

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**AVALIAÇÃO DO TESTE INTRADÉRMICO EM EQUINOS COM EXTRATOS  
ALERGÊNICOS DE PÓLENS, INSETOS E TRÊS CONCENTRAÇÕES DE  
HISTAMINA**

**VANESSA JEGAN**

**PORTO ALEGRE**

**2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA ANIMAL: EQUINOS**

**AVALIAÇÃO DO TESTE INTRADÉRMICO EM EQUINOS COM EXTRATOS  
ALERGÊNICOS DE PÓLENS, INSETOS E TRÊS CONCENTRAÇÕES DE  
HISTAMINA**

**AUTOR: VANESSA JEGAN**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos da Faculdade de Medicina Veterinária da UFRGS como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

**ORIENTADOR: NÉLSON ALEXANDRE KRETZMANN FILHO**

**PORTO ALEGRE**

**2017**

CIP - Catalogação na Publicação

Jegan, Vanessa

AVALIAÇÃO DO TESTE INTRADÉRMICO EM EQUINOS COM  
EXTRATOS ALERGÊNICOS DE PÓLENS, INSETOS E TRÊS  
CONCENTRAÇÕES DE HISTAMINA / Vanessa Jegan. -- 2017.  
50 f.

Orientador: Néelson Alexandre Kretzmann Filho.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária,  
Programa de Pós-Graduação em Medicina Animal: Equinos,  
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. alergia. 2. teste intradérmico. 3. pólenes. 4.  
insetos. 5. hipersensibilidade. I. Kretzmann Filho,  
Néelson Alexandre, orient. II. Título.

**VANESSA JEGAN**

**AVALIAÇÃO DO TESTE INTRADÉRMICO EM EQUINOS COM EXTRATOS  
ALERGÊNICOS DE PÓLENS, INSETOS E TRÊS CONCENTRAÇÕES DE  
HISTAMINA**

**APROVADO POR:**

---

**Prof. Dr. Néelson Alexandre Kretzmann Filho**  
**Orientador e Presidente da Comissão**

---

**Prof. Dra. Adriana Pires Neves**  
**Membro da Comissão**

---

**Prof. Dr. André Luiz de Araujo Rocha**  
**Membro da Comissão**

---

**Prof. Dr. Clairton Pereira**  
**Membro da Comissão**

## **AGRADECIMENTOS**

À Edy, minha mãe, por ser minha fortaleza e por me apoiar em minhas decisões.

Ao Ludwig, meu pai, pelo apoio para realizar meus sonhos.

A Corinna, minha irmã, por ser minha torcedora mais fiel e minha grande amiga.

Ao Henrique, meu namorado, que me ajudou e apoiou em cada passo da realização deste trabalho.

Ao Prof. Nélon Alexandre Kretzmann, por me orientar e acreditar neste projeto.

Ao Victor Cunha, pela colaboração de valor inestimável.

Aos colegas do REPROLAB, agradeço pelo aprendizado conjunto e pela convivência fraterna.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Pele eqüina normal. Epiderme (E), derme (D), folículos piloso (F), glândulas sebáceas (S) e glândulas sudoríparas (A) (SCOTT, MILLER, 2011).....	13
Figura 2	Aparência da epiderme na pele normal. Estrato basal (EB), estrato espinhoso (EE), estrato granuloso (EG), estrato lúcido (EL) e estrato córneo (adaptado de SCOTT, MILLER, 2011).....	13
Figura 3	O mástócito, que está presente no tecido conectivo em todo corpo, tem receptores $F_{c\epsilon}R1$ que se ligam à moléculas de Imunoglobulina E (IgE). Uma vez que a IgE foi produzida em resposta ao alérgeno pelo sistema imunológico, ela se liga firmemente a estes receptores no mastócito. Quando o alérgeno entra no corpo, ele se ligará às moléculas de IgE na membrana do mastócito, desencadeando a liberação de seus grânulos. Os mediadores contidos nos grânulos, como a histamina, causam efeitos fisiológicos (aumento da permeabilidade capilar, contração muscular lisa e vasodilatação), produzindo sinais clínicos da doença alérgica. Outros mediadores, como os leucotrienos, prostaglandinas e citocinas, são formados depois que o mastócito é ativado e tem efeitos semelhantes à estimulação da quimiotaxia de eosinófilos (GERSHWIN, 2015).....	16
Figura 4	Media 15min intradermal testing reactions of 6 allergic horses to five allergen extracts. The black bar shows the <i>cut off</i> .....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Mean 15-min intradermal testing reactions of 17 nonallergic horses to histamine hydrochloride solution.....	33
Tabela 2	Mean 15-min intradermal testing reactions of 17 nonallergic horses to five allergen extracts.....	33

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	12
<b>2.1</b>	<b>Pele</b> .....	12
<b>2.2</b>	<b>Reação alérgica cutânea</b> .....	13
<b>2.3</b>	<b>Desordens de hipersensibilidade cutânea</b> .....	17
2.3.1	Urticária recorrente.....	17
2.3.2	Dermatite atópica.....	18
2.3.3	Hipersensibilidade à picada de insetos.....	19
<b>2.4</b>	<b>Testes alérgicos</b> .....	20
2.4.1	Teste alérgico intradérmico.....	20
2.4.2	Teste alérgico sorológico.....	22
<b>2.5</b>	<b>Imunoterapia alérgeno específica</b> .....	23
2.5.1	Administração.....	25
2.5.2	Eficácia.....	25
<b>2.6</b>	<b>Tipos de alérgenos</b> .....	25
<b>3</b>	<b>ARTIGO</b> .....	27
<b>4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	38
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	39
	<b>APÊNDICE A</b> – Fotos representativas do equino não alérgico preparado para realização do teste intradérmico. Região da lateral do pescoço esquerda e direita, respectivamente, com tricotomia e dermomarcação.....	46
	<b>APÊNDICE B</b> – Fotos representativas do teste alérgico intradérmico em equino não alérgico. Região da lateral do pescoço esquerda e direita, respectivamente, com tricotomia e dermomarcação das reações após 15 minutos.....	47



**APÊNDICE C** – Fotos representativas do animal 6 evidenciando as lesões cutâneas e o teste intradérmico, respectivamente..... 48

**APÊNDICE D** – Fotos representativas do animal 5 evidenciando as lesões cutâneas e o teste intradérmico, respectivamente..... 49

**APÊNDICE E** – Fotos representativas do animal 2 evidenciando as lesões cutâneas e o teste intradérmico, respectivamente..... 50

# AVALIAÇÃO DO TESTE INTRADÉRMICO EM EQUINOS COM EXTRATOS ALERGÊNICOS DE PÓLENS, INSETOS E TRÊS CONCENTRAÇÕES DE HISTAMINA

## RESUMO

O teste alérgico intradérmico (TID) é uma importante ferramenta no diagnóstico dos alérgenos implicados nas reações de hipersensibilidade mediada por IgE. O objetivo deste estudo foi avaliar o TID em eqüinos não alérgicos com extratos alergênicos de *Cynodon dactylon*, *Lolium multiflorum*, *Paspalum notatum*, *Culex sp.* e *Aedes aegypti*, e três concentrações de histamina, em dois volumes diferentes, e baseado nos resultados, verificar a acurácia do TID em eqüinos alérgicos. Foram realizados TID em 17 eqüinos não alérgicos com três concentrações de cada extrato (1:2000v/w, 1:4000v/w e 1:8000v/w) e três concentrações de histamina (0,1mg/ml, 0,05mg/ml e 0,025mg/ml), em dois volumes (0,1 e 0,05ml). Baseado nos resultados obtidos, foram realizados TID em seis eqüinos alérgicos utilizando os extratos na concentração de 1:2000v/w, a histamina na concentração de 0,025mg/ml, em um volume de 0,05ml. Nos eqüinos não alérgicos, nenhuma das três concentrações dos extratos testados nos dois volumes mostrou-se irritativa. Concentrações maiores de histamina provocaram halos maiores e levemente mais túrgidos, e quanto maior o volume injetado, maiores as reações. Os TID realizados em eqüinos alérgicos mostraram confiabilidade dos resultados por evidenciar hipersensibilidade individual e não provocar reações irritativas. Em conclusão, as diferentes concentrações dos estratos testados em eqüinos não alérgicos não provocaram reações falso positivas (irritantes). O volume de 0,05ml é mais recomendado para realização dos TID pois as aplicações com 0,1ml produziram reações maiores, prejudicando a sensibilidade do teste. A concentração de 0,025mg/ml da solução de histamina provocou a formação de halos menores, permitindo maior acurácia do *cut off* no TID. Os extratos alergênicos testados em equinos alérgicos não provoraram reações em todos os animais, o que poderia ser considerado uma reação irritativa. Os equinos alérgicos apresentaram reações positivas diferentes, de acordo com a hipersensibilidade individual, demonstrando sensibilização alérgica verdadeira.

Palavras-chave: alergia, teste intradérmico, pólen, insetos, hipersensibilidade.

# EVALUATION OF INTRADERMAL TEST IN HORSES WITH ALLERGEN EXTRACTS OF POLENS, INSECTS AND THREE HISTAMINE CONCENTRATIONS

## ABSTRACT

The intradermal test (IDT) is an important tool in the diagnosis of allergens involved in IgE-mediated hypersensitivity reactions. The aim of this study was to evaluate the IDT in nonallergic horses with allergenic extracts of *Cynodon dactylon*, *Lolium multiflorum*, *Paspalum notatum*, *Culex sp.* and *Aedes aegypti*, and three histamine concentrations, in two different volumes, and based on the results, verify the accuracy of IDT in allergic horses. IDT was performed on 17 nonallergic horses with three concentrations of each extract (1:2000v/w, 1:4000v/h and 18000v/w) and three histamine concentrations (0,1mg/ml, 0,05mg/ml and 0,025mg/ml) in two volumes (0,1 and 0,05ml). Based on the results obtained, IDT was performed in six allergic horses using extracts at the concentration of 1:2000v/w, histamine at a concentration of 0.025mg/ml, in a volume of 0,05ml. In nonallergic horses, none of the three concentrations of the extracts tested in the two volumes were irritant. Larger concentrations of histamine provoked larger and slightly more turgid wheals, and the larger the volume injected, the greater the reactions. The IDT performed in allergic horses showed reliability of the results because they demonstrated individual hypersensitivity and did not provoke irritative reactions. In conclusion, the different concentrations of extracts tested in nonallergic horses did not provoke false positive (irritant) reactions. The volume of 0,05ml is more recommended for execution of IDT because the applications with 0,1ml produced larger reactions, impairing the sensitivity of the test. The concentration of 0,025mg/ml of the histamine solution caused the formation of smaller wheals, allowing a better accuracy of the *cut off* in the IDT. The allergenic extracts tested in allergic horses did not provoke reactions in all the animals, what could be considered an irritative reaction. Allergic horses presented different positive reactions, according to individual hypersensitivity, demonstrating true allergic sensitization.

Keywords: allergy, intradermal test, pollens, insects, hypersensitivity.

## 1 INTRODUÇÃO

Após cães e gatos, os cavalos são a espécie mais comumente atendida em serviços de dermatologia no mundo. Doenças cutâneas são fonte de sofrimento por causar incômodo, irritabilidade, prurido, infecções secundárias e miíases. Além de comprometer o conforto e a aparência, interferem com a capacidade esportiva do cavalo na equitação, trabalho e competições (SCOTT; MILLER, 2011).

O sistema imune é estruturado para reconhecer e responder à patógenos para proteção do hospedeiro. O termo alergia descreve um estado de hipersensibilidade a um antígeno, existindo diferentes tipos de hipersensibilidade. Alergia ou resposta alérgica refere-se à hipersensibilidade do tipo I, mediada por anticorpos da imunoglobulina E (IgE) (GERSHWIN, 2015). Reações de hipersensibilidade à alérgenos ambientais têm sido relacionadas à patofisiologia de doenças como a dermatite atópica (DA), a urticária recorrente (UR) (JOSE-CUNILLERAS et al., 2001) e a hipersensibilidade à picada de insetos (HPI) (LORCH et al., 2001a).

Testes para a detecção de respostas alérgicas IgE específicas são baseados em testes intradérmicos (TID) ou sorológicos (SCOTT; MILLER, 2011). Testes intradérmicos são mundialmente aceitos como método de escolha para identificação de alérgenos causadores de doenças alérgicas cutâneas (FADOK, 1995; WHITE, 2005) e têm sido praticados há décadas na medicina humana e veterinária. A principal utilidade do teste está na demonstração de hipersensibilidade mediada por IgE (HILLIER; DE BOER, 2001), afim de determinar os alérgenos para formulação de protocolos de imunoterapia, além de proporcionar a identificação dos alérgenos que podem ser incluídos em estratégias de eliminação (LORCH et al., 2001a; MORRIS; LINDBORG, 2003).

A imunoterapia alérgeno-específica (IAE) é amplamente utilizada na medicina humana e de pequenos animais (GINEL et al., 2014). Existem diversos estudos mostrando bons resultados desta terapia em equinos com DA (LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009; RADWANSKI et al., 2012; STEPNIK et al., 2011) e HPI, onde os animais apresentaram melhora clínica a partir do primeiro ano de terapia (ANDERSON et al., 1996).

Equinos hígidos podem demonstrar um moderado grau de reatividade às concentrações dos alérgenos utilizados nos TID. Estas reações possivelmente ocorrem

devido à prévia sensibilização subclínica ao alérgeno ou testar o alérgeno em concentrações que excedem seu limiar irritativo em indivíduos hígidos (MORRIS; LINDBORG, 2003), resultando em reações falso-positivas não específicas (irritantes) (HILLIER; DEBOER, 2001).

Extratos alérgicos são uma complexa mistura de componentes antigênicos (IPSEN et al., 1998), e devem ser testados na maior concentração do extrato que não cause reações irritativas que possam ser interpretadas como reações falso-positivas (HILLIER; DEBOER, 2001). Para garantir a repetibilidade dos resultados no diagnóstico de doenças alérgicas, a padronização dos extratos é fundamental (DREBORG, 1993) e é amplamente buscada. A variabilidade é inerente, pois a maioria das soluções são extratos integrais que incorporam variáveis quantidades de alérgenos relevantes (MORRIS; LINDBORG, 2003).

Diversos estudos buscaram identificar as concentrações ideais para realização dos TID, porém muitas lacunas ainda devem ser preenchidas (BAXTER E VOLGELNEST, 2008; MORRIS E LINDBORG, 2003; BAUER et al., 2009; ROBERTS et al., 2014) para estabelecer as melhores condições dos testes para a identificação de alérgenos implicados na patofisiologia das doenças alérgicas em eqüinos. O objetivo deste estudo foi avaliar o TID em eqüinos não alérgicos com extratos alergênicos de *Cynodon dactylon*, *Lolium multiflorum*, *Paspalum notatum*, *Culex sp.* e *Aedes aegypti*, e três concentrações de histamina, em dois volumes de aplicação, e baseado nos resultados, verificar a acurácia do TID em eqüinos alérgicos.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Pele

A pele é o maior e mais visível órgão do corpo, além de barreira anatômica e fisiológica entre animal e ambiente. Fornece proteção contra danos físicos, químicos e microbiológicos, e seus componentes sensoriais percebem calor, frio, dor, prurido, toque e pressão. A pele é sinérgica com sistemas orgânicos internos e assim reflete processos patológicos tanto primários quanto compartilhados com outros tecidos (SCOTT; MILLER, 2011).

A pele é contínua com as membranas mucosas locais (digestiva, respiratória, ocular, urogenital) e sua quantidade e qualidade, juntamente à pelagem, variam entre áreas do corpo, raças, indivíduos, sexo e idade (SCOTT; MILLER, 2011). Em geral, a espessura da pele diminui dorsal para ventral no tronco e proximal para distal nos membros. É mais espessa na fronte, pescoço dorsal, tórax dorsal, garupa e base da cauda, e mais fina na pina, axila, região inguinal e períneo (WAKURI et al., 1995; SCOTT, 2004).

É composta por três componentes: epiderme, derme e subcutâneo (WAKURI et al., 1995) (Figura 1). A epiderme é composta por múltiplas camadas de células definidas por sua posição, forma, morfologia e diferenciação. As células epidérmicas são divididas em queratinócitos (85%), melanócitos (5%), células de Langerhans (3-8%) e células de Merkel (2%), e classificadas em estratos ou camadas. O estrato basal é a camada mais interna, seguida pelo estrato epinhoso, granuloso, lúcido e córneo (Figura 2) (SMITH, 1888; SCOTT; MILLER, 2011). O estrato córneo é compacto e possui camadas lipídicas bem organizadas (MARSELLA, 2014).

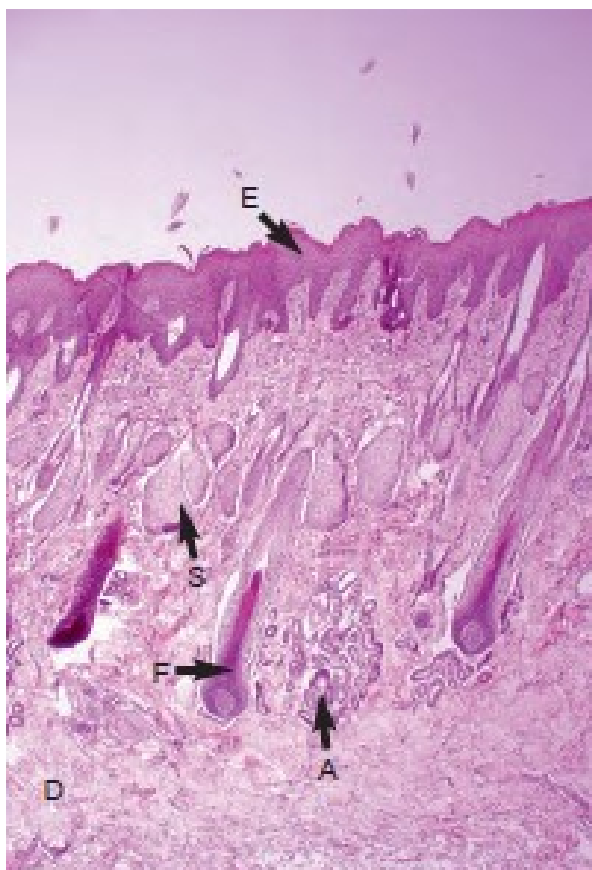


Figura 1: Pele eqüina normal. Epiderme (E), derme (D), folículos piloso (F), glândulas sebáceas (S) e glândulas sudoríparas (A) (SCOTT; MILLER, 2011).

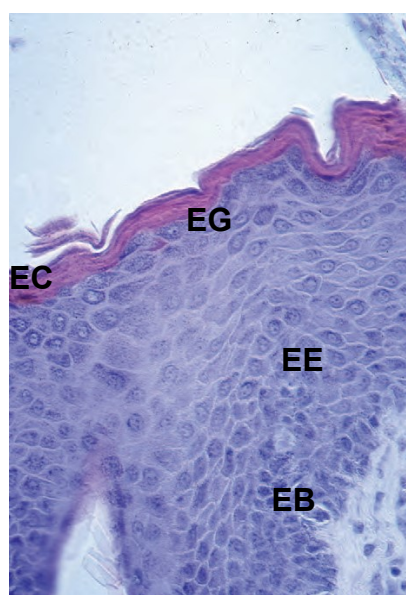


Figura 2: Aparência da epiderme na pele normal. Estrato basal (EB), estrato espinhoso (EE), estrato granuloso (EG), estrato lúcido (EL) e estrato córneo (adaptado de SCOTT; MILLER, 2011).

A derme, dividida em camada superficial e profunda, é composta de fibras insolúveis (colágeno e elastina) e solúveis (proteoglicanos e hialuronato), que suportam o estresse do movimento e mantêm a forma da pele. Contêm os anexos cutâneos, músculo pilo-erector, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e nervos. Está envolvida na regulação do crescimento, proliferação, adesão, migração e diferenciação celular, e modula a cicatrização, estrutura e função da epiderme (SCOTT; MILLER, 2011).

## 2.2 Reação alérgica cutânea

O sistema imunológico cutâneo é composto pelos sistemas humoral e celular. O componente celular compreende os queratinócitos, células dendríticas epidermais (células de Langerhans), células dendríticas dermais, linfócitos, macrófagos, mastócitos, células endoteliais e granulócitos. O componente humoral consiste das imunoglobulinas, componentes do complemento, fibrinolisinases, citocinas, eicosanoides, neuropeptídeos e peptídeos antimicrobianos (SCOTT; MILLER, 2011).

Respostas alérgicas são mediadas por anticorpos IgE que ligam-se à mastócitos e causam a liberação/síntese de poderosos mediadores (GERSHWIN, 2015). São divididas em quatro tipos: tipo I (anafilactóide ou imediata), tipo II (citotóxica), tipo III (complexo imune) e tipo IV (mediada por células ou tardia). Os tipos I, II e III juntos formam as reações imediatas e são mediadas por anticorpos, requerendo de alguns minutos a poucas horas para serem detectadas. O tipo IV é a reação de hipersensibilidade tardia, não mediada por anticorpos, e classicamente requer 24-72h para se tornar detectável (SCOTT; MILLER, 2011). O termo alergia ou resposta alérgica refere-se à hipersensibilidade do tipo I, mediada por anticorpos do tipo IgE (GERSHWIN, 2015) e implicada na patogênese de diversas doenças em eqüinos há quase 30 anos (WAGNER, 2009).

Reações de hipersensibilidade são reações alérgicas provocadas pela exposição (e subsequente re-exposição) a um alérgeno, e podem envolver pele, olhos, sistema respiratório e trato gastrointestinal. Os alérgenos mais comuns incluem proteínas do pólen, ácaros ambientais, epitélios e outros químicos (ABBAS et al., 2012). Após exposição inicial a um alérgeno, células T diferenciam-se em Th2 e interagem com células B. Elas também secretam citocinas como IL-4 e IL-13, e estes sinais induzem células B a produzir e promover a mudança de formas de anticorpos (isotipos) IgM para outras classes, especialmente IgE (WAGNER et al., 2006). A IgE é encontrada na



superfície de algumas células sanguíneas periféricas como basófilos, sub-populações de células B e monócitos, e em mastócitos de vários tecidos como pele, submucosa das vias aéreas e intestino (WAGNER, 2009).

No soro eqüino, a IgE ocorre na sua forma solúvel em concentrações fisiológicas cerca de 1000 vezes mais altas do que no soro humano (WAGNER, 2009). Cavalos geralmente não desenvolvem sinais clínicos de hipersensibilidade antes dos 3-4 anos de idade (WILSON et al., 2001). Alergias cutâneas são raramente observadas em animais mais jovens (WAGNER et al., 2003), possivelmente pela transferência do IgE materno via colostro ao potro neonato, sendo produzida por ele somente após 6-9 meses após o nascimento (MARTI et al., 2009).

As reações de hipersensibilidade podem manifestar-se de forma imediata e tardia, não devendo ser confundidas com reações do tipo IV (ABBAS et al., 2012). A ligação da IgE ao seu receptor de alta afinidade na superfície algumas células é chamada sensibilização e precede o desenvolvimento de alergia clínica (WAGNER et al., 2009). A IgE alérgeno-específica está ligada a receptores de alta afinidade na superfície de mastócitos, basófilos, eosinófilos, células de Langerhans, macrófagos dermais e monócitos ativados (ABBAS et al., 2012). Esta forma de doença alérgica é caracterizada por um início imediato de sinais clínicos após a exposição ao alérgeno. Na ausência do alérgeno, a sensibilização não induz sinais clínicos de alergia. Somente a ligação da IgE ao alérgeno desencadeia a degranulação celular e resulta na liberação imediata de mediadores inflamatórios seguido do rápido aparecimento dos sinais clínicos (WAGNER et al., 2009) (Figura 3).

As reações de hipersensibilidade imediatas resultam da ligação do alérgeno à IgE e ativação do mastócito, provocando a liberação de vários mediadores como a histamina, enzimas, proteoglicanos e ácido araquidônico, que por sua vez levam à liberação de prostaglandina, leucotrienos e fator de ativação plaquetária. Todos estes mediadores levam à vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, broncoconstrição e quimiotaxia de neutrófilos aos locais de inflamação. Linfócitos Th2 secretam a IL-5, que ativa eosinófilos e aumenta sua maturação, e a IL-13 estimula a secreção de muco pelas células epiteliais (ABBAS et al., 2010).

As reações de hipersensibilidade tardias são mediadas por citocinas das células Th2 e mastócitos, e caracterizadas por um maior número de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e células CD4+. Tais citocinas incluem o Fator de Necrose Tumoral, que ativa expressão celular de moléculas de adesão e favorece a infiltração de neutrófilos e

monócitos. Mastócitos e Th2 produzem IL-4, que aumenta a expressão de moléculas de adesão para eosinófilos, levando ao acúmulo destes e outras células inflamatórias no local da reação. Ocorre a liberação de outras citocinas (fator de agregação plaquetária, prostaglandinas e leucotrienos) que contribuem para o dano tecidual e contínuo recrutamento de células inflamatórias (ABBAS et al., 2012).

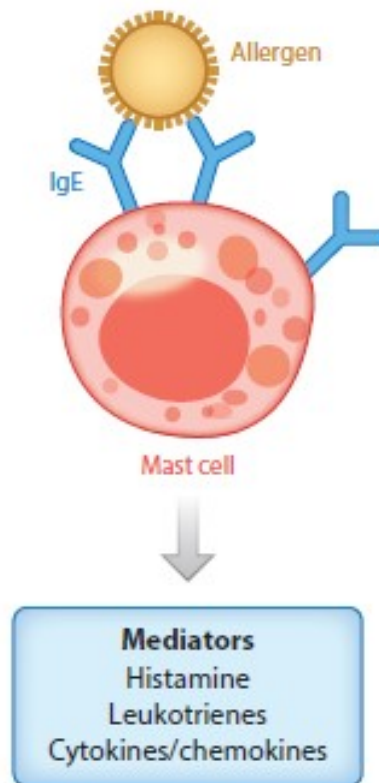


Figura 3: O mastócito, que está presente no tecido conectivo em todo corpo, tem receptores  $F_{c\epsilon}R1$  que se ligam à moléculas de Imunoglobulina E (IgE). Uma vez que a IgE foi produzida em resposta ao alérgeno pelo sistema imunológico, ela se liga firmemente a estes receptores no mastócito. Quando o alérgeno entra no corpo, ele se ligará às moléculas de IgE na membrana do mastócito, desencadeando a liberação de seus grânulos. Os mediadores contidos nos grânulos, como a histamina, causam efeitos fisiológicos (aumento da permeabilidade capilar, contração muscular lisa e vasodilatação), produzindo sinais clínicos da doença alérgica. Outros mediadores, como os leucotrienos, prostaglandinas e citocinas, são formados depois que o mastócito é ativado e tem efeitos semelhantes à estimulação da quimiotaxia de eosinófilos (GERSHWIN, 2015).

## 2.3 Desordens de hipersensibilidade cutânea

A hipersensibilidade cutânea foi considerada a primeira doença alérgica de cavalos presumidamente mediada por IgE (MATTHEWS et al., 1983). Doenças de hipersensibilidade cutânea como a dermatite atópica, a urticária recorrente ou a hipersensibilidade à picada de insetos ocorrem na maioria das raças, incluindo Puro Sangue de Corrida, Árabe, Warmbloods, cavalos de tração, Quarto de Milha, Frísios e pôneis, e em diversos países do mundo (WAGNER, 2009).

### 2.3.1 Urticária recorrente

A UR é uma condição imuno-mediada comum de cavalos e pôneis associada com alta morbidade. É caracterizada por halos transientes na pele que aparecem subitamente e podem regredir rapidamente ou persistir por longos períodos (HINDEN et al., 2012).

É variavelmente prurítica e edematosa com natureza imunológica ou não imunológica, resultantes da degranulação de mastócitos ou basófilos (SCOTT; MILLER, 2011; HINDEN et al., 2012). Mecanismos imunológicos resultam de reações de hipersensibilidade tipo I e III, e fatores não imunológicos resultam de forças físicas (pressão, luz do sol, calor, frio, exercício), estresse psicológico, anormalidades genéticas, e várias drogas e substâncias químicas como ácido acetil salicílico (AAS), narcóticos, alimentos e conservantes de alimentos (SCOTT; MILLER, 2011).

Não foi comprovada predisposição racial, idade ou raça, porém alguns relatos sugerem que o Puro Sangue de Corrida e outras raças de corrida sejam mais predispostos (SCOTT; MILLER, 2011). Em humanos, a urticária é classificada com base na sua duração, frequência e causas, contudo, isto não é bem definido em equinos (ZUBERBIER, 2009).

Segundo Scott e Miller (2011), os sinais clínicos podem ser agudos ou transitórios, quando prolongarem-se por 6 a 8 semanas, e crônicos ou persistentes, quando prolongarem-se por mais de 8 semanas. Um estudo conduzido por Rüfenacht et al. (2005) mostrou que na maioria dos equinos avaliados, os sinais clínicos eram recorrentes e persistiam por mais de uma semana.

As lesões são relativamente simétricas e bilaterais, localizadas ou generalizadas, podendo ou não apresentar prurido e, usualmente, não apresentam

derrame seroso ou hemorrágico. Podem aparecer em qualquer lugar do corpo, especialmente no pescoço, tronco e extremidades proximais (SCOTT; MILLER, 2011).

A UR não é um diagnóstico definitivo, e sim um padrão de reação cutânea com muitas causas em potencial. As abordagens terapêuticas incluem a eliminação de fatores etiológicos conhecidos, tratamento dos sinais clínicos com glicocorticoides e imunoterapia (SCOTT; MILLER, 2011).

### 2.3.2 Dermatite Atópica

A DA é uma potencial causa de prurido sazonal ou não (WHITE, 2005), caracterizada pela hiperreatividade à alérgenos ambientais e alimentos. É considerada uma síndrome associada a sinais de prurido similares aos observados na HPI e UR. Alguns dos cavalos atópicos podem ter HPI associada a reações à polens, fungos, poeira ou ácaros (FADOK, 2013).

Em equinos, a dermatite atópica não está tão bem caracterizada como nas outras espécies, apesar de compartilhar algumas similaridades (STEPNIK et al., 2011). Em humanos e cães é uma condição hereditária caracterizada por prurido, onde os indivíduos afetados são geneticamente predispostos a desenvolver alergia mediada por IgE à alérgenos ambientais (OLIVRY; DEBOER; GRIFFIN, 2001) absorvidos por via cutânea, inalatória ou oral (SCOTT; MILLER, 2011).

A ativação da IgE específica pelos alérgenos leva a liberação de mediadores inflamatórios, desencadeando reação inflamatória e início imediato dos sinais de alergia. Equinos atópicos são predispostos à infecção secundária e estas infecções podem acentuar gravemente o prurido e a inflamação (SCOTT; MILLER, 2011).

Os sinais clínicos tipicamente iniciam em cavalos jovens (um ano e meio a seis anos de idade) e podem manifestar-se em qualquer estação, sazonalmente ou não, dependendo dos alérgenos envolvidos (WHITE, 2005). Comumente, há prurido bilateral simétrico, inicialmente na ausência de lesões visíveis, afetando face, pina, tórax ventral, abdômen, membros, região dorsolateral do pescoço, base da crina, cauda e garupa (SCOTT; MILLER, 2011). Contudo, podem apresentar urticária com ou sem prurido concomitante (WHITE, 2005).

Lesões secundárias como escoriações, hipotricose, alopecia auto-induzida e infecção bacteriana secundária com ou sem liquenificação e hiperpigmentação são

frequentemente identificadas. Conjuntivite e rinite alérgicas são raramente descritos em cavalos atópicos (SCOTT; MILLER, 2011).

O diagnóstico definitivo da doença é primariamente baseado no histórico, apresentação clínica e exclusão de outras doenças cutâneas pruríticas e/ou urticariformes (SCOTT; MILLER, 2011; WHITE, 2005) como infecções secundárias, alergia alimentar, hipersensibilidade à picada de insetos e dermatite de contato (SCOTT; MILLER, 2011).

A dermatite atópica é considerada uma doença crônica que requer manejo prolongado (FADOK, 1995; SCOTT; MILLER, 2011). Estratégias de manejo incluem medicações sistêmicas, como antihistamínicos, glicocorticoides, antidepressivos tricíclicos ou uma combinação destes, associados com terapia tópica e eliminação de alérgenos (WHITE, 2005). Em função da necessidade de terapia em longo prazo e implicações esportivas, enfatiza-se o uso da imunoterapia alérgeno específica (IAE) para tratamento da doença. Os alérgenos são selecionados através de TID ou sorológicos e o tratamento imunoterápico é prolongado (SCOTT; MILLER, 2011).

### 2.3.3 Hipersensibilidade à picada de insetos

A HPI é uma causa comum de prurido e também pode estar envolvida na etiologia da UR (LORCH et al., 2001a). A espécie alergênica mais conhecida é do gênero *Culicoides* (GREINER, 1995) e os antígenos das glândulas salivares são a fração alergênica na hipersensibilidade (WILSON et al., 2001).

A HPI representa uma reação de hipersensibilidade dos tipos I e IV aos antígenos salivares de inúmeras espécies de *Culicoides* e possivelmente espécies de *Simulium*, *Stomoxys calcitrans* e *Haematobia irritans* (SCOTT; MILLER, 2011).

É uma doença de distribuição mundial. Evidências clínicas sugerem que esta desordem apresente predisposição familiar e genética. O TID é indicado como técnica diagnóstica. A doença é observada em qualquer idade, raça ou sexo, porém parece ser mais comum em algumas raças como o Quarto de Milha e o Árabe, e entre 3 a 4 anos de idade. Os sinais clínicos são não-sazonais, com exacerbação sazonal, associados ao aparecimento dos insetos, e pioram com a idade (SCHAFFARTZIK et al., 2012; GUINEL, 2014).

As lesões podem estar distribuídas dorsal ou ventralmente, ou uma mistura de ambas, e são caracterizadas por prurido com ou sem pápulas crostosas, usualmente

iniciando na base da cauda e estendendo-se cranialmente. Com a cronicidade, as lesões evoluem para escoriações auto-induzidas, hipotricose, alopecia, liquenificação e alterações na pigmentação (SCHAFFARTZIK et al., 2012).

No momento, o diagnóstico definitivo é baseado no histórico, exame físico, exclusão de outras condições pruríticas e uma resposta positiva ao controle de insetos (SLOET van OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN et al., 2009). Como tratamento, sugere-se o controle dos insetos, terapia tópica e sistêmica com agentes antipruriginosos e IAE (SCOTT; MILLER, 2011).

## **2.4 Testes alérgicos**

Testes alérgicos são realizados para identificar os potenciais alérgenos ambientais indutores de doença. Enquanto existem múltiplos tipos de testes disponíveis na medicina humana (patch, prick, intradérmico ou sorológicos), somente testes intradérmicos ou sorológicos são comumente realizados em paciente veterinários (BUECHNER-MAXWELL; MANNING, 2005). Testes alérgicos são realizados para identificar os alérgenos para inclusão em IAE, porém o diagnóstico, assim como em outras espécies, não pode ser realizado baseado somente nestes testes. Tais exames devem ser interpretados associados ao histórico da doença, e esta interpretação vai potencializar a escolha dos alérgenos relevantes em um protocolo de imunoterapia (WHITE, 2005).

### **2.4.1 Teste alérgico intradérmico**

TID são mundialmente aceitos como método de escolha para identificação de causas de doenças alérgicas cutâneas (FADOK, 1995; WHITE, 2005) e é considerado o método preferencial para teste alérgico em eqüinos. Ele identifica, através da injeção dos alérgenos diretamente dentro da derme, a reação de hipersensibilidade do tipo I via ligação antigênica dos anticorpos IgE dos mastócitos, com subsequente degranulação e formação do halo (BUECHNER-MAXWELL; MANNING, 2005; BAUER et al., 2009) através da liberação de mediadores como a histamina, que levam à vasodilatação (ABBAS et al., 2012). São praticados há décadas na medicina humana e veterinária (HILLIER; DEBOER, 2001) e representam um exemplo da reação imunológica local e sistêmica (FADOK; GREINER, 1990).

A IgE cutânea representa a verdadeira IgE mediando a reação alérgica, ao invés da IgE circulante no sangue, que tem sido questionada com relação a sua contribuição nas alergias cutâneas (FADOK, 1995). A sensibilidade do TID é maior do que os testes alérgicos sorológicos, tornando-o teste preferencial no diagnóstico de doenças alérgicas (FADOK, 1995; WASSOM; GRIEVE, 1998; SICHERER; WOOD, 2012).

Anteriormente ao teste, drogas específicas como antihistamínicos e glicocorticóides devem ser descontinuados afim de não interferir com os componentes inflamatórios da reação de hipersensibilidade como a degranulação de mastócitos. Para antihistamínicos, sugere-se que o tempo de interrupção seja de 7-14 dias, porém somente a hidroxizina foi estudada em cavalos (PETERSEN; SHOTT, 2009). A interrupção de glicocorticóides varia baseada na via de administração (tópica, oral, injetável) e potência da droga (OLIVRY; SARIDOMICHELAKIS, 2013). Recomenda-se que corticóides tópicos e orais de curta duração sejam suspensos 14-30 dias antes do TID (FADOK, 1995; HILLIER; DEBOER, 2001; OLIVRY; SARIDOMICHELAKIS, 2013). Não está estabelecido tempo ideal para suspensão de corticóides injetáveis de longa ação, porém o mínimo sugerido é de 28 dias, preferencialmente de 8 semanas ou mais (OLIVRY; SARIDOMICHELAKIS, 2013; HILLIER; DEBOER, 2001). Um estudo sugere que a dexametasona deve ser suspensa 14 dias antes do TID (PETERSEN; SHOTT, 2009). Drogas como cecozonazol, tacrolimus, ciclosporina, ácidos graxos essenciais e pentoxifilina não afetam os resultados do TID no cão (OLIVRY; SARIDOMICHELAKIS, 2013; HILLIER; DEBOER, 2001). Os efeitos de outras medicações como antidepressivos tricíclicos, agonistas  $\beta$ 2-adrenérgicos, teofilina e broncodilatadores ainda precisam ser determinados (HILLIER; DEBOER, 2001).

A avaliação das reações de hipersensibilidade do tipo I mediadas por IgE no TID é realizada por um clínico treinado, de forma subjetiva ou objetiva. Reações avaliadas subjetivamente utilizam uma escala de 0 (negativo) à 4+, baseado no tamanho do halo, eritema e turgidez, e tendo os controles negativo e positivo como pontos de referência (MORRIS; LINDBORG, 2003). A solução controle positiva mais comumente utilizada é a histamina e recebe um escore de 4+, e a solução controle negativa é a salina 0,9%, recebendo escore de 0 (FADOK, 1995; HILLIER; DEBOER, 2001; MORRIS, LINDBORG, 2003). Reações avaliadas objetivamente consistem da mensuração do diâmetro do halo com um paquímetro (a média do maior e menor diâmetros) (HILLIER; DEBOER, 2001).

Cavalos sudáveis podem apresentar reações positivas ao TID, indicando uma possível hipersensibilidade subclínica, exposição prévia sem doença, reações irritativas, técnica falha, contaminação dos alérgenos com bactéria ou reação cruzada de fungos ou ecto-parasitas com ácaros de armazenamento (LORCH et al., 2001a; BAXTER; VOLGELNEST, 2008; MORRIS; LINDBORG, 2003; LEBIS et al., 2002). Contudo, cavalos com doenças alérgicas como dermatite atópica e urticária recorrente tem reações de hipersensibilidade maiores no TID comparas à cavalos clinicamente sadios (JOSE-CUNILLERAS et al., 2001).

Reações falso negativas podem decorrer de concentrações alergênicas muito baixas, testar fora da estação quando os sinais clínicos houverem terminado, estresse induzindo esteróides endógenos, erros diagnósticos ou hiporreatividade ao controle positivo. O TID é utilizado como ferramenta diagnóstica para determinar os gatilhos ambientais para IAE e terapia de exclusão (DELGER, 1997).

Extratos alergênicos aquosos são rotineiramente utilizados para TID, e devem ser selecionados conforme a localização do paciente e os alérgenos mais importantes naquela região. Tais informações podem ser obtidas através de veterinários locais que realizam TID, faculdades de veterinária, laboratórios que fornecem os alérgenos, literatura (REEDY et al., 1997), alergistas humanos e faculdades de medicina. Nem todos os alérgenos potenciais podem ser incluídos em baterias de TID. Na maioria das localidades, os painéis devem incluir uma seleção de extratos alergênicos de pólenes de árvores, gramíneas e sementes, mofos, ácaros ambientais, insetos e epitélios (HILLIER; DEBOER, 2001).

#### 2.4.2 Teste alérgico sorológico

Testes alérgicos sorológicos (TS) in vitro detectam a presença de IgE alérgeno específica. As técnicas mais comuns para quantificar IgE incluem o teste rádio alérgico adsorvente (RAST) e o ELISA (POMEROY, 1934; HAMILTON, 2010; MAKHIJA, O'GORMAN, 2012). O RAST foi o primeiro teste desenvolvido para detectar IgE no soro (MAKHIJA; O'GORMAN, 2012; SICHERER; WOOD, 2012). Nesta técnica, o alérgeno é aderido em um meio sólido, como um disco de papel, e incubado com o soro do paciente. Uma solução tampão é adicionada para remover qualquer proteína não ligada, e então, anticorpos anti-IgE radiomarcados detectam as IgEs ligadas e os resultados são descritos em IgE por mililitro. Na medicina veterinária, testes alérgicos



de ELISA são os mais comuns. Este teste envolve cobrir os poços de uma placa com alérgenos, e então adicionar o soro do paciente. As placas e o soro são incubados, permitindo que a IgE alérgeno-específica ligue-se aos alérgenos. Após, anticorpos mono ou policlonais anti-IgE são adicionados, ligando-se à IgE. Enzimas e substratos são adicionados, provocando uma mudança na coloração. Os resultados são expressados em anticorpos ELISA baseado na densidade óptica, com resultados iguais ou superiores à 150 considerados positivos (MAKHIJA; O'GORMAN, 2012).

Resultados falso positivos são encontrados em pacientes com alta IgE total no soro, devido à ligações não específicas aos alérgenos (MAKHIJA; O'GORMAN, 2012). Testes *in vitro* também podem apresentar resultados falso positivos devido à reação cruzada com anticorpos IgG (WASSOM; GRIEVE, 1998). Também questiona-se se os anticorpos IgE detectados nestes testes refletem a hipersensibilidade real dos anticorpos IgE fixados em mastócitos (MAKHIJA; O'GORMAN, 2012). Em estudos comparando os testes sorológicos *in vitro* em cavalos saudáveis e doentes, não observou-se diferença nos níveis da maioria dos anticorpos IgE alérgenos-específicos (LORCH et al., 2001b; EDER et al., 2000; MORGAN et al., 2007; FREY et al., 2008). Quando comparados ao TID, a sensibilidade e especificidade dos testes *in vitro* foram mais baixas ou imprevisíveis (MORGAN et al., 2007; LORCH et al., 2001b). Desta forma, TIDs são preferíveis tanto na medicina veterinária quanto na humana (WASSOM; GRIEVE, 1998; SICHERER; WOOD, 2012; MAKHIJA; O'GORMAN, 2012) para identificação de alérgenos ambientais e elaboração de imunoterapia (FADOK, 1995; LITTLEWOOD, 1997; WHITE, 2005; BUECHNER-MAXWELL; MANNING, 2005).

## **2.5 Imunoterapia alérgeno específica**

Doenças dermatológicas alérgicas são consideradas crônicas e requerem manejo em longo prazo. Estratégias de manejo incluem medicamentos sistêmicos como anti-histamínicos, glicocorticóides, antidepressivos tricíclicos ou uma combinação destes, associados à terapia tópica (WHITE, 2005). Os efeitos adversos indesejáveis e limitações da utilização de algumas destas medicações durante competições esportivas, associado à impossibilidade evitar o contato com os alérgenos ofensores, freqüentemente tornam a IAE a terapia de escolha (FADOK, 1995).

A IAE é utilizada na dermatologia humana e de pequenos animais (GINEL et al., 2014) e é definida pela Organização Mundial da Saúde como a administração de

quantidades progressivamente maiores de um alérgeno para um paciente alérgico com objetivo de diminuir os sintomas após re-exposição ao alérgeno (BOUSQUET et al., 1998).

Tolerância alérgica é a adaptação do sistema imunológico caracterizada por uma reatividade não inflamatória específica à um determinado alérgeno, que em outras circunstâncias induziria imunidade celular ou humoral, levando à inflamação tecidual e/ou produção de IgE (JUTEL; AKDIS, 2011).

Apesar do exato mecanismo de ação ainda precisar ser determinado, IAE parece atuar através da indução da tolerância alergênica por meio da alteração da apresentação dos antígenos pelas células apresentadoras, gerando células T reguladoras com habilidades supressoras alérgeno-específicas, diminuindo a inflamação provocada por mastócitos, eosinófilos e basófilos, e a mudança de tipo de anticorpo produzido de IgE para IgG (JUTEL; AKDIS, 2011; LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009). Em cães atópicos, observou-se aumento no IFN- $\gamma$  comparado à IL-4 (SHIDA et al., 2004), níveis aumentados de IL-10 e células T reguladoras (KEPPEL, et al., 2008). Em gatos asmáticos, houve decréscimo na IL-5 e IL-4 e um aumento no IFN-  $\gamma$ , assim como na IL-10 no líquido de lavado broncoalveolar (REINERO et al., 2006). Não foram publicados estudos documentando os efeitos imunológicos específicos da IAE em equinos, mas é possível que seja similar àquele observado em humanos, cães e gatos, onde os níveis de IgE alérgeno-específica diminuem com o tempo, o número de basófilos e eosinófilos diminuem, e a reação mediada por Th2 muda para Th1 ou células T reguladoras (ROBERTS, 2014).

A imunoterapia foi utilizada pela primeira vez na medicina humana em 1911, para tratamento de hipersensibilidade conjuntival à polens de gramíneas, e os pacientes tratados mostraram redução dos sintomas (HALES et al., 2006). Além da melhora significativa dos sinais clínicos de doenças alérgicas, ocorre a redução da necessidade do uso de medicações (HAMILTON, 2010) em longo prazo e implicações esportivas, como o *dopping* (SCOTT; MILLER, 2011).

. A IAE tem sido utilizada com sucesso em equinos no manejo da dermatite atópica (FADOK, 1995; DELGER, 1997; STEPNIK et al., 2011) e da hipersensibilidade à picada de insetos (ANDERSON et al., 1996; GINEL et al., 2014), apresentando melhora de 60 a 84% dos sinais clínicos (WHITE; 2005; REES, 2001; STEPNIK et al., 2011).

### 2.5.1 Administração

A frequência e quantidade da imunoterapia administrada variam. Tipicamente, uma fase de indução é executada através da administração de quantidades e concentrações de alérgenos aumentadas a cada 2 ou 7 dias (REEDY et al., 1997; LOEWENSTEIN; MULLER, 2009). Assim que uma dada concentração e volume são atingidos, inicia-se a fase de manutenção e a imunoterapia é administrada em intervalos regulares (SCOTT, 1981; REEDY et al., 1997), a cada 5 a 20 dias (REEDY et al., 1997). Porém, conforme a resposta do paciente, as concentrações e frequência da IAE podem ser aumentadas ou reduzidas, se os sinais clínicos do paciente piorarem (LOEWENSTEIN; MULLER, 2009).

### 2.5.2 Eficácia

A melhora clínica não é imediata e frequentemente leva 2 a 12 meses até que a resposta seja observada (ZUR et al., 2002; MUELLER; BETTENAY, 1996; SCHNABL et al., 2006; REES, 2001), e recomenda-se a administração por longos períodos (ROBERTS et al., 2014).

A imunoterapia subcutânea é administrada via injeções e é a forma mais comum de IAE na medicina veterinária. Mais recentemente, via sublingual tornou-se disponível comercialmente (MARSELLA, 2010). Uma variação da IAE, a imunoterapia rápida, consiste na rápida conclusão da fase de indução, frequentemente em menos de 24h, afim de rapidamente atingir a fase de manutenção (MUELLER; BETTENAY, 2001).

Reações adversas tem sido descritas em cães, gatos e cavalos. O aumento no prurido generalizado é o efeito adverso mais comum. Menos comuns, reações no local da aplicação manifestadas por edema, prurido e/ou dor podem ser observadas. Em menos de 1% dos pacientes pode ocorrer anafilaxia, fraqueza, letargia, diarreia, vômito, ansiedade, urticária e edema (POWER, 2000; LOEWENSTEIN; MULLER, 2009).

## 2.6 Tipos de alérgenos

Extratos alérgicos são uma complexa mistura de componentes antigênicos (IPSEN et al., 1998) compostos por proteínas, carboidratos, lipídeos, enzimas e

glicoproteínas obtidos da fonte alérgica natural. Existem mais de 500 extratos alérgicos de ácaros, insetos, fungos, póles e epitélios (ESCH; PLUNKETT, 2013).

Para garantir a repetibilidade dos resultados no diagnóstico de doenças alérgicas, a padronização dos extratos é fundamental (DREBORG, 1993). Extratos alérgicos são padronizados pelos laboratórios fabricantes segundo a determinação da composição do alérgeno (afim de garantir que todas as partes do alérgeno estejam presentes), quantificação de alérgenos específicos (afim de garantir que os alérgenos essenciais estejam presentes constantemente) e quantificação da atividade alérgica total (afim de garantir que a potência total do extrato é consistente *in vitro* e *in vivo*) (IPSEN et al., 1998). Em medicina veterinária, os extratos são padronizados em peso/volume (p/v) ou unidades de proteína nitrogenada/mililitro (UPN/ml) (HILLIER; DEBOER, 2001).

Os extratos alérgicos também são classificados como de ocorrência natural ou modificados/recombinantes, e como aquosos ou contendo adjuvante ou preservativo (alumínio, propileno glicol ou glicerina) (PASSALACQUA et al., 2009; NIEDERBERGER, 2009). Extratos modificados/recombinantes são sintetizados de maneira purificada, de forma que somente as moléculas relevantes estejam presentes. Adjuvantes são componentes não imunogênicos que aumentam a antigenicidade através de uma resposta imune não patogênica quando combinados com um extrato alérgico. Ao aumentar a resposta imune, a quantidade de alérgeno pode ser reduzida ou a frequência de administração pode ser estendida, assim reduzindo possíveis efeitos adversos (PASSALACQUA et al., 2009).

### 3 ARTIGO

Artigo destinado à publicação na Veterinary Dermatology.

#### **EVALUATION OF INTRADERMAL TEST IN HORSES WITH ALLERGEN EXTRACTS OF POLENS, INSECTS AND THREE HISTAMINE CONCENTRATIONS**

Jegan, V.<sup>a,\*</sup>; Bastos, H.B.A.<sup>a</sup>; Cunha, V.S.<sup>b</sup>; Kretzmann, N.A.<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> REPROLAB - Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre-RS, Brazil

<sup>b</sup> IMMUNOTECH LABORATORIES, Rio de Janeiro-RJ, Brazil

\*Corresponding author. Tel.: +55 51 3308-6124; fax: +55 51 3308-8063

E-mail address: [vanessajegan.vet@gmail.com](mailto:vanessajegan.vet@gmail.com) (Jegan, V.)

Postal address: Avenida Bento Gonçalves, 9090, REPROLAB, cep. 91540-000, Porto Alegre - RS Brasil.

#### **ABSTRACT**

The intradermal test (IDT) is an important tool in the diagnosis of allergens involved in IgE-mediated hypersensitivity reactions. The aim of this study was to evaluate the IDT in nonallergic horses with allergenic extracts of *Cynodon dactylon*, *Lolium multiflorum*, *Paspalum notatum*, *Culex sp.* and *Aedes aegypti*, and three histamine concentrations, in two different volumes, and based on the results, verify the accuracy of IDT in allergic horses. IDT was performed on 17 nonallergic horses with three concentrations of each extract (1:2000v/w, 1:4000v/h and 18000v/w) and three histamine concentrations (0,1mg/ml, 0,05mg/ml and 0,025mg/ml) in two volumes (0,1 and 0,05ml). Based on the results obtained, IDT was performed in six allergic horses using extracts at the concentration of 1:2000v/w, histamine at a concentration of 0.025mg/ml, in a volume of 0,05ml. In nonallergic horses, none of the three concentrations of the extracts tested in the two volumes were irritant. Larger concentrations of histamine provoked larger and slightly more turgid wheals, and the larger the volume injected, the greater the reactions. The IDT performed in allergic horses showed reliability of the results because they demonstrated individual hypersensitivity and did not provoke irritative reactions. In conclusion, the different concentrations of extracts tested in nonallergic horses did not provoke false positive (irritant) reactions. The volume of 0,05ml is more recommended for execution of IDT because the applications with 0,1ml produced larger reactions, impairing the sensitivity

of the test. The concentration of 0,025mg/ml of the histamine solution caused the formation of smaller wheals, allowing a better accuracy of the *cut off* in the IDT. The allergenic extracts tested in allergic horses did not provoke reactions in all the animals, what could be considered an irritative reaction. Allergic horses presented different positive reactions, according to individual hypersensitivity, demonstrating true allergic sensitization.

Keywords: allergy, intradermal test, pollens, insects, hypersensitivity.

## INTRODUCTION

After dog and cats, horses are the most common species presented for clinical evaluation. Skin diseases are a source of animal annoyance, irritability, pruritus and secondary infections. In addition, skin diseases can interfere with the horse's ability to function in riding, working or show (SCOTT; MILLER, 2011). Allergy describes a type I hypersensitivity to an antigen, mediated by IgE antibodies (GERSHWIN, 2015). Type 1 hypersensitivity reactions to common environmental allergens have been implicated in the pathophysiology of several equine diseases, including atopic dermatitis (AD), recurrent urticaria (RU) (JOSE-CUNILLERAS et al., 2001) and insect bite hypersensitivity (IBH) (LORCH et al., 2001a). Horses with AD may have combined insect hypersensitivity and reactions to pollens, molds, dusts, danders or mites, showing a variety of syndromes similar to that seen with RU (FADOK, 2013). IBH is also a common allergic skin disease of horses and manifests as recurrent seasonal pruritus caused by the bites of insects, specifically of the genus *Culicoides* (SCHAFFARTZIK et al., 2012). Horses can show hypersensitivity reactions to other insects as well, including black-fly, mosquito, stable fly, hornfly and tabanids (FADOK, 2013). Intradermal (IDT) and serologic tests are used for detection of allergen-specific IgE (SCOTT; MILLER, 2011). IDTs are accepted worldwide as a standard method for identification of allergens causing allergic skin diseases (FADOK, 1995; WHITE, 2005) and has been practiced for decades in human and veterinary medicine. The primary utility of IDT is in the demonstration of IgE-mediated allergen hypersensitivity (HILLIER; DEBOER, 2001) for the formulation of immunotherapy along with providing identification of allergens that could be useful when creating avoidance strategies (LORCH et al., 2001a; MORRIS; LINDBORG, 2003). Allergen-specific immunotherapy (ASIT) is widely used in human

and small animal medicine (GINEL et al., 2014). Many studies have shown good results of this therapy in horses with AD (LOEWENSTEIN; MUELLER, 2009; RADWANSKI et al., 2012; STEPNIK et al., 2012) and IBH, where a clinical improvement was observed from the first year of therapy (ANDERSON et al., 1996). Normal horses may also exhibit a moderate degree of allergen reactivity at the allergen concentrations commonly used for IDT. Explanations for these reactions are prior subclinical sensitization to the allergen, and testing the allergen at a concentration that exceeds threshold for normal individuals (MORRIS; LINDBORG, 2002), resulting in unspecific false positive reactions (irritant) (HILLIER; DEBOER, 2001). Allergenic extracts are complex mixtures of proteins (DREBORG, 1993) and should be tested in the highest concentration of the extract that does not cause an irritant reaction that may be interpreted as a false positive reaction (HILLIER; DEBOER, 2001). To ensure the repetibility of the results in the diagnosis of allergic diseases, padronization of the extracts is fundamental (DREBORG, 1993) and is widely searched. Variability is inherent, as most of the solutions are whole extracts that incorporate variable quantities of relevant allergens (MORRIS; LINDBORG, 2003). Various studies tried to identify ideal concentrations of the extracts for IDT, but many gaps still have to be filled (BAXTER; VOLGELNEST, 2008; MORRIS; LINDBORG, 2003; BAUER et al., 2009; ROBERTS et al., 2014). The current method for establishing the threshold concentration is through testing serial allergens dilutions on nonallergic animals and adjusting the concentrations so that no more than 10% of normal animals have positive reactions, and then to test the new concentrations on diagnosed allergic animals to verify its accuracy (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001). The IDT reactions can be evaluated subjectively and objectively. In the subjectively evaluation, test sites are graded on a scale of 0 to 4+, based on wheal diameter, erithema and turgidity, using the positive and negative controls as reference points (MORRIS; LINDBORG, 2003). Histamine solution is the most common positive control and receives a score of 4+, and 0,9% buffered saline is the negative control solution, receiving the score of 0 (FADOK, 1995; HILLIER; DEBOER, 2001; MORRIS, LINDBORG, 2003). In the objective evaluation, the wheals are measured with a pachimeter (average of the largest and smallest diameter) (HILLIER; DEBOER, 2001). The aim of this study was to evaluate the IDT in nonallergic horses with allergenic extracts of *Cynodon dactylon*, *Lolium multiflorum*, *Paspalum notatum*, *Culex sp.* and *Aedes aegypti*, and three histamine concentrations, in two different volumes, and based on the results, verify the accuracy of IDT in allergic horses.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Horses**

This study was carried out with an Animal Ethical Use Committee approved protocol at the Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil (protocol number 30716, 2017).

Seventeen clinically nonallergic horses between 8 to 20 years of age weighing approximately 500 kg, were used. Horses were kept in natural pastures with free access to mineral supplement and water and remained healthy and with an average body condition score 3.5 (scale 1 to 5) (MALSCHITZKY et al., 2001). Inclusion criteria required no previous history of seasonal or perennial pruritus, recurrent urticaria or respiratory disease, and no cutaneous lesions in the day of testing. Then, the ideal concentrations obtained from the nonallergic horses were used to perform an IDT in six clinically allergic horses between 3,5 to 10 years of age.

The horses had not received medications that could influence the results of the intradermal testing for at least 8 weeks before the IDT. The medications included oral, injectable or topic glucocorticoids, antihistamines, nonsteroidal anti-inflammatories or supplements in which the exact ingredients could not be determined.

### **Histamine hydrochloride solution (positive control solution)**

Each healthy horse was intradermally tested with three different concentrations (0,1mg/ml, 0,05mg/ml and 0,025mg/ml), and two volumes (0,05ml and 0,1ml) of histamine hydrochloride solution (FDA Allergenic Laboratories, RJ, BRA). Each allergic horse was tested with one concentration (0,025mg/ml) and volume (0,05ml) of positive control solution. The histamine hydrochloride solutions were stored at 4°C and same solution was used in all horses.

### **Negative control solution**

Two volumes (0,05ml and 0,1ml) of the negative control solution (0,9% buffered saline, FDA Allergenic Laboratories, RJ, BRA) were used for IDT in healthy horses. In



allergic horses, the volume of 0,05ml was used. The solutions were stored at 4°C and same solution was used in all horses.

## **Allergens**

Five commercially available aqueous allergens (FDA Allergenic Laboratories, RJ, BRA) were used for IDT. The allergens included two insects (*Culex sp.* and *Aedes sp.*) and three grasses (*Cynodon dactylon*, *Lolium multiflorum* and *Paspalum notatum*). In healthy, clinically nonallergic horses, each allergen was tested in three different concentrations (1:2000w/v, 1:4000w/v and 1:8000w/v) and two volumes (0,05ml and 0,1ml). In allergic horses, the extracts were used at 1:2000w/v and 0,05ml. The allergens were stored at 4°C and same solution was used in all horses.

## **Intradermal testing in healthy, clinically nonallergic horses**

Each horse was tested with all histamine, allergens concentrations and volumes at the same time. The solutions were removed from refrigerator 15 minutes prior to testing to be at room temperature, and previously premeasured into 0,3ml syringes and 27-G needles (Becton Dickinson®). IDT was performed after clipping the hair with a number 40 clipper blade on the left and right lateral aspects of the neck, on middle third between the jaw and the scapulothoracic joint, and 10cm below the base of the mane. Using a waterproof pen, the skin test sites were marked and injected with 0,05ml and 0,1ml of each histamine solution, negative control solution and allergen extract. Two horses needed chemical restraint and received 0,01mg/kg of detomidine hydrochloride intravenously prior to testing, to allow the test to be performed. The other horses allowed the test without sedation. Each test site was evaluated by the same investigator, 15 minutes post injection for erythema and induration, objectively measuring (average of the vertical and horizontal diameter) any wheal formation with a pachymeter. A reaction to an allergen was considered positive if it was erythematous and/or indurated, and its wheal diameter was equal or greater than the mean diameter between the negative control and the positive control solution (*cut off*).

## **Intradermal testing in allergic horses**

The allergic horses were prepared for IDT following the same protocol used in the nonallergic horses, but only one side of the neck was clipped. All horses allowed the test to be performed without chemical restraint. Each allergic horse was tested with histamine hydrochloride solution at 0,025mg/ml, allergen extracts at 1:2000w/v and negative control solution, at 0,05ml. After performing the IDT, each test site was evaluated by the same investigator, 15 minutes post injection for erythema and induration, objectively measuring (average of the vertical and horizontal diameter) any wheal formation with a pachymeter. A reaction to an allergen was considered positive if it was erythematous and/or indurated, and its wheal diameter was equal or greater than the mean diameter between the negative control and the positive control solution (*cut off*).

## **Statistical analysis**

Descriptive statistical analysis was used to evaluate the allergen reactions. Threshold concentration were determined based on the highest concentration of the allergen tested where <10% of horses had a positive reaction at 15 minutes. Positive reactions were defined as a wheal diameter was equal or greater than the mean diameter between the negative control and the positive control solution (*cut off*), with erythema and/or induration.

## **RESULTS**

### **Histamine hydrochloride solution (positive control solution)**

All histamine concentrations resulted in positive reactions in both nonallergic and allergic horses. The reactions were characterized by round/oval wheals with the maximum magnitude of wheal formation occurring 15 minutes post injection. All reaction sites were indurated. At both volumes, the more concentrated solutions produced larger and slightly firmer reactions than the less concentrated solutions, but 0,1ml produced the larger reactions. The mean diameters of the reactions are listed in Table 1.

**Table 1:** Mean 15min intradermal testing reactions of 17 nonallergic horses to histamine hydrochloride solution.

Control solution	Volume	Concentration (mg/ml)		
		0,1	0,05	0,025
		Mean		
Histamine hydrochloride solution	0,05ml	19,90	18,11	16,71
	0,1ml	21,66	20,29	19,11

### Negative control solution

All volumes resulted in negative reactions in all horses of the study. The mean diameters of the reactions with 0,05ml were 8,51mm and 0,1ml were 9,95mm.

### Allergen extract reactions in nonallergic horses

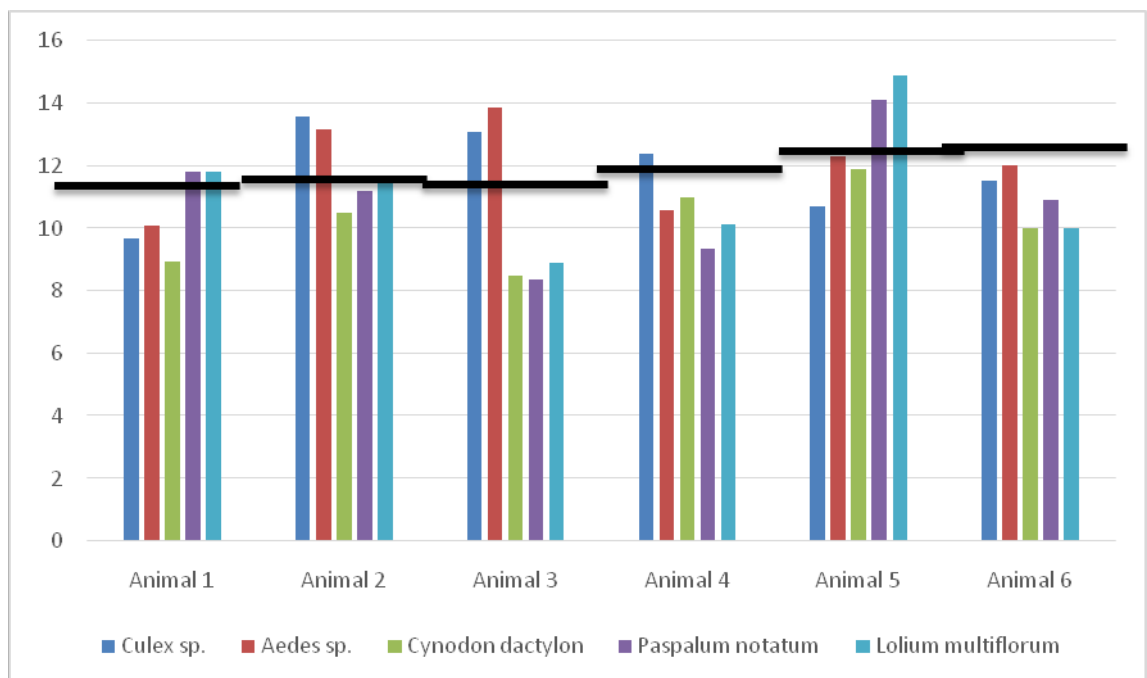
At the different concentrations of extracts tested in nonallergic horses, we were unable to establish their threshold concentration (Table 2).

**Table 2:** Mean 15min intradermal testing reactions of 17 nonallergic horses to five allergen extracts.

Allergen extract	Volume	Concentration (v/w)		
		1:2000	1:4000	1:8000
		Mean		
<i>Culex sp.</i>	0,05ml	10,52	9,57	8,70
	0,1ml	12,56	10,95	10,54
<i>Aedes sp.</i>	0,05ml	10,41	9,37	8,80
	0,1ml	12,52	11,17	10,54
<i>Cyndon dactylon</i>	0,05ml	9,89	9,03	8,83
	0,1ml	12,00	11,29	10,57
<i>Lolium multiflorum</i>	0,05ml	10,24	9,82	9,46
	0,1ml	11,97	10,79	10,47
<i>Paspalum notatum</i>	0,05ml	10,42	9,82	9,10
	0,1ml	11,82	11,16	10,47

## Intradermal testing in allergic horses

Based on the results of nonallergic horses, we suggested that at a volume of 0,05ml, a concentration of 0,025mg/ml of the positive control solution and 1:2000v/w of the allergen extracts the IDT in allergic animals would reflect true sensitization. So, IDT was performed as described previously in six clinically allergic horses: four horses exhibit clinical signs of Insect Bite Hypersensitivity (animals 2, 3, 4 and 6) and two horses exhibit clinical signs of Atopic Dermatitis (animals 1 and 5). Animals 2 and 3 had positive reactions to *Culex sp* and *Aedes sp*; animal 4 had positive reactions to *Culex sp*; animals 1 and 5 had positive reactions to *Paspalum notatum* and *Lolium multiflorum* and animal 6 had negative reactions to all allergens tested (Figure 4). In Figure 4 we can observe that the allergic horses tested showed positive results for different groups of allergens (pollens or insects) reacting for more than one group of extracts at the same test. None of the allergic horses showed positive reactions to *Cynodon dactylon*.



**Figure 4:** Media 15min intradermal testing reactions of 6 allergic horses to five allergen extracts. The black bar shows the *cut off*.

## DISCUSSION

The differentiation of subclinical allergies from false positive irritant reactions in horses can be challenging, but an attempt to do so was important when utilizing clinically normal animals for this study. The IDT reactions can be evaluated subjectively and objectively. The objective evaluation of IDT reactions is considered one of the established evaluation methods (HILLIER; DEBOER, 2001) and was chosen for this study for its more precise information.

In the current study the examination of the reactions was performed at 15min, although in other studies the examination is performed at 30min, 1h and 4h. Assessment of skin reactions 24h after injection may not be necessary (RENDLE et al., 2010), as delayed responses are the least common in many studies (TALLARICO; TALLARICO, 1998; JOSE-CUNILLERAS et al., 2001) and positive results at this time were preceded by positive results at earlier time points (RENDLE et al., 2010).

Histamine solution is typically used at 1:100.000w/v (0,275mg/ml) and 0,1ml (MORRIS; LINDBORG, 2003; BAXTER; VOLGELNEST, 2008; ROBERTS et al., 2014) or 0,05ml (RENDLE et al., 2010). In dogs, 1:10.000w/v (0,1mg/ml) at 0,05ml is recommended for IDT (HENSEL et al., 2004; BAUER et al., 2009). When we compared the three histamine concentrations (0,1mg/ml, 0,05mg/ml and 0,025mg/ml) and two volumes, we found that the highest concentration resulted in larger and more indurated reactions than the lowest concentration, but the volume of 0,1ml produced the larger reactions. Mean wheal diameter with the volume of 0,05ml were 19,90mm (0,1mg/ml), 18,11mm (0,05mg/ml) and 16,71mm (0,025mg/ml), and with the volume of 0,1ml were 21,66mm (0,1mg/ml), 20,29mm (0,05mg/ml) and 19,11mm (0,025mg/ml). Positive control reactions with wheal diameters <10mm should not be used for skin test evaluation (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001) because there is a risk of misinterpreting a weak reaction to an allergen as positive. Still, larger reactions obtained with higher concentrations of the positive control at 0,1ml increase the *cut off*, which may end up compromising the test sensibility because extract reactions must be compared with the positive control. In a work with dogs, Hensel et al., (2004) found that at 0,1mg/ml and 0,05ml, the average wheal diameter for histamine concentration was 14mm. In our work, the histamine concentration at 0,025mg/ml and 0,05ml produced the smallest mean wheal diameter, allowing a more accurate *cut off* in IDT.

The allergens used in IDT should be tested at the highest concentration that does not produce false positive (irritant) reactions at least in 90% of normal individuals. If the allergen concentration is below its threshold concentration, allergic individuals may fail to react, resulting in false-negative results (REEDY et al., 1997). The current method to establish the threshold concentration of an allergen is to intradermally inject serial dilutions of the allergen extract in clinically healthy nonallergic horses to determine the highest concentration that does not produce positive reactions in >10% of the horses (ROBERTS et al., 2014). In our work, we tested three different concentrations of two insects and three pollen extracts at two volumes. Using healthy horses, we were unable to identify their threshold values, because none of the horses tested reacted positive to concentrations we evaluated. The possible reasons for this to happen may be the small number of animals in this study, or testing the allergens at concentrations that were not irritant.

To verify if the extracts tested are able to identify true sensitization in allergic horses, we performed an IDT in six allergic horses using the allergic extracts at their highest concentrations that did not produce irritant reactions, as recommended in the literature. The allergic horses tested showed classical signs of allergic skin diseases, but no respiratory signs. The animals were between 3,5 to 10 years of age, and had a history of mild to severe seasonal pruritus directed to the neck and chest, occasionally developing secondary lesions in the neck, chest, lateral thorax and between the front legs. Four horses were suspected of IBH (animals 2, 3, 4 and 6) and two horses of AD (animals 1 and 5). Animals 2 and 3 had positive reactions to *Culex sp* and *Aedes sp*; animal 4 had positive reactions to *Culex sp*; animals 1 and 5 had positive reactions to *Paspalum notatum* and *Lolium multiflorum* and animal 6 had negative reactions to all allergens tested. The IDT performed in animals 1 to 5 was able to support their suspected diagnosis, demonstrating the allergic reactions in the skin to the allergens tested. In animal 6 the IDT resulted negative to all allergens tested, suggesting that could be a sensitization to other allergens. IBH is an allergic disease that could be triggered by other insects than those we tested in this work, like black-fly, stable fly, hornfly and tabanids (FADOK, 2013), and we supposed that animal 6 may be allergic to one of those other insects. As the results of IDT in allergic horses were miscellaneous, we support that at 1:2000w/v the extracts tested showed true sensitization.

Apparently, *Cynodon dactylon* extract had no cross reaction with *Paspalum notatum* and *Lolium multiflorum* as none of the horses tested showed positive results.

There may be a cross reaction between *Paspalum notatum* and *Lolium multiflorum* as some allergic horses showed positive reactions to both at the same IDT. This was also observed with the insect extracts, suggesting that a co-sensitization may be present. In conclusion, this work made possible to identify that the different concentrations of extracts tested did not provoke false positive reactions (irritant) in allergic horses. We considered that the volume of 0,05ml is recommended for intradermal allergy testing in horses, because 0,1ml produced larger reactions, impairing the sensitivity of IDT. The concentration of 0,025mg/ml of the histamine solution is preferred to the other concentrations tested, as it caused the formation of smaller wheals, allowing more accuracy of the *cut off* in the intradermal test. Higher concentrations of the positive control increase the *cut off*, which may end up compromising the test sensibility because extract reactions must be compared with the positive control. The allergenic extracts tested in allergic horses at 1:2000w/v concentration were able to show true allergic sensitization because they did not provoke reactions in all horses, which could be considered irritant reactions. Further studies are needed to confirm our results and evaluate more allergic animals. Also, higher concentrations of the allergenic extracts could be tested in nonallergic horses in order to establish their irritative threshold concentration.

## **CONFLICT OF INTEREST**

None.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors wish to thank Immunotech Laboratories (Immunotech Laboratories, RJ, BRA) for providing the extracts and control solutions produced by FDA Allergenic (FDA Allergenic Laboratories, RJ, BRA). The authors also acknowledge the financial support by the following Brazilian agencies: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

#### 4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, este trabalho possibilitou identificar que as diferentes concentrações dos extratos testados não provocaram reações falso positivas (irritantes) em eqüinos não alérgicos. Consideramos que o volume de 0,05ml seja mais recomendado para realização dos testes, pois as aplicações com 0,1ml produziram reações maiores, prejudicando a sensibilidade do teste. A concentração de 0,025mg/ml da solução de histamina é preferida às demais concentrações testadas, pois provocou a formação de halos menores, permitindo maior acurácia do *cut off* no teste intradérmico. Os extratos alergênicos testados em equinos alérgicos na concentração de 1:2000w/v foram capazes de mostrar verdadeira sensibilização alérgica pois não provocaram reações em todos os animais, o que poderia ser considerado uma reação irritativa. Além disso, os equinos alérgicos apresentaram reações positivas diferentes entre si, de acordo com a hipersensibilidade individual. Novos estudos são necessários para confirmar nossos resultados e avaliar maiores concentrações dos extratos alergênicos testados afim de estabelecer seu limiar irritativo.



## 5 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (2012). **Cellular and molecular immunology**. Elsevier/Saunders, 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia, x, 545 p.
- ANDERSON, G. S.; BELTON, P.; JAHREN, E. LANGE, H.; KLEIDER, N. Immunotherapy trial for horses in British Columbia with *Culicoides* (Diptera: *Ceratopogonidae*) hypersensitivity. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, p. 458-466, 1996.
- BAUER, C. L.; HENSEL, P.; AUSTEL, M.; KEYS, D. Determination of irritant threshold concentrations to weeds, trees and grasses through serial dilutions in intradermal testing on healthy clinically nonallergic dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 192-197, 2009.
- BAXTER, C. G.; VOGELNEST, L. J. Determination of threshold concentrations of multiple allergenic extracts for equine intradermal testing using normal horses in three seasons. **Veterinary Dermatology**, v. 19, p. 305-313, 2008.
- BOUSQUET, J.; LOCKEY, R.; MALLING, H. J. et al. Allergen immunotherapy: therapeutic vaccines for allergic diseases. World Health Organization. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v. 81, n. 5, p. 401-5, 1998.
- BUECHNER-MAXWELL, V., MANNING, T. Equine skin: structure, immunologic function, and methods of diagnosing disease. **Compendium**, v. 27, n. 6, p. 463, 2005.
- DE BOER, D. J.; VERBRUGGE, M. J. Results of canine serum allergen-specific IgE determinations performed by commercial laboratories on canine IgE-free samples and on samples from nonallergic dogs. Em **20th Proceedings of North American Veterinary Dermatology Forum**, p.191, 2005.
- DELGER, J. Intradermal testing and immunotherapy in horses. **Veterinary Medicine**, p. 635-639, 1997.
- DREBORG, S. Standardization of allergenic preparation by *in vitro* and *in vivo* methods. **Allergy**, v. 48, n. 14, 63-70, 1993.
- EDER, C.; CRAMERI, R.; MAYER, C.; EICHER, R.; STRAUB, R.; GERBER, H.; LAZARY, S.; MARTI, E. Allergen-specific IgE levels against crude mould and storage mite extracts and recombinant mould allergens in sera from horses affected with chronic bronchitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 73, n. 3-4, p. 241-53, 2000.
- ESCH, R. E.; PLUNKETT, G. A. Immunotherapy preparation guidelines, rules, and regulation. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 13, p. 406-413, 2013.

FADOK, V. A.; GREINER, E. C. Equine insect hypersensitivity: skin test and biopsy results correlated with clinical data. **Equine Veterinary Journal**, v. 22, p. 236-240, 1990.

FADOK, V. A. Overview of equine pruritus. **Veterinary Clinics of North America, Equine Practice**, v. 11, p. 1-9, 1995.

FADOK, V. A. Update on equine allergies. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 29, p. 541-550, 2013.

FREY, R.; BERGVALL, K.; EGENVALL, A. Allergen-specific IgE in Icelandic horses with insect bite hypersensitivity and healthy controls, assessed by Fcε R1alpha-ased serology. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 126, p. 102-109, 2008.

GERSHWIN, L. J. Comparative Immunology of Allergic Responses. **Animal Bioscience**, v. 3, p. 327-346, 2015.

GINEL, P. J.; HERNÁNDEZ, E.; LUCENA, R.; BLANCO, B.; NOVALES, M.; MOZOS, E. Allergen-specific immunotherapy in horses with insect bite hypersensitivity: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. **Veterinary Dermatology**, v. 25, n. 1, p. 29-e10, 2014.

GREINER, E. C. Entomologic evaluation of insect hypersensitivity in horses. In: Fadok, V.A. (1995). **The Veterinary Clinics of North America, Equine Practice**. Philadelphia: W.B. Saunders, p. 29-41.

HALES, B. J.; MARTIN, A. C.; PEARCE, L. J.; LAING, I. A.; HAYDEN, C. M.; GOLDBLATT, J.; LE SOUËF, P. N.; THOMAS, W. R. IgE and IgG anti-house dust mite specificities in allergic disease. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 118, n. 2, p. 361-7, 2006.

HAMILTON, R. G. Clinical laboratory assessment of immediate-type hypersensitivity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, p. S284-296, 2010.

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

HILLIER, A.; DEBOER, D. The ACDV task force on canine atopic dermatitis (XVII): intradermal testing. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 81, p. 289-304, 2001.

HINDEN, S.; KLUKOWSKA-RÖTZLER, J.; JANDA, J.; MARTI, E. I.; GERBER, V.; ROOSJE, P. J. Characterization of the inflammatory infiltrate and cytokine expression in the skin of horses with recurrent urticarial. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 6, p. 503-e99, 2012.

IPSEN, H.; LARSEN, J. N.; NIEMEIJER, N. R.; LOWERSTEIN, H.; SCHOU, C.; SPANGFORT, M. D. Allergenic extracts in: Middleton, E., Reed, C. E., Ellis, E. F., et al.

(Eds), **Allergy principles and practice**, 5<sup>th</sup> Edition, Mosby Year Book, St Louis, pp. 404-416. 1998

JOSE-CUNILLERAS, E.; KOHN, C. W.; HILLIER, A.; SAVILLE, W. J.; LORCH, G. Intradermal testing in healthy horses and horses with chronic obstructive pulmonary disease, recurrent urticaria, or allergic dermatitis. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 219, p. 1115-1121, 2001.

JUTEL, M.; AKDIS, C. A. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. **Allergy**, n. 66, p. 725-732, 2011.

KEPPEL, K. E.; CAMPBELL, K. L.; ZUCKERMANN, F. A.; GREELEY, E. A.; SCHAEFFER, D. J.; HUSMANN, R. J. Quantitation of canine regulatory T cell populations, serum interleukin-10 and allergen-specific IgE concentrations in healthy control dogs and canine atopic dermatitis patients receiving allergen-specific immunotherapy. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 123, n. 3-4, p. 337-344, 2008.

LEBIS, C.; BOURDEAU, P.; MARZIN-KELLER, F. Intradermal skin tests in equine dermatology: a study of 83 horses. **Equine Veterinary Journal**, v. 34, p. 666-671, 2002.

LITTLEWOOD, J. Diagnostic procedures in equine skin disease. **Equine Veterinary Education**, v. 9, n. 4, p.174-176, 1997.

LOEWENSTEIN, C.; MUELLER, R. S. A review of allergen-specific immunotherapy in human and veterinary medicine. **Veterinary Dermatology**, 20:84-98, 2009.

LORCH, G.; HILIER, A.; KWOCHKA, K. W.; SAVILLE, W. A.; LEROY, B. E. Results of intradermal tests in horses without atopy and horses with atopic dermatitis of recurrent urticarial. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 7, p. 1051-9, 2001a.

LORCH, G.; HILIER, A.; KWOCHLA, K. W.; SAVILLE, W. A.; LEROY, B. E. Comparisson of immediate intradermal test reactivity with serum IgE quantitation by use of a radioallergosorbent test and two ELISA in horses with and without atopy. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 218, p. 1314-1322, 2001b.

MAKHIJA, M.; O'GORMAN, M. R. Chapter 31: Common in vitro tests for allergy and immunology. **Allergy & Asthma Proceedings**, v. 33, n. 1, p. S108-111, 2012.

MALSCHITZKY, E.; SCHILELA, A.; MEIRELLES, L. S.; MATTOS, A. L. G.; GREGORY, R.M.; MATTOS, R.C. Artificial photoperiod in pregnant mares and its effect on pregnancy length and postpartum reproductive performance. **Pferdeheilkunde**, v. 17, p. 565-569, 2001.

MARSELLA, R.; JOHNSON, C.; AHRENS, K. First case report of ultrastructural cutaneous abdnormalities in equine atopic dermatitis. **Research in Veterinary Science**, v. 97, p. 383-386, 2014.

MARSELLA, R. Tolerability and clinical efficacy of oral immunotherapy with house dust mites in a model of canine atopic dermatitis: a pilot study. **Veterinary Dermatology**, v. 21, p. 566-571, 2010.

MARTI, E.; EHRENSPERGER, F.; BURGER, D.; OUSEY, J.; DAY, M. J.; WILSON, A. D.. Maternal transfer of IgE and subsequent development of IgE responses in horses (*Equus caballus*). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 127, p. 203–211, 2009.

MATTHEWS, A. G.; IMLAH, P.; MCPHERSON, E. A. A reagin-like antibody in horse serum. 1. Occurrence and some biological properties. **Veterinary Research Communications**, v. 6, p. 13–23, 1983.

MORGAN, E. E.; MILLER, W. H. JR.; WAGNER, B. A comparison of intradermal testing and detection of allergen-specific immunoglobulin E in serum by enzyme-linked immunosorbent assay in horses affected with skin hypersensitivity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 120, p. 160-167, 2007.

MORRIS, D. O.; LINDBORG, S. Determination of 'irritant' threshold concentrations for intradermal testing with allergenic insect extracts in normal horses. **Veterinary Dermatology**, v. 14, p. 31-36, 2003.

MUELLER, R. S.; BETTENAY, S. V. Evaluation of the safety of an abbreviated course of injections of allergen extracts (rush immunotherapy) for the treatment of dogs with atopic dermatitis. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, p. 307-310, 2001.

MUELLER, R. S.; BETTENAY, S. V. Long-term immunotherapy of 146 dogs with atopic dermatitis - A retrospective study. **Aust Vet Practitioner**, v. 26, p. 128-132, 1996.

NIEDERBERGER, V. Allergen-specific immunotherapy. **Immunol Letters**, v. 122, p. 131-133, 2009.

OLIVRY, T.; DEBOER, D. J.; GRIFFIN, C. E. The ACDV task force on canine atopic dermatitis: forewords and lexicon. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, V.81, p.143-146, 2001.

OLIVRY, T.; SARIDOMICHELAKIS, M. Evidence-based guidelines for anti-allergic drug withdrawal times before allergen-specific intradermal and IgE serological tests in dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 24, p. 225-e249, 2013.

PASSALACQUA, G.; COMPALATI, E.; CANONICA, G. W. Advances in allergen-specific immunotherapy. **Current Drug Targets**, v. 10, p. 1255-1262, 2009.

PETERSEN, A.; SCHOTT, H. C. 2nd. Effects of dexamethasone and hydroxyzine treatment on intradermal testing and allergen-specific IgE serum testing results in horses. **Veterinary Dermatology**, v. 20, n. 5-6, p. 615-622, 2009.

POMEROY, B. Allergy and allergic skin reactions in the dog. **Cornell Veterinarian**, p. 335-341, 1934.

POWER, H. Why do owners discontinue immunotherapy? **Veterinary Dermatology**, v. 11, p. 14, 2000.

RADWANSKI, N. E.; MORRIS, D. O.; BOSTON, R. C. CERUNDOLO, R., LLE, K. W. A prospective evaluation of clinical and immunological responses to allergen-specific immunotherapy in horses with atopic dermatitis. **Veterinary Dermatology**, v. 23 (Supl. 1), p. 42, 2012.

REEDY, L. M.; MILLER, W. H.; WILLEMSE, T. (1997) **Allergic skin diseases of the dog and cat**,; 2nd Ed. W.B. Saunders, London, UK, p. 83-115.

REES, C. A. Response to immunotherapy in six related horses with urticaria secondary to atopy. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, p. 753-755, 2001.

REINERO, C. R.; BYERLY, JR.; BERGHAUS, R. D.; BERGHAUS, L. J.; SCHELEGLE, E. S.; HYDE, D. M.; GERSHWIN, L. J. Rush immunotherapy in an experimental model of feline allergic asthma. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 110, p. 141-153, 2006.

RENDLE, D. I.; DURHAM, A. E.; WYLIE, C. E.; NEWTON, J. R. Results of intradermal testing for the investigation of atopic dermatitis and recurrent urticaria in 50 horses in the south of England. **Equine Veterinary Education**, v. 22, p. 616-622, 2010.

ROBERTS, H. A.; HURCOMBE, S. D. A.; HILLIER, A.; LORCH, G. Equine intradermal test threshold concentrations for house dust mite and storage mite allergens and identification of stable acari fauna. **Veterinary Dermatology**, v. 25, p. 124-e36, 2014.

RÜFENACHT, S.; MARTI, E.; VON TSCHARNER, C.; DOHERR, M. D.; FORSTER, U.; WELLE, M.; ROOSJE, P. J. Immunoglobulin E-Bearing Cells and Mast Cells in Skin Biopsies of Horses With Urticaria. **Veterinary Dermatology**, v.16, p. 94-101, 2005.

SCHAFFARTZIK, A; HAMZA, E.; JANDA, J.; CRAMERI, R.; MARTI, E.; RHYNER, C.; Equine insect bite hypersensitivity: what do we know? **Veterinary Immunology Immunopathology**. V. 147, p.113-26, 2012.

SCHNABL, B.; BETTENAY, S. V.; DOW, K.; MUELLER, R. S. Results of allergen-specific immunotherapy in 117 dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Record**, v. 158, p. 81-5, 2006.

SCOTT, D.; MILLER, W. **Equine Dermatology**. 2<sup>nd</sup> Edition, Elsevier, p. 536. 2011

SCOTT, D. W. Observations on Canine Atopy. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 17, p. 91-100, 1981.

SCOTT, D. W. Skin of the neck, mane and tail of the curly horse. **Equine Veterinary Education**, v. 16, n. 4, p. 201-206, 2004.

SCOTT, D., W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Small animal dermatology**. 6th ed, Philadelphia: W. B. Souders Company, 2001.

SHIDA, M.; KADOYA, M.; PARK, S. J.; NISHIFUJI, K.; MOMOI, Y.; IWASAKI, T. Allergen-specific immunotherapy induces Th1 shift in dogs with atopic dermatitis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 102, n 1-2, p. 19-31, 2004.

SICHERER, S. H.; WOOD, R. A. Allergy testing in childhood: using allergenspecific IgE tests. **Pediatrics**, v. 129, p. 193-197, 2012.

SLOET VAN OLDRUITENBORGH-OOSTERBAAN, M. M.; VAN POPPEL, M.; DE RAAT, I. J.; VAN DEN BOOM, R.; SAVELKOUL, H. F. Intradermal testing of horses with and without insect bite hypersensitivity in The Netherlands using an extract of native *Culicoides* species. **Veterinary Dermatology**, v. 20, p. 607-14, 2009.

SMITH, F. Histology of the skin of the horse. **Journal of Anatomy and Physiology**, v. 22(Pt 2), p.142:153, 1888.

STEPNIK, C.; OUTERBRIDGE, C.; WHITE, S.; KASS, P. Equine atopic skin disease and response to allergenspecific immunotherapy: a retrospective study at the University of California-Davis (1991–2008). **Veterinary Dermatology**, v. 23, p. 29-e7, 2011.

TALLARICO, N. J.; TALLARICO, C. M.; Results of intradermal allergy testing and treatment by hyposensitization of 64 horses with chronic obstructive pulmonary disease, urticaria, headshaking, and/or reactive airway disease. **Veterinary allergy clinic and immunology**, v. 6, p.25-35, 1998.

WAGNER, B. IgE in horses: Occurrence in health and disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, p. 21-30, 2009.

WAGNER, B.; MILLER, W. H. JR.; ERB, H. N.; LUNN, P. D.; ANTCZAK, D. F. Sensitization of skin mast cells with IgE antibodies to *Culicoides* allergens occurs frequently in clinically healthy horses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 132, p. 53-61, 2009.

WAGNER, B.; MILLER, W. H.; MORGAN, E. E.; HILLEGAS, J. M.; ERB, H. N.; LEIBOLD, W.; ANTCZAK, D. F. IgE and IgG antibodies in skin allergy of the horse. **Veterinary Research**, v. 37, p. 813- 825, 2006.

WAGNER, B.; RADBRUCH, A.; ROHWER, J.; LEIBOLD, W. Monoclonal anti-equine IgE antibodies with specificity for different epitopes on the immunoglobulin heavy chain of native IgE. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 92, p. 45–60, 2003.

WAKURI, H.; MUTOH, K.; ICHIKAWA, H.; LIU, B. Microscopic anatomy of the equine skin with special reference to the dermis. **Okijamas Folia Anatomy Japan**, v. 72, n. 2-3, p. 177-83, 1995.

WASSOM, D.; GRIEVE, R. In vitro measurement of canine and feline IgE: a review of Fc epsilon R1 alpha-based assays for detection of allergen-reactive IgE. **Veterinary Dermatology**, v. 9, p. 173-178, 1998.

WHITE, S. D. Advances in equine atopic dermatitis, serologic and intradermal allergy testing. **Clinical Techniques in Equine Practice**, v. 4, p. 311–3, 2005.

WILSON, A. D.; HARWOOD, L. J.; BJORNSDOTTIR, S.; MARTI, E.; DAY, M. J. Detection of IgG and IgE serum antibodies to Culicoides salivary gland antigens in horses with insect dermal hypersensitivity (sweet itch). **Equine Veterinary Journal**, v. 33, p. 707–713, 2001.

ZUBERBIER, T. Classification of urticaria. **Indian Journal of Dermatology**, v. 58, p.208-10, 2013.

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

## APÊNDICE A



Fotos representativas do eqüino não alérgico preparado para realização do teste intradérmico. Região da lateral do pescoço esquerda e direita, respectivamente, com tricotomia e dermomarcação.



## APÊNDICE B



Fotos representativas do teste alérgico intradérmico em equino não alérgico. Região da lateral do pescoço esquerda e direita, respectivamente, com tricotomia e dermomarcação das reações após 15 minutos.

## APÊNDICE C



Fotos representativas do animal 6 evidenciando as lesões cutâneas e o teste intradérmico, respectivamente.

## APÊNDICE D



Fotos representativas do animal 5 evidenciando as lesões cutâneas e o teste intradérmico, respectivamente.

## APÊNDICE E



Fotos representativas do animal 2 evidenciando as lesões cutâneas e o teste intradérmico, respectivamente.