirúrgico da dirofilariose canina utilizando a triotomia direita através da inflow occlusion: relato de caso. *J Bras Cir Vet*, **2**:146–152.
- Scudellari M (2017) News Feature: Cleaning up the hygiene hypothesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 1433–1436.
- Silva AFP (2017) Pesquisa de helmintes em cachorros no concelho de Serpa. Tese de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade de Évora, Portugal, pp. 55.
- Smits HH, Everts B, Hartgers FC & Yazdanbakhsh M (2010) Chronic Helminth Infections Protect Against Allergic Diseases by Active Regulatory Processes. *Curr Allergy Asthma Rep* **10**: 3-12.
- Strachan DP (1989) Hay fever, hygiene & household size. *Br Med J* **299**:1259–60.

- Tanaka A (2018) Characterisation of an immune-modulating peptide secreted by a helminth worm. Dissertação para Doutorado em Filosofia, Universidade de Tecnologia de Sidney, Austrália, pp. 2.
- Taylor MA, Coop RL & Wall RL (2015) *Veterinary Parasitology*, 4.^a Edição, Wiley Blackwell, West Sussex, UK, ISBN: 978-0-470-67162-7, pp. 1-5, 110-112, 128, 132, 137, 145, 241-251, 599-658.
- Thomas WR, Smith W-A & Hales BJ (2004) The allergenic specificities of the house dust mite. *Chang Gung Med J* **27**: 563–569.
- Tizard IR (2012) *Veterinary Immunology*. 9.^a Edição, Saunders, St. Louis, EUA, ISBN: 978-1-4557-0362-3, pp. 311-325.
- Travi BL, Cordeiro-da-Silva A, Dantas-Torres F & Miró G (2018) Canine visceral leishmaniasis: Diagnosis and management of the reservoir living among us. Doi: 10.1371/journal.pntd.0006082.
- Vecina JF, Patrício RF & Ciarlini PC (2006) Importância do fibrinogénio plasmático na identificação de processos inflamatórios em cães. *Ciênc Veterinária Nos Tróp* **9**: 31–35.
- Verocai GG, Nelson KJ, Callahan RT, Wekesa JW, Hassan HK & Hoberg EP (2018) A cryptic species of *Onchocerca* (Nematoda: Onchocercidae) in blackflies (*Simulium* spp.) from southern California, USA. *Parasit Vectors* **11**: 547.
- Yang Z & Ming X-F (2014) Functions of Arginase Isoforms in Macrophage Inflammatory Responses: Impact on Cardiovascular Diseases and Metabolic Disorders. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00533.
- Yasur-Landau D, Jaffe CL, David L & Baneth G (2016) Allopurinol Resistance in *Leishmania infantum* from Dogs with Disease Relapse. Doi: 10.1371/journal.pntd.0004341.
- Zaiss MM, Rapin A, Lebon L, Dubey LK, Mosconi I, Sarter K, Piersigilli A, Menin L, Walker AW, Rougemont J, Paerewijck O, Geldhof P, McCoy KD, Macpherson AJ, Croese J, Giacomini PR, Loukas A, Junt T, Marsland BJ & Harris NL (2015) The Intestinal Microbiota Contributes to the Ability of Helminths to Modulate Allergic Inflammation. *Immunity* **43**: 998–1010.
- Zajac AM & Conboy GA (2012) *Veterinary Clinical Parasitology*. John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-8138-2053-8, pp. 3-13, 185-191, 196, 199.

Zakzuk J, Casadiego S, Mercado A, Alvis-Guzman N & Caraballo L (2018) *Ascaris lumbricoides* infection induces both, reduction and increase of asthma symptoms in a rural community. *Acta Trop* **187**: 1–4.

Anexos

Tabela 12 – Distribuição da casuística geral da componente de estágio curricular realizado no Hospital Veterinário de Loulé, frequência absoluta por área clínica e espécie animal (Fip) e frequência relativa (Fr%).

Área clínica	Fip		Fi	Fr (%)
	Canídeo	Felídeo		
Medicina Preventiva	9	5	14	4,22
Patologia e Clínica Médica	183	69	252	75,90
Patologia e Clínica Cirúrgica	42	24	66	19,88
Total	234	98	332	100,00

Tabela 13 – Distribuição da casuística da patologia e clínica médica realizada no Hospital Veterinário de Loulé, frequência absoluta por área clínica e espécie animal (Fip) e relativa (Fr%).

Patologia e Clínica Médica	Fip		Fi	Fr (%)
	Canídeo	Felídeo		
Cardiologia	9	0	9	3,57
Dermatologia e Alergologia	12	1	13	5,16
Endocrinologia	7	2	9	3,57
Gastroenterologia e glândulas anexas	24	16	40	15,87
Teriogenologia	13	0	13	5,16
Infeciologia e Parasitárias	21	16	37	14,68
Nefrologia e Urologia	9	15	24	9,52
Neurologia	11	3	14	5,56
Oftalmologia	2	1	3	1,19
Oncologia	16	2	18	7,14
Ortopedia	43	5	48	19,05
Pneumologia	4	5	9	3,57
Toxicologia e Emergências	12	3	15	5,95
Total	183	69	252	100

Tabela 14 – Distribuição da casuística da patologia e clínica cirúrgica realizada no Hospital Veterinário de Loulé, frequência absoluta por área clínica e espécie animal (Fip) e relativa (Fr%).

Patologia e Clínica Cirúrgica	Fip		Fi	Fr (%)
	Canídeos	Felídeos		
Cirurgia de tecidos moles	30	17	47	71,21
Cirurgia ortopédica	7	7	14	21,21
Odontologia	5	0	5	7,58
Total	42	24	66	100,00