



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

INFLAMAÇÃO CUTÂNEA EM MODELO ANIMAL DE DERMATITE ATÓPICA CANINA

TALITA DE CÁSSIA BORGES CASTRO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

**BRASÍLIA/DF
MARÇO/2018**



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária

Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal

INFLAMAÇÃO CUTÂNEA EM MODELO ANIMAL DE DERMATITE ATÓPICA CANINA

TALITA DE CÁSSIA BORGES CASTRO

ORIENTADOR: EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
EM SAÚDE ANIMAL**

PUBLICAÇÃO: 147/2018

**BRASÍLIA/DF
MARÇO/2018**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

CASTRO, T.C.B. Inflamação cutânea em modelo animal de dermatite atópica canina. Brasília: Faculdade de Agronomia e Veterinária, Universidade de Brasília, 2017, 14p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de Mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos; foi passada pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na secretaria do Programa. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Castro, Talita de Cássia Borges

Inflamação cutânea em modelo animal de dermatite atópica canina./ Talita de Cássia Borges orientação de Eduardo Maurício Mendes de Lima - Brasília, 2018.

14 p. : il.

Dissertação de mestrado (M) - Universidade de Brasília/ Faculdade de Agronomia e Veterinária, 2018.

1. Modelo murino. 2. C57Bl6. 3. Atopia canina.
4. Alergia. I. Lima, E.M.M. II. Doutor

Agris/FAO

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

INFLAMAÇÃO CUTÂNEA EM MODELO ANIMAL DE DERMATITE ATÓPICA CANINA

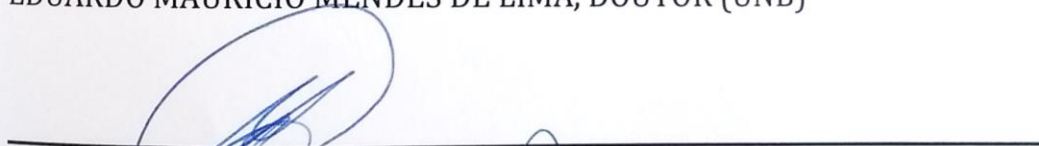
TALITA DE CÁSSIA BORGES CASTRO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM SAÚDE ANIMAL, COMO
PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS A
OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
SAÚDE ANIMAL.

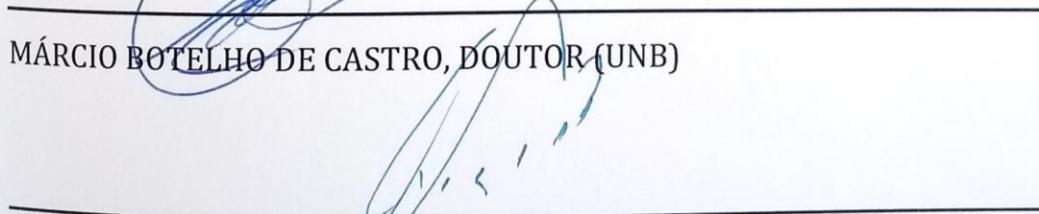
APROVADO POR:



EDUARDO MAURÍCIO MENDES DE LIMA, DOUTOR (UNB)



MÁRCIO BOTELHO DE CASTRO, DOUTOR (UNB)



MARCELO ISMAR SILVA SANTANA, DOUTOR (UNB)

BRASÍLIA/DF, MARÇO DE 2018

Dedico esse trabalho aos meus pacientes dermatológicos que são minha fonte de
inspiração para a busca de conhecimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me dar muito mais que preciso e mereço. E a Nossa Senhora, por estar sempre ao meu lado me dando forças para seguir nas dificuldades.

A meu marido Leandro, por acreditar em mim e me incentivar a ser melhor, nos estudos e como pessoa. Pelo companheirismo e pelo amor que demonstra constantemente.

Aos meus pais e irmãos, meus exemplos de trabalho e dedicação.

A Universidade de Brasília (UnB) e ao programa de pós-graduação em Saúde Animal (PPSA), pela oportunidade concedida para realização do mestrado.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao meu orientador pelo apoio e incentivo ao meu crescimento profissional.

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO	3
2. MATERIAIS E MÉTODOS	5
2.1 Animais de experimentação	5
2.2 Reagentes	5
2.3 Indução da dermatite atópica	5
2.4 Avaliação clínica das lesões cutâneas	7
2.5 Processamento e avaliação histológica das amostras	8
2.6 Análise estatística	8
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	9
4. CONCLUSÕES	14
5. REFERÊNCIAS	15

ABSTRACT

The atopic dermatitis (AD) is a common allergic disease in dogs that cause itching and skin inflammation. This study aimed to test a murine model comparable to the dogs disease, to enable future atopic disease treatment studies. Three groups of 3 mice C57Bl/6 received 0.1ml of *Dermatophagoides farinae* mite extract percutaneously in up to 4 cycles of induction and subsequently the skin was collected by biopsy for histopathological evaluation. Each cycles were two allergen applying that kept fixed onto the skin with a bandage, being thus group G2 (2 cycles), G3 (3 cycles) and G4 (4 cycles) and a control group Gc that did not received allergen, only bandage. No clinical symptoms such as erythema and excoriations were observed in any group. There was a significant statistical difference in group G4 regarding epidermal hyperplasia and mast cell numbers. The perivascular infiltrate was higher in all groups than the control group. Therefore, further studies should be performed to obtain a reproducible murine animal model of canine atopic dermatitis treatments.

INDEX TERMS: murine model, C57Bl6, canine atopic, allergic disease

RESUMO

A dermatite atópica (DA) é a forma mais comum de alergia que afeta cães causando prurido e inflamação na pele. O objetivo desse estudo foi avaliar um modelo murino similar à doença nos cães, para possibilitar futuros estudos de tratamento da atopia. Três grupos de 3 camundongos da linhagem C57Bl/6 receberam 0,1ml de extrato do ácaro *Dermatophagoides farinae* pela via percutânea em até 4 ciclos de indução e posteriormente a pele foi coletada por biópsia para avaliação histopatológica. Cada ciclo consistiu em duas aplicações de alérgeno que foi mantido aderido a pele com bandagem, sendo grupo G2 (2 ciclos), G3 (3 ciclos) e G4 (4 ciclos) e um grupo controle Gc que não recebeu alérgeno, somente bandagem. Não foram observadas alterações cutâneas clínica como eritema e escoriação em nenhum grupo. Houve diferença estatística significativa no grupo que recebeu 4 ciclos de indução de alérgenos quanto à hiperplasia de epiderme e quantidade de mastócitos. O infiltrado perivascular foi maior em todos os grupos em relação ao controle. Sobretudo deverão ser realizados mais estudos para obter um modelo animal murino reprodutível para avaliação dos tratamentos da dermatite atópica canina.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: modelo murino, C57Bl6, atopia canina, alergia.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

DA - Dermatite atópica

D. - *Dermatophagoides*

Derf. - *Dermatophagoides farinae*

IgE – Imunoglobulinas E

TIS - Three Item Severity - escore visual de três parâmetros

LISTA DE FIGURAS

PÁGINA

FIGURA 1. Fotografias ilustrativas da vista dorsal demonstrando preparo do modelo murino para aplicação do alérgeno. A: Região dorsal tricotomizada. B: Alérgeno ocluído com curativo adesivo. C: Bandagem de tecido ao redor da região torácica. 6

FIGURA 2. Desenho esquemático do protocolo de indução de lesões cutâneas com aplicação de dois ciclos do alérgeno *Dermatophagoides farinae* (Derf.) em camundongos C57Bl6 7

QUADRO 1. Somatória do escore de severidade 0-9 das lesões avaliadas ao final de todos os ciclos de cada grupo 9

QUADRO 2. Distribuição das lesões microscópicas nos diferentes grupos avaliados. 11

QUADRO 3. Número de mastócitos dos diferentes grupos comparados em relação ao grupo controle, considerando que a quantidade de mastócitos foi determinada por dez campos/lâmina, adotando ANOVA one-way com o emprego do Teste de Friedman, sendo $p \leq 0,05$ 12

FIGURA 3. Pele região dorsal de camundongo. Setas vermelhas indicam os mastócitos. **A.** Poucos mastócitos cutâneos em grupo controle. **B.** moderada quantidade de mastócitos em G2. **C.** aumento de mastócitos na derme de animal do grupo G4 13

INTRODUÇÃO

A dermatite atópica (DA) canina é uma dermatose comum definida como uma doença de cunho genético, que predispõe à inflamação e ao prurido cutâneo, mediado por imunoglobulinas da classe Ige que são dirigidas contra antígenos específicos na maior parte dos casos (Olivry et. al. 2010). A dermatite atópica está relacionada à perda da função de barreira tegumentar e sensibilização a alérgenos ambientais, alimentares e microbianos. É uma doença que deve ser classificada como multifatorial e que envolve resposta alérgica específica, infecções e defeitos da barreira cutânea, entre outros fatores predisponentes (Larson e Lucas 2016).

A doença pode acometer cães de todas as raças e idades que possuam predisposição genética a uma mutação que diminui a homogeneidade e quantidade de lipídios e queratinas da barreira epidérmica, ficando assim mais susceptível a entrada de agentes externos. Os sinais clínicos mais comuns da DA são o prurido e as lesões inflamatórias, sendo responsáveis pela menor qualidade de vida do animal com DA (Larson e Lucas 2016). A alteração histopatológica predominante é um infiltrado de eosinófilos e células mononucleares na derme superficial. A inflamação comumente é severa na derme e pode variar de focal a multifocal (Gross et al. 2005).

Baseados em estudos de reação positiva em testes intradérmicos contra os alérgenos de *Dermatophagoides (D.) farinae* e *D. pteronissynus*, os ácaros foram considerados os alérgenos mais relevantes na alergologia veterinária, variando de acordo com a prevalência geográfica (Mueller 2016, Farmaki et al. 2012). A maioria dos cães com dermatite atópica possui IgE contra esses alérgenos ambientais que podem ser detectados usando teste sorológicos IgE específica (Farmaki et al. 2012).

A padronização de modelos animais é extremamente importante para o estudo do tratamento da dermatite atópica canina, visto a dificuldade nos dias de hoje de utilização de cães em experimentação. Atualmente, modelos de sensibilização epicutânea induzidos por antígenos, como ovalbumina, oxazolona, ácaros da poeira (*Dermatophagoides farinae*) e trinitroclorobenzeno, têm sido amplamente utilizados em camundongos. Esses camundongos apresentam alterações cutâneas

semelhante dermatite atópica humana em relação a hiperplasia epidérmica, infiltrado epidérmicos e expressão de genes pró-inflamatórios. Embora esses modelos sejam considerados controláveis, reprodutíveis e de baixo custo, a estrutura cutânea e o mecanismo de cicatrização de feridas ainda são significativamente diferentes entre a pele murina humana (Jin et al. 2009, Zhao et al. 2017)

O camundongo foi escolhido como modelo para indução da dermatite atópica canina pela facilidade de obtenção e manuseio desses animais e foi utilizado o extrato de *D. farinae* devido sua importância na dermatite atópica canina. O objetivo deste estudo foi padronizar um modelo animal murino de dermatite atópica reprodutível para posterior avaliação de alternativas terapêuticas.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais de experimentação

Foram utilizados 12 camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 com 8 semanas de idade e peso corpóreo médio de 32 gramas. Os animais foram alojados individualmente em gaiolas de 30cm, sob fotoperíodo de 12 horas, com temperatura e umidade controladas, ruídos mínimos, alimentados com ração sólida comercial e água *ad libitum*.

Reagentes

O extrato de *Dermatophagoides farinae* foi adquirido da empresa Alcbr (São paulo - Brasil) diluído em solução salina fenolada na concentração 100µg/ml.

Indução da dermatite atópica

A metodologia utilizada foi baseada no modelo proposto por Kawakami (2015) para indução de dermatite atópica em camundongos. Os animais foram divididos em 4 grupos, sendo um controle, denominado Gc, que recebeu apenas o curativo com soro fisiológico em 2 ciclos. E outros três grupos (G2, G3, G4) que receberam o alérgeno em 2, 3, 4 ciclos respectivamente. Todas as manipulações nos animais foram realizadas com anestesia inalatória e os devidos cuidados tomados para minimizar o estresse conforme proposto por Kawakami et al. (2015).

Para indução da inflamação cutânea os camundongos foram tricotomizados na região cervico torácico (Figura 1A). Em seguida foi fixado e removido na pele 2cm de esparadrapo por 4 vezes para retirar o excesso de pelo, untuosidade e ocorrer disruptura do extrato córneo para penetração do alérgeno. Foi depositada na área dorsal uma gaze com 0,1ml da solução do alérgeno de *Dermatophagoides farinae* que foi totalmente ocluída com um curativo adesivo Tegaderm®(3M) (Figura 1B) e fixado com uma bandagem de tecido ao redor do tórax (Figura 1C) por 3 dias e repetido procedimento por mais 3 dias. Depois o animal foi mantido em descanso

sem curativo por 7 dias e repetidas outras duas aplicações com intervalo de 3 dias, completando assim dois ciclos após 19 dias. Portanto, o alérgeno foi aplicado nos dias 0,3,13 e 16 e o animal mantido sem curativo entre os dias 6 a 13 conforme esquematizado na Figura 2. Nos grupos G3 e G4 a metodologia foi repetida até se totalizar o número de repetições necessárias.

FIGURA 1. Fotografias ilustrativas da vista dorsal demonstrando preparo do modelo murino para aplicação do alérgeno. A: Região dorsal tricotomizada. B: Alérgeno ocluído com curativo adesivo. C: Bandagem de tecido ao redor da região torácica.

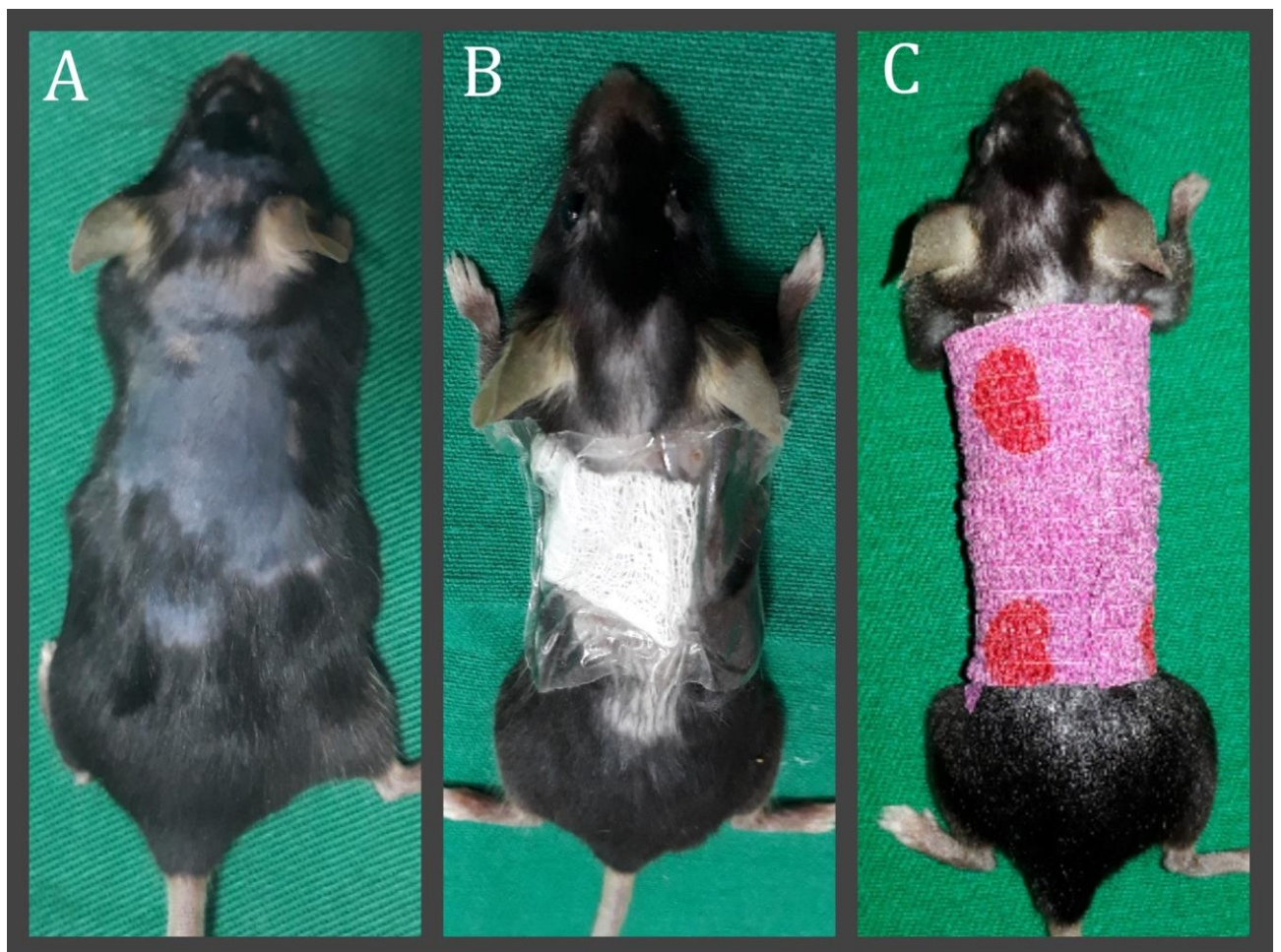
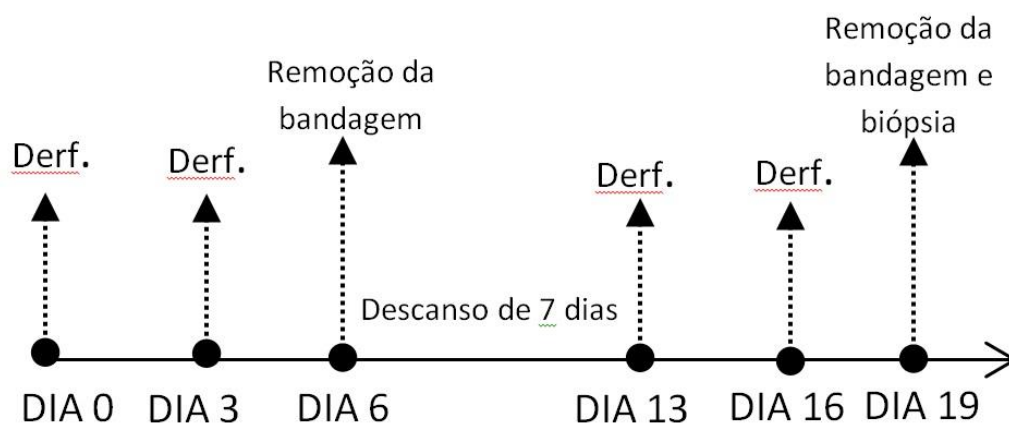


FIGURA 2. Desenho esquemático do protocolo de indução de lesões cutâneas com aplicação de dois ciclos do alérgeno *Dermatophagoides farinae* (Derf.) em camundongos C57Bl6.



Após o final de todos os ciclos a pele foi coletada para avaliação histopatológica por biópsia cutânea com punch de 8mm e realizado sutura com fio mononylon 2.0. No pós operatório os animais foram mantidos com curativo Tegaderm por 7 dias e então removido o fio. Todos os camundongos foram anestesiados com anestesia inalatória com isoflurano para manipulação como tricotomia, remoção da bandagem, troca do curativo e biópsia.

Avaliação clínica das lesões cutâneas

Para avaliar a gravidade da inflamação e a evolução da dermatite, um sistema de pontuação objetiva foi utilizado com base no escore visual de três parâmetros (TIS- Three Item Severity): eritema, escoriação/descamação e edema. Foi classificada em uma escala de severidade de 0-3, sendo 0 (equivalente a nenhum sintoma), 1 (equivalente a leve), 2 (equivalente a moderado) e 3 (equivalente a marcado). A somatória do total de lesões foi classificada em um escore de 0 a 9 para cada animal (Oranje et al. 2007). Os camundongos foram avaliados para obtenção do escore de lesões ao final dos ciclos de cada grupo e os dados mostram-se dispostos no quadro 1.

Processamento e avaliação histológica das amostras

Os fragmentos de pele foram coletados e fixados em solução aquosa a 10% de formaldeído e então incluídos em parafina, seccionados a 4 μ m de espessura e corados com Hematoxilina-Eosina (H&E). Isto para a determinação das alterações como hiperplasia da epiderme, presença de infiltrado perivascular, caracterização do tipo de infiltrado e ainda a presença ou não de edema dérmico superficial. Já para detecção e quantificação dos mastócitos lâminas foram coradas com azul de toluidine. O número de mastócitos foram contados na epiderme por um escore semi quantitativo com a soma de 10 campos de grande aumento microscópico (400x).

Análise estatística

Para obter a média e desvio padrão foi utilizada análise descritiva. O teste Kolmogorov-Smirnov foi realizado para avaliar a normalidade. A quantificação do número de mastócitos entre os grupos foi avaliada a partir do teste one-way Anova, com pós teste de Friedman de múltipla comparação. A análise foi realizada usando o software Sigma-Stat 3.5 em $p \leq 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A dermatite atópica (DA) canina é uma dermatose frequente nos cães, definida como uma doença cutânea inflamatória e pruriginosa com predisposição genética, cujas características clínicas estão associadas aos anticorpos IgE, dirigidos na maioria dos casos, contra alérgenos ambientais (Olivry et. al. 2010). Originalmente acreditava-se que os alérgenos adentravam no organismo através da inalação, porém, atualmente, acredita-se na entrada trans ou percutânea e, de forma menos importante, pela via oral. Assim a sensibilização inicial e a reexposição necessária para causar sintomas clínicos deve ocorrer através do contato do alérgeno com a pele (Larson e Lucas 2016).

Foi realizada modificação no protocolo proposto por Kawakami (2015), que sugeria utilização de dois alérgenos para indução da inflamação, para uso apenas do alérgeno *Dermatophagoides farinae*, visto que este é principal realacioando a dermatite atópica canina (Mueller, 2016). De acordo com o modelo de Kawakami (2015), são necessários 2 a 4 ciclos de aplicações de alérgenos para a obtenção de resposta inflamatória, o que pode variar de acordo com a linhagem e alérgenos (Kawakami et al. 2015). Foi observado que ocorreu maior inflamação cutânea após 4 ciclos de aplicação do alérgeno.

Os camundongos submetidos a maior exposição alergênica, G4, apresentaram prurido na região dorsal e orelhas. Contudo não houve sugnificante alteração clínica cutânea quanto a eritema, edema, descamação e escoriações em nenhum grupo (Quadro 1).

QUADRO 1. Somatória do escore de severidade 0-9 das lesões avaliadas ao final de todos os ciclos de cada grupo.

Grupos	Eritema	Escoriação	Edema	Prurido	Escore
Gc	0	0	0	0	0
G2	0	0	0	0	0
G3	0	0	0	0	0
G4	1	1	0	3	5

Yamamoto et. al (2007) induziram lesões cutâneas em camundongos que apresentaram sinais clínicos de escoriações e prurido. Sobretudo, nestes animais foi realizada alteração da barreira cutânea antes da aplicação do alérgeno na região dorsal. Sendo assim, essa diferença metodológica pode justificar e explicar a não obtenção de sinais clínicos no presente trabalho. Mas, esta metodologia adotada não invalidou e nem inibiu a ocorrência de achados que comprovem a ação do alérgeno na pele dos animais, pois foi observado um comprometimento inflamatório tecidual. Revelando que apesar da ausência de acurácia da avaliação clínica, parte relevante da afecção foi evidenciada nos camundongos induzidos.

Estudos anteriores demonstraram que o extrato de *D. fariane* no veículo suspensão induziu lesões cutâneas em camundongos similares a dermatite atópica, porém o início do quadro foi tardio (Matsuoka et. al. 2003). Yamamoto et. al (2007) observou uma rápida e intensa modificação do escore de lesões e alterações histológicas com a aplicação de *D. fariane* porém sobre a forma de pomada. A hipótese de que o alérgenos na forma de pomada permanece por um período maior em contato com a pele do camundongo pode ser considerada a razão pelo qual não houve surgimento de lesões clínicas quando aplicado na forma de suspensão neste experimento.

Na literatura não há descrito um modelo animal que mimetize completamente as manifestações clínicas das doenças alérgicas cutâneas, os modelos fornecem uma expressão fenotípica semelhante, porém não são espontâneas e crônicas (Takeda 2009).

Jin et al. (2009) que descreveram que camundongos Nc/Nga desenvolveram espontaneamente lesões cutâneas semelhantes a dermatite atópica humana em condições convencionais. As lesões possuíam um acúmulo marcado de mastócitos e eosinófilos, com hiperqueratose epitelial, hiperplasia e espongiose acompanhada de aumento da resposta Th2 e alterações de barreira cutânea. Tanaka et al (2012) demonstraram que modelos animais sensibilizados pela via epicutânea apresentaram características histopatológicas de hiperplasia da epiderme, espongiose e infiltrado de CD4+ e CD8+. Tais achados corroboram com os resultados do Quadro 2, que descreve as lesões histopatológicas nos diferentes grupos. Houve significativa hiperplasia na epiderme no grupo G4 que recebeu maior

quantidade de induções de alérgenos. Células inflamatórias, incluindo monócitos e eosinófilos, foram observadas nos grupos G2, G3 e G4. Os grupos não apresentaram edema dérmico superficial.

QUADRO 2. Distribuição das lesões microscópicas nos diferentes grupos avaliados.

	Hiperplasia epiderme	Infiltrado perivascular	Tipo de infiltrado	Edema dérmico superficial
Gca	-	-	-	-
Gcb	-	-	-	-
G2a	-	+	monócito	-
G2b	-	+	monócito + eosinófilo	-
G2c	-	+	monócito +	-
G3a	-	-	monócito +	-
G3b	-	+	monócito	-
G3c	-	+	monócito	-
G4a	+	+	monócito +	-
G4b	+	++	monócito +	-
G4c	+	+	monócito +	-

+ leve / ++ moderado / - não observado. Letras a, b e c representam os diferentes animais de cada grupo.

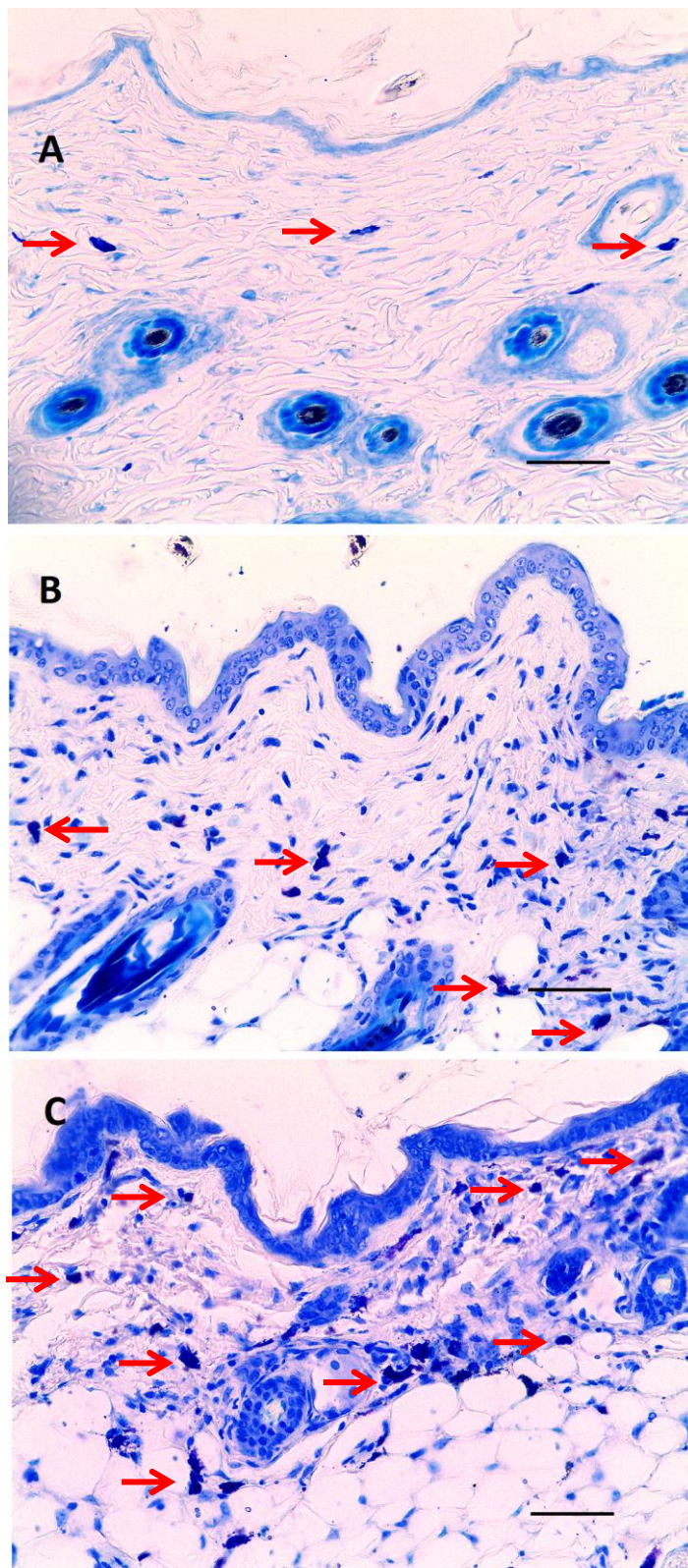
A resposta inflamatória cutânea após o estímulo alérgico foi evidenciada pelo aumento do número de mastócitos, corados pelo azul de toluidina (Figura 3). Um aumento significativo no número dessas células em relação ao grupo controle foi demonstrado nos grupos G2 e G4 (Quadro 3). Olivry et al. (2001) avaliaram o infiltrado inflamatório cutâneo de cães atópicos através de injeções intradérmicas de *D. Farinae* e obtiveram não apenas reação de urticária imediata, mas também uma inflamação visível e microscópica de longa duração, com reação de fase tardia após exposição antigênica. Observaram que o número de mastócitos na pele de cães normais variou em torno de 12-15 células/mm² e em cães atópicos este valor variou 19-25 células/mm² após o estímulo promovido pelo alérgeno *D. farinae*.

QUADRO 3. Número de mastócitos dos diferentes grupos comparados em relação ao grupo controle, considerando que a quantidade de mastócitos foi determinada por dez campos/lâmina, adotando ANOVA one-way com o emprego do Teste de Friedman, sendo $p \leq 0,05$.

Grupos	Número de mastócitos
Gc	$26 \pm 1,04^{ab}$
G2	$84,67 \pm 5,99^a$
G3	$48 \pm 11,94$
G4	$137,3 \pm 15,29^b$

Letras iguais em linhas diferentes representam diferença estatística.

FIGURA 3. Pele região dorsal de camundongo. Setas vermelhas indicam os mastócitos. **A.** Poucos mastócitos cutâneos em grupo controle. **B.** moderada quantidade de mastócitos em G2. **C.** aumento de mastócitos na derme de animal do grupo G4. (azul de toluidina, Barra=50µm).



CONCLUSÕES

Em conclusão, propomos a utilização do camundongo C57Bl6 como modelo animal para estudo da dermatite atópica canina através de repetidas aplicações de extratos de *Derf* pela via percutânea. As alterações cutâneas histológicas foram similares as ocorridas em cães com dermatite atópica, portanto, o modelo é útil não apenas para estudo da patogênese da doença mas também para a avaliação de novos agentes terapêuticos.

REFERÊNCIAS

Farmaki R., Saridomichelakis M.N., Leontides L., Papazahariadou M.G., Gioulekas D. & Koutinas A.F. Dust mite species in the households of mite-sensitive dogs with atopic dermatitis. *Vet. Dermatol.* 2012 - 23:222- e45.

Gross T.L., Ihrke P.J., Walder E.J. & Affolter V.K. *Skin diseases of the dog and cat. Clinical and histopathologic diagnosis.* 2nd ed. Blackwell, Oxford. 2005 - 932p

Jin H, He R, Oyoshi M, Geha RS: Animal models of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2009,129:31-40

Kawakami Y, Kawakami T.; A Mouse Model of Atopic Dermatitis, p. 497-502 In: Hughes M.R., McNagny K.M. (Eds), *Mast Cells: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, 2015. vol. 1220,. Springer Science. New York.

Larson, C.E.; Lucas, R. *Tratado de medicina externa: dermatologia veterinária.* São Caetano do Sul, SP: Interbook, 2016. 513p

Matsuoka H, Maki N, Yoshida S et al. A mouse model of the atopic eczema_dermatitis syndrome by repeated application of a crude extract of house-dust mite *Dermatophagoides farinae*. *Allergy* 2003;58:139-145.

Mueller RS, Janda J, Jensen-Jarolim E, Rhyner C, Marti E. Allergens in veterinary medicine. *Allergy* 2016; 71: 27–35

Olivry, T.; Dunston, S.M.; Murphy, K.M.; Moore, P.F. Characterization of inflammatory infiltrate during IgE-mediated late phase reactions in the skin of normal and atopic dogs. *Veterinary Dermatology* 2001; 12, 49-58.

Olivry, T.; Deboer D.J.; Favrot, C.; Jackson, H.A.; Mueller, R.S.; Nuttall, T.; Prélaud, P. International task force on canine atopic dermatitis. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the international taks force on canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology* 2010; 21: 233-248.

Oranje,A.P.; Glazenburg, E.J.; Wolkerstorfer, A.; de Waard-van der Spek, F.B.; Practical issues on interpretation of scoring atopic dermatitis: the SCORAD index, objective SCORAD and the three-item severity score. *Br J Dermatol.* 2007 157:645–648

Takeda, K., Gelfand, E.W.: Mouse models of allergic diseases. *Current Opinion in Immunology*. 2009 - Vol 21, 660-665

Tanaka, A., Amagai, Y., Oida, K., Matsuda, H., Recent findings in mouse model for human atopic dermatitis. *Exp. Anim.* 2012 61(2), 77–84

Zhao, J.; Jia, S.; Xie, P.; Arenas, G.A.; Galiano, R.D.; Hong, S.J.; Mustoe, T.A. Topical application of *Dermatophagoides farinae* or Oxazolone induces symptoms of atopic dermatitis in the rabbit ear. *Arc Dermatol Res.* 2017

Yamamoto, M., Haruna T., Yasui K., Takahashi H., Iduhara M., Takaki S., Deguchi M., Arimura A.; A Novel Atopic Dermatitis Model Induced by Topical Application with *Dermatophagoides Farinae* Extract in NC/Nga Mice. *Allergology International* 2007 - Vol 56, 2.