

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

CAMILLA OLIVEIRA ROSA ALCALÁ

**AVALIAÇÃO DO TESTE DE PUNTURA, DIETA RESTRITIVA E DESAFIO
DIETÉTICO NO DIAGNÓSTICO DA ALERGIA ALIMENTAR EM CÃES COM
DERMATITE ATÓPICA**

(Evaluation of puncture test, restraining diet and dietary challenge in the diagnosis
of food allergy in dogs with atopic dermatitis)

CURITIBA

2019

ii

CAMILLA OLIVEIRA ROSA ALCALÁ

**AVALIAÇÃO DO TESTE DE PUNTURA, DIETA RESTRITIVA E DESAFIO
DIETÉTICO NO DIAGNÓSTICO DA ALERGIA ALIMENTAR EM CÃES COM
DERMATITE ATÓPICA**

(Evaluation of puncture test, restraining diet and dietary challenge in the diagnosis
of food allergy in dogs with atopic dermatitis)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador(a): Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias

CURITIBA

2019

iii

TERMO DE APROVAÇÃO



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Câmpus Curitiba

PUCPR
GRUPO MARISTA

ATA Nº 0137 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado EM CIÊNCIA ANIMAL DA ALUNA CAMILLA OLIVEIRA ROSA ALCALÁ

Aos trinta dias do mês de abril do ano de dois mil e dezenove, às 9h30, realizou-se na sala de Pós-Graduação 03, 2º andar, Bloco Amarelo, da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada no Campus de Curitiba, Rua Imaculada Conceição, nº 1155, Prado Velho – Curitiba – PR, a sessão pública de defesa de dissertação da mestranda Camilla Oliveira Rosa Alcalá, intitulada: “**AVALIAÇÃO DO TESTE DE PUNTURA NO DIAGNÓSTICO DA ALERGIA ALIMENTAR EM CÃES**”. A mestranda concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Marconi Rodrigues de Farias (PUCPR), auxiliado pelos Professores Doutores Herberto José Chong Neto (UFPR) e Vânia Oliveira de Carvalho (UFPR). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada

APROVADA
Prof. Dr. Marconi Rodrigues de Farias (Presidente)

Assinatura _____
Prof. Dr. Herberto José Chong Neto (UFPR)

Assinatura _____
Profa. Dra. Vânia Oliveira de Carvalho (UFPR)

Assinatura *Vânia Oliveira de Carvalho*

Proclamado o resultado, o Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Caroline Nocera Bertton, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

Curitiba, 30 de abril de 2019.

Caroline Nocera Bertton

Caroline Nocera Bertton

Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Renata Ernlund Freitas de Macedo

Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal

Rua Imaculada Conceição, 1155 - Prado Velho - CEP 80215-901 Curitiba Paraná Brasil
Tel.: (41) 3271 2615 ppgca@pucpr.br Site: www.pucpr.br/ppgca

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIA	vii
AGRADECIMENTOS	viii
RESUMO GERAL	x
ABSTRACT	xi
CAPÍTULO 1	5
DEFINIÇÕES	5
EPIDEMIOLOGIA	5
ALÉRGENOS ALIMENTARES (TROFOALÉRGENOS)	6
<i>Proteína vegetal</i>	7
<i>Proteína animal</i>	7
<i>Carboidratos</i>	8
IMUNOPATOGÊNESE	9
<i>Tolerância oral</i>	10
<i>Hipersensibilidade do tipo I</i>	11
<i>Hipersensibilidade do tipo III e IV</i>	13
ASPECTOS CLÍNICOS	14
DERMATITE ATÓPICA LATO SENSU	16
DIAGNÓSTICO DA ALERGIA ALIMENTAR	19
<i>Dieta de eliminação</i>	19
<i>Dieta de eliminação caseira</i>	20
<i>Dietas com restrição antigênica hidrolisada (hipoalergênicas)</i>	21
<i>Dietas com restrição proteica ultrahidrolisadas (analergênicas)</i>	23
TESTE ALÉRGICO NO DIAGNÓSTICO DA ALERGIA ALIMENTAR EM CÃES	23
<i>Testes sorológicos IgE e IgG específicos para alimentos</i>	24
<i>Teste de contato para alimentos (Patch Test)</i>	24
<i>Teste de proliferação de linfócitos</i>	25
TESTE DE PUNTURA PARA ALIMENTOS	25
<i>Técnica de aplicação e interpretação</i>	26
<i>Teste de puntura para alimentos na medicina veterinária</i>	27
CAPÍTULO 2- Artigo científico a ser submetido para publicação na revista científica de publicação periódica Veterinary Dermatology	29
CAPÍTULO 3- CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS	50

ANEXO A 56
ANEXO B 61
ANEXO C 62
ANEXO D 63

DEDICATÓRIA

Dedico mais esta conquista a Deus, aos meus pais, familiares, amigos e animais que sempre estiveram presentes em todos os momentos dessa minha jornada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente inicio meus agradecimentos a Deus e aos meus pais que sempre investiram na minha educação, sem esse incentivo chegar até aqui não seria possível.

Agradeço ao meu namorado e colega de profissão Murilo, que sempre me apoiou a seguir meu sonho independente da distância que isso iria causar entre nós.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marconi, que me deu de presente este projeto e que me ensinou muito mais sobre dermatologia do que eu poderia imaginar, meu muito obrigada pela oportunidade, confiança e principalmente pela paciência durante esses dois anos do estudo.

Obrigada a Natália Borin, que sem ela não seria possível à execução dos testes, você foi essencial para que o “n” de animais exigidos fosse conseguido e também a Milla Piazza, as quais tive o prazer de co-orientar nos projetos de iniciação científica, permitindo um crescimento profissional para minha futura carreira acadêmica.

Agradeço a Clínica Veterinária Escola PUCPR, a todos os funcionários, especialmente as recepcionistas que pacientemente me ajudavam a organizar a agenda e os pacientes do teste alérgico para que nenhum animal ficasse sem atendimento.

Meu muito obrigado a todos os tutores e animais que participaram do estudo, os quais levaram a risca as recomendações e dietas, e não faltaram a nenhum retorno, obrigada pelo comprometimento e pela importância que deram ao meu estudo.

Obrigada aos meus colegas de pós-graduação Juliana Possebom, Lucas Ludwig e Larissa Rüncos por dividirem comigo as preocupações, artigos, relatos e apresentações durante todo esse período de mestrado.

Um agradecimento a CAPES, pois sem o incentivo da bolsa, esse sonho não poderia estar se concretizando.

E por último, um obrigada a todos que de alguma forma me ajudaram e fizeram parte dessa caminhada.

FORMATO DA DISSERTAÇÃO/ TESE

A presente dissertação é composta por capítulos:

- O capítulo 1 apresenta uma introdução e contextualização do tema com revisão de literatura e os objetivos do estudo.
- O capítulo 2 trata-se de artigo científico completo, contendo referências, e formatado nas normas da revista para o qual será submetido.
- O capítulo 3 finaliza esta dissertação conclusões gerais e considerações finais deste trabalho e sugestões para estudos futuros.

As referências do capítulo 1 encontram-se ao final da dissertação.

RESUMO GERAL

A alergia alimentar é uma resposta de hipersensibilidade imediata a um alérgeno alimentar e corresponde de 10-20% das doenças alérgicas tegumentares de cães, e em 30% de cães com dermatite atópica. O teste de puntura tem sido utilizado na orientação de exclusões dietéticas em humanos com suspeição de alergia alimentar, porém não há estudos críticos deste teste em cães. O objetivo deste estudo foi avaliar o teste de puntura no diagnóstico da sensibilização a alérgenos alimentares em cães com prurido crônico de origem alérgica. Para realização do teste de puntura foram utilizados extratos alergênicos de alérgenos ambientais e de proteína bovina, frango, ovo, suíno, pescado, leite, soja e trigo na concentração de 1:20 p/v com 50% de glicerol e 0.45% de fenol. Inicialmente, o teste foi realizado em 10 cães hígidos (grupo controle) para avaliação do seu potencial irritativo e em seguida em 34 cães com prurido crônico, de intenso à grave, primário e perene, principalmente nas regiões interdigitais, em pavilhões auriculares e condutos, axila e região abdominal. O teste foi considerado positivo quando produzia pápulas superiores a 3 mm em relação ao controle negativo. Após o teste de puntura, os cães positivos foram submetidos à dieta caseira restritiva, baseada em seu resultado, por 60 dias, sendo avaliados nos dias 0, 30 e 60 e estabelecido seus escores lesionais pela escala CADESI-4, e de prurido pelo pVAS. No grupo controle, apenas dois cães reagiram a um único alérgeno alimentar. Dos 34 cães submetidos ao teste de puntura para alérgenos ambientais e alimentares, 4 (12%) reagiram a alérgenos ambientais, 4 (12%) a alérgenos alimentares e 26 (76%) cães a ambos os alérgenos, nove foram excluídos e 25 permaneceram no estudo. Nos 25 cães houve uma melhora significativa média da pVAS ($p=0,0001$) e CADESI-4 ($p=0,0001$) entre os dias 0 e 30. A média destas variáveis não se alterou de forma significativa entre os dias 30 e 60, porém, após a reexposição ao alérgeno alimentar positivo no teste, houve piora significativa nos valores médios de pVAS ($p=0,0001$) e CADESI-4 ($p=0,039$), sendo os alérgenos de carne bovina, seguido de trigo e frango os que causaram as maiores reações. Dos cães submetidos a dieta restritiva, 21(84%) tiveram melhora do prurido acima de 50% e um agravamento no quadro prurítico com a exposição ao alérgeno positivo no teste de puntura. Durante o período da dieta restritiva foi possível a suspensão da medicação para controle do prurido em 11 (46%) dos cães e em 13 (54%) houve melhora na resposta ao maleato de oclacitinib. O presente estudo permitiu concluir que o teste de puntura com extratos de proteínas alimentares é um teste rápido, viável e seus resultados podem servir de guia para o estabelecimento de protocolos de dieta restritiva em cães com suspeição de alergia alimentar e ou dermatite atópica *latu sensu*, minimizando de forma significativa sua medicação.

Palavras-chave: alergia, teste alérgico, alérgenos alimentares, dermatite atópica.

ABSTRACT

Food allergy is an immediate hypersensitivity response to a food allergen and accounts for 10-20% of tegumentary and dog allergic diseases and in 30% of dogs with atopic dermatitis. The puncture test has been used in guiding dietary exclusions in humans with suspected food allergy, however, there are no critical studies of this test in dogs. The objective of this study was to evaluate the puncture test in the diagnosis of sensitization to food allergens in dogs with chronic pruritus of allergic origin. In order to perform the puncture test, allergen extracts of environmental allergens and of bovine protein, chicken, egg, swine, fish, milk, soy and wheat were used at a concentration of 1:20 w/v concentration with 50% glycerol and 0.45% of phenol. Initially, the test was performed in 10 healthy dogs (control group) to assess their irritative potential and then in 34 dogs with severe, primary and perennial chronic pruritus, mainly in interdigital regions, atrial and conductive areas, armpit and abdominal region. The test was considered positive when it produced papules greater than 3mm in relation to the negative control. After the puncture test, the dogs were submitted to the restrictive home diet, based on their results, for 60 days, being evaluated on days 0, 30 and 60 and their lesion scores were established by the CADESI-4 scale, and pruritus by pVAS . In the control group, two dogs reacted to a single food allergen. Of the 34 dogs submitted to the puncture test for environmental and food allergens, 4 (12%) reacted to environmental allergens, 4 (12%) to food allergens and 26 (76%) dogs to both allergens, nine were excluded and 25 remained in the study. In the 25 dogs there was a significant mean improvement of pVAS ($p=0.0001$) and CADESI-4 ($p=0.0001$) between days 0 and 30. The mean of these variables did not change significantly between days ($p=0.0001$) and CADESI-4 ($p=0.039$), with the bovine meat allergens being the most frequent in the present study, followed by wheat and chicken which caused the greatest reactions. Of the dogs submitted to a restrictive diet, 21 (84%) had improvement of the pruritus above 50% and a worsening in the pruritic condition with exposure to the positive allergen in the puncture test. During the period of the restrictive diet it was possible to suspend the medication to control pruritus in 11 (46%) of dogs and in 13 (54%) there was improvement in the response to oclacitinib maleate. The present study allowed to conclude that the puncture test with food protein extracts is a fast, viable test and its results can serve as a guide for the establishment of restrictive diet protocols in dogs with suspected food allergy and / or *latu sensu* atopic dermatitis, significantly minimizing their medication.

Keywords: allergy, allergic test, food allergens, atopic dermatitis.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Células apresentadoras de antígenos
CADESI	Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index
DA	Dermatite atópica
DAC	Dermatite atópica canina
HEP	<i>Histamine equivalent prick</i>
ICADA	International Committee on Allergic Diseases of Animals
The	Linfócito Thelper
IL	Interleucina
LPT	Teste de Proliferação de Linfócito
p/v	Parte por volume
pVAS	Escala Visual de Prurido
PRA	Pós reexposição Alimentar
RAA	Reação Adversa ao Alimento

LISTA DE QUADROS DA REVISÃO DA LITERATURA

	Página
Quadro 1 – Principais alérgenos proteicos alimentares e os alérgenos aos quais podem fazer reações cruzadas.....	9
Quadro 2 – Sinais clínicos comparados entre cães com alergia alimentar e cães com dermatite atópica <i>latu sensu</i>	18
Quadro 3 - Principais vantagens e desvantagens entre a dieta caseira e ração comercial hidrolisada.....	22

LISTA DE TABELAS E QUADROS DO ARTIGO

Tabela 1 - Aspectos epidemiológicos dos cães do grupo controle e do grupo 1....	38
--	----

LISTA DE FIGURAS DA REVISÃO DE LITERATURA

Página

Figura 1 - Imagem esquematizando a reação de Hipersensibilidade tipo I.	13
Figura 2: A- Cão, bulldog francês, fêmea, 2 anos com lesão erosiva e alopecica em região facial secundária a autotraumatismo. B- Cão, Pitbull, fêmea, 3 anos com otite externa com pavilhão auricular apresentando lesões escoriativas por autotraumatismo. C – Cão, sem raça definida, fêmea, 1,5 anos com lesão localizada, alopecica com eritema em região peribucal devido a alergia alimentar. D- Cão, sem raça definida, fêmea, 7 anos com blefarite secundária a alergia alimentar, região periocular com alopecia, lignificação e hiperpigmentação evidenciando cronicidade.....	15
Figura 3 - Introdução epicutânea de alérgeno utilizando puntor de plástico Duotip® em um paciente canino.....	27

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Página

- Figura 1 – A:** extratos alergênicos de leite, ovo, bovino, frango, suíno, trigo, soja e pescado 1:20 p/v de concentração com 50% de glicerol e 0.45% de fenol utilizados nos testes de puntura em cães dos grupos 1 e 2. **B:** Extratos alérgicos armazenados individualmente em uma bandeja de alérgenos..... 34
- Figura 2 – A:** Marcação da pele com caneta dermatográfica. **B:** Puntura com puntor DUOTIP Test II ® em um ângulo de 45° contra a superfície da pele. **C:** Formação das reações papulares após 15 minutos da puntura. **D:** Dermalmarcação das reações papulares..... 35
- Figura 3 -** Proporção de animais com dermatite alérgica reagentes ao do teste de puntura para alérgenos ambientais alimentares isoladamente, bem como, para alérgenos alimentares e ambientais em concomitância, apresentando-se respectivos intervalos de confiança de 95% 39
- Figura 4 –** Percentual de cada alérgeno alimentar aos quais os cães apresentaram reação positiva no teste de puntura..... 40
- Figura 5A -** Distribuição linear média do escore CADESI entre os tempos pre-exclusão alimentar (dia 0), 30 e 60 dias de exclusão alimentar, e 7 dias pós reintrodução alimentar (PRA) 41
- Figura 5B -** Distribuição linear média do escore pVAS entre os tempos pre-exclusão alimentar (dia 0), 30 e 60 dias de exclusão alimentar, e 7 dias pós reintrodução alimentar (PRA). 42
- Figura 6.** Distribuição linear média da porcentagem de animais em tratamento medicamento entre os tempos pré-exclusão alimentar (dia 0), 30 e 60 dias de exclusão alimentar. 43

CAPÍTULO 1

1. ALERGIA ALIMENTAR – REVISÃO DE LITERATURA

DEFINIÇÕES

As reações adversas ao alimento correspondem aproximadamente de 10-20% das doenças alérgicas de pele relatadas em cães (Rakshanda *et al.*, 2017, Roudebush *et al.*, 2010) e se subdividem em intolerância alimentar, alergia alimentar e reações inflamatórias a alimentos.

A intolerância alimentar é uma reação indireta sem envolvimento do sistema imunológico, geralmente de origens metabólicas, farmacológicas, tóxicas ou idiossincráticas (Mueller e Jackson, 2003).

Podemos citar como intolerância alimentar a intolerância à lactose, a qual se enquadra em uma reação metabólica que pode acarretar em uma má-digestão, má-absorção e diarreia osmótica. Já as reações farmacológicas podem ser causadas pela histamina encontrada em peixes, como o atum e a mais comum em cães, causada pela xantina metálica presente no chocolate (Deng *et al.*, 2015, Bates *et al.*, 2015, Verlinden *et al.*, 2006).

A alergia alimentar pode ser definida como uma resposta de hipersensibilidade do tipo I a um alérgeno alimentar ingerido, conforme descrito pelo Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (2011). Alimentos como carne de diferentes espécies e proteínas vegetais estão comumente envolvidos na alergia alimentar em cães.

EPIDEMIOLOGIA

Os primeiros casos de alergia alimentar em cães foram descritos em 1934 por Pomerey, onde os animais apresentaram alergia ao salmão.

A idade do aparecimento dos sintomas associados à alergia alimentar pode variar de poucos meses de vida a mais de dez anos de idade nos cães. Um estudo de Picco *et al.* (2008) com cães alérgicos demonstrou que animais com menos de um ano de idade eram mais propensos a reagir a alimentos do que aos alérgenos ambientais. Embora nenhuma predileção por gênero tem sido observada, algumas raças como Boxer, Pastor Alemão, West Highland White Terrier, Pug e Labrador parecem ser geneticamente predispostos a apresentarem alergia alimentar. Cães

com predisposição genética a dermatite atópica tem maior chance de desenvolver uma reação adversa a alimento, sendo que as raças mais frequentes acometidas são Dachshund, Poodle Toy, Bulldog Francês e Shih Tzu (Gershwin 2015, Suto *et al.*, 2015).

ALÉRGENOS ALIMENTARES (TROFOALÉRGENOS)

Uma grande variedade de alimentos e ingredientes alimentares foram relatados como desencadeadores de alergia alimentar em cães (Pali-Schöll *et al.*, 2017, Suto *et al.*, 2015). A antigenicidade de uma proteína é determinada por sua estrutura primária (sequência de aminoácidos), sua estrutura secundária (conformação da cadeia de aminoácidos) e estrutura terciária (redobramento adicional da conformação proteica). Proteínas potencialmente alergênicas devem ser grandes o suficiente para que moléculas de IgE se liguem a sua superfície e provoquem desgranulação de mastócitos e conseqüente liberação de mediadores inflamatórios (Cave, 2006).

Atualmente, as rações comerciais disponíveis contêm em sua composição carne de aves ou mamíferos como sua principal fonte protéica. Os principais alérgenos alimentares são proteínas com um peso molecular entre 10 a 70 kDa, as quais são resistentes ao calor, ácidos e proteases. Já foram reconhecidos em cães reações IgE específicas em cães a proteínas de cordeiro, do leite e da carne bovina que possuíam massas moleculares entre 51 e 58 kDa. A menor proteína que provocou uma resposta de IgE continha uma massa molecular de 27 kDa (Pali-Schöll *et al.*, 2017, Suto *et al.*, 2015). Na maioria dos casos, o prurido é causado por um ou dois alérgenos e alguns estudos relataram que um a dois terços dos cães são alérgicos a mais de um alimento (Rakshanda *et al.*, 2017, Suto *et al.*, 2015, Verlinden *et al.*, 2006).

Um levantamento dos principais alimentos relatados como causa de reação alimentar nos últimos 45 anos na medicina veterinária, o qual continha relatórios de diversos países, concluiu que os alérgenos alimentares não apresentam muita variação entre áreas geográficas (Kang *et al.* 2014). Neste estudo, os alimentos com maior taxa de reação adversa foram carne bovina, produtos lácteos, frango e trigo e, de forma intermediária, houve reações alérgicas ao ovo de galinha, soja, carne de cordeiro, porco, peixe e milho. Casos envolvendo arroz e pato foram raros

e a carne de coelho, chocolate, feijão e tomate foram relatados como alérgenos alimentares apenas em casos isolados (Kang *et al.* 2014, Roudebush *et al.*, 2013).

Protéina vegetal

Em um estudo realizado por Suto *et al.* (2015), a reação a alimentos foi determinada por teste de proliferação linfocítica a 18 tipos de alérgenos alimentares, sendo que as reações às proteínas de soja foram as mais frequentes em cães alérgicos.

Ainda não está claro o porquê de a soja causar aumento da reação inflamatória mediada por linfócitos, porém já foi comprovado que a soja tem reação cruzada com pólenes em humanos, como polinose de bétula (Suto *et al.*, 2015). Também tem sido observado que a sensibilização à proteína de soja pode ocorrer por via percutânea após a utilização de cosméticos à base de soja.

A identificação dos principais alérgenos da soja tem se mostrado difícil, embora a melhor evidência sugira que as principais proteínas de armazenamento de sementes como a glicinina e conglucina são os alérgenos de soja mais importantes (Taylor *et al.*, 2015, Battais *et al.*, 2003).

No trigo, proteínas como albumina, globulinas e prolamina são os principais alérgenos desencadeadores de resposta alérgica alimentar envolvendo IgE específica em humanos (Battais *et al.*, 2003).

Proteína animal

A carne bovina entre os mamíferos e a carne de frango entre as aves contém as principais proteínas envolvidas nas reações alérgicas em humanos. Os principais componentes envolvidos são as imunoglobulinas e a albumina séricas, mas as proteínas musculares (actina, miosina e tropomiosina) também foram reconhecidas como trofoalérgenos, sendo a albumina sérica bovina e a actina os principais alérgenos envolvidas na ligação com a IgE circulante (Restani *et al.*, 2009, Pali-Schöll *et al.*, 2017).

A imunoglobulina IgG é um importante alérgeno da carne bovina, sendo fonte de reatividade entre esta carne, leite de vaca e cordeiro. Assim, cães alérgicos ao leite de vaca podem apresentar uma reação cruzada com carne bovina e

provavelmente com carne de cordeiro devido a alta homologia com imunoglobulinas ovinas. A fosfoglutamase é um importante alérgeno envolvido na reação alérgica tanto à carne de cordeiro quanto à carne bovina, produzindo cadeias pesadas de IgE (Pali-Schöll *et al*, 2017, Martin, *et al.*, 2004)

A albumina de soro suíno e a albumina de soro de frango já foram identificadas em humanos alérgicos através do aumento de IgE específica, e as mesmas podem apresentar reação cruzada entre si (Hilger *et al.*, 2010).

Em humanos, recentemente, foi comprovado que peixe e carne de frango são alimentos que podem reagir de forma cruzada, sendo a parvalbumina, enolases e aldolases os principais alérgenos envolvidos nessa reação (Pali-Schöll *et al*, 2017, Kuehn, 2016).

Aproximadamente 7% dos cães com prurido crônico desenvolvem IgE específica a alérgenos de ovo de galinha. A clara de ovo é composta de ovomucóide, ovalbumina, ovotransferrina e lisozima, sendo a ovomucóide e ovalbumina as principais proteínas envolvidas na alergia ao ovo em cães. Sabe-se que os alérgenos presentes na clara do ovo apresentam uma reação cruzada à lactoferrina e a alfa-lactalbumina presente no leite de vaca, sendo assim, animais com reação alérgica a ovo podem apresentar reação alérgica ao leite.

As proteínas do leite α -lactalbumina, β -lactoglobulina e caseína estão envolvidas na indução da alergia ao leite em crianças e em cães, a lactoferrina, β -lactoglobulina e α -lactalbumina são as mais envolvidas (Shimura *et al.*, 2016, Burks *et al.*, 2011, Martin *et al.*, 2004).

Carboidratos

Embora a maioria dos alérgenos alimentares conhecidos sejam proteínas ou glicoproteínas, há evidências de que moléculas não proteicas podem atuar como alérgenos alimentares e certos carboidratos livres de proteínas, como os polissacarídeos e dextrano, têm demonstrado estarem envolvidos em alergia alimentar em humanos. O papel dos antígenos de carboidratos ainda é controverso e mal definido, não tendo nenhum estudo sobre o seu envolvimento na alergia alimentar em cães. (Cave, 2006, Martin, 2004)

Nos casos em que um carboidrato na dieta é suspeito de ser a fonte alergênica, é mais provável que este seja um hapteno, e que haja um alérgeno proteico dentro da fonte de carboidratos, pelo qual realmente haja uma verdadeira hipersensibilidade. (Martin, 2004)

Moléculas de prolamina, uma proteína presente no milho, de peso molecular de 20 a 23 kDa, já foram detectadas em fórmulas de caseína hidrolisada quando o amido de milho foi utilizado como uma fonte de carboidrato. O mesmo já ocorreu em óleos vegetais, onde proteínas lipofílicas alergênicas foram encontradas (Cave, 2006, Martin, 2004).

As principais reações cruzadas entre alimentos e entre alimentos e pólenes estão demonstradas no quadro 1.

Quadro 1 – Principais alérgenos proteicos alimentares e os alérgenos aos quais podem fazer reações cruzadas.

ALIMENTO	REAÇÃO CRUZADA	COMPONENTES
Soja	Polén de Bétula, Leite	Glicina e Conglicina
Trigo	Leite, Milho, Arroz	Albumina, Globulina e Prolamina
Ovo	Leite, Frango	Ovomucóide e Ovalbumina
Leite	Bovino e Cordeiro	Lactoferrina, α -lactalbumina e β -lactoglobulina
Bovino	Leite e Cordeiro	Albumina, Imunoglobulina G e Fosfoglutamase
Frango	Ovo, Pato e Peru	Albumina, Actina
Suíno	Frango	Albumina, Actina
Pescado	Frango	Parvalbumina, Enolase e Aldolase

Fonte: Autora, 2019.

IMUNOPATOGENESE

As hipersensibilidades alimentares em seres humanos são geralmente mediadas por IgE e associadas a reações de hipersensibilidade tipo I (Pali-Scholl *et al.*, 2017).

Já em cães, os mecanismos imunológicos específicos envolvidos nas reações adversas a alimento não estão completamente elucidados. Alguns componentes proteicos presentes nos alimentos mostraram-se capazes de se ligar a duas moléculas de IgE, promover desgranulação dos mastócitos e liberação de mediadores inflamatórios (Ricci *et al.*, 2010) pré formados e neoformados, o que podem causar reações de fase imediata e tardia. Embora a alergia alimentar em cães possa estar associada a uma reação de hipersensibilidade tipo I, outras

reações hipersensibilidade e respostas inflamatórias crônicas têm sido documentadas nesta espécie (Bethlehem *et al.* 2012) e serem responsáveis por apresentações clínicas atípicas, como vasculites, oniquites e adenite sebácea associadas a alimento (Bethlehem *et al.*, 2012)

Tolerância oral

Em condições normais, as reações alérgicas a alimentos é evitada, pois o trato gastrointestinal e o sistema imunológico fornecem uma barreira que impede a absorção da maioria dos antígenos. O desenvolvimento do sistema imune local e sistêmico com o estímulo contínuo do microbioma conduz o amadurecimento do sistema imune e impede a estruturação de respostas alérgicas a alérgenos alimentares em mamíferos (Brandt *et al.*, 2006, Moreira, 2006).

A mucosa gastrointestinal constitui uma porta de entrada aos antígenos alimentares e às bactérias não patogênicas componentes do microbioma intestinal. Na mucosa se localiza o maior número de macrófagos, polimorfonucleares, células dendríticas, linfócitos T e B secretores de imunoglobulinas (Gaschen *et al.*, 2011, Sanz, 2001).

O mecanismo da tolerância oral se inicia com a captura de antígenos alimentares pelas células M nas Placas de Peyer, o que favorece seu processamento e apresentação antigênica pelas células apresentadoras de antígenos (APC's). A captação e apresentação antigênica podem também ocorrer após os antígenos alimentares ultrapassarem a lâmina própria intestinal e serem captados pelas APCs e transportados até os linfonodos mesentéricos.

Após processamento antigênico, as APC's irão apresentar os antígenos as células T e promover o desenvolvimento de células T reguladoras, as quais produzirão IL-10, TGF- β e ácido retinóico, o que induz a tolerância imunológica. Estas células T agem também sinergicamente com células B, induzindo a formação e secreção de IgA (Chinthrajah, *et al.*, 2016). Uma vez liberada na superfície da mucosa, as IgAs formam um complexo com os antígenos aos quais se ligam e impedem sua absorção e interação com o sistema imunológico, promovendo sua eliminação. Além disso, os enterócitos podem

processar o antígeno no lúmen intestinal e contribuir para a tolerância imunológica (Gaschen *et al.*, 2011, Sanz, 2001).

A diversidade do microbioma intestinal pode influenciar no desenvolvimento de respostas imunes no intestino, inclusive a alérgenos alimentares, sendo os *Clostridium* spp. responsáveis pelo desenvolvimento da tolerância intestinal. Os *Clostridium* spp. podem promover a produção de TGF- β , IL-8, IL-10, IL-18 e IL-22 na lâmina própria intestinal, promovendo a integridade do epitélio intestinal, a produção de muco e estímulo à produção de IgA de mucosa (Chinthrajah, et al., 2016).

A liberação de proteínas inerentes a patógenos (PAMP) pelo microbioma intestinal também favorece a ativação de células dendríticas intestinais, as quais liberam IL23 e estimulam a formação nos linfonodos mesentéricos de linfócitos Th17, os quais migram para a submucosa intestinal, liberam IL17, e estimulam a formação de peptídeos antimicrobianos pelo epitélio da mucosa.

O microbioma intestinal em pacientes humanos com alergia alimentar ainda não foi totalmente identificado, mas sabe-se que diminuição em sua quantidade e diversidade, como as causadas pelo uso de antibióticos precocemente, pode predispor o indivíduo a desenvolver alergia alimentar (Chinthrajah, et al., 2016), na medida que favorecem ao desenvolvimento de respostas Th2 no epitélio intestinal e nos linfonodos mesentéricos (Chinthrajah, et al., 2016).

A tolerância imunológica também pode ser quebrada diretamente pela produção de IL-25, IL-33 e TNF- α em resposta a uma lesão e ativação da imunidade inata, o qual aumenta a permeabilidade da barreira mucosa, conduz à absorção de antígenos alérgênicos e sensibilização (Gaschen *et al.*, 2011, Stokes e Waly, 2006, Chehade e Mayer, 2005).

Hipersensibilidade do tipo I

A hipersensibilidade do tipo I é conhecida como imediata devido o rápido aparecimento dos sinais clínicos após o contato com os alérgenos.

Sob baixo estímulo à respostas inflamatórias protetoras, como a resposta mediada por linfócitos T reguladores e de T auxiliares do tipo 17, os alérgenos alimentares após conseguir penetrar a barreira da mucosa intestinal podem ser

fagocitados por uma APCs de mucosa, a qual irão apresentá-los a um linfócito Th0, liberar IL1 e estimular sua transformação em Th2. Células Th2 iniciam um processo de produção de citocinas IL-4, o que induz à proliferação de linfócitos B, formação de plasmócitos e produção de IgE nas Placas de Peyer. Esta imunoglobulina se liga aos mastócitos na submucosa intestinal e podem, quando em novo contato com os alérgenos alimentares, levar à sua desgranulação e liberação de histamina, serotonina, bradicinina e heparina de forma imediata, e de proteases, leucotrienos, prostaglandinas e inúmeras citocinas de forma tardia, levando a um quadro intestinal inflamatório (Rakshanda *et al.*, 2017, Muller *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que linfócitos B e plasmócitos formadas na mucosa intestinal possuem caráter migratório e podem se deslocar das Placas de Peyer para outras superfícies corporais como a pele e vias aéreas. Como antígenos alimentares também podem acessar à corrente sanguínea a partir dos vasos linfáticos intestinais, estes podem interagir com as células Th2 e linfócitos B, IgE e mastócitos no tecido tegumentar, gerando sinais clínicos cutâneos de alergia alimentar (Figura 1) (Pali-Schöll *et al.*, 2017, Rakshanda *et al.*, 2017, Veenhof *et al.*, 2012, Stapel *et al.*, 2008).

Em indivíduos com dermatite atópica, também é proposto ocorrer à sensibilização aos alérgenos alimentares por via percutânea (Rakshanda *et al.*, 2017). Nestes casos, devido à alterações na barreira tegumentar, os alérgenos alimentares podem penetrar por via percutânea e serem em seguida capturados pelas células apresentadoras de antígenos, mormente as células de Langerhans. Essas APCs processam os alérgenos e apresentam seus peptídeos às células Th0 que, por sua vez, tornam-se células Th2, e liberam citocinas IL-4 e IL-13. A IL-4 desencadeará proliferação de linfócitos B, formação de plasmócitos e a liberação de imunoglobulinas IgE específicas, ocorrendo o processo de sensibilização. As IgE secretadas irão se ligar a receptores específicos de células inflamatórias como mastócitos, basófilos, células dendríticas e queratinócitos, ativando-as sempre que tiverem contatos com os alérgenos específicos (Pali-Schöll *et al.*, 2017, Rakshanda *et al.*, 2017, Mueller *et al.*, 2016) (Figura 1).

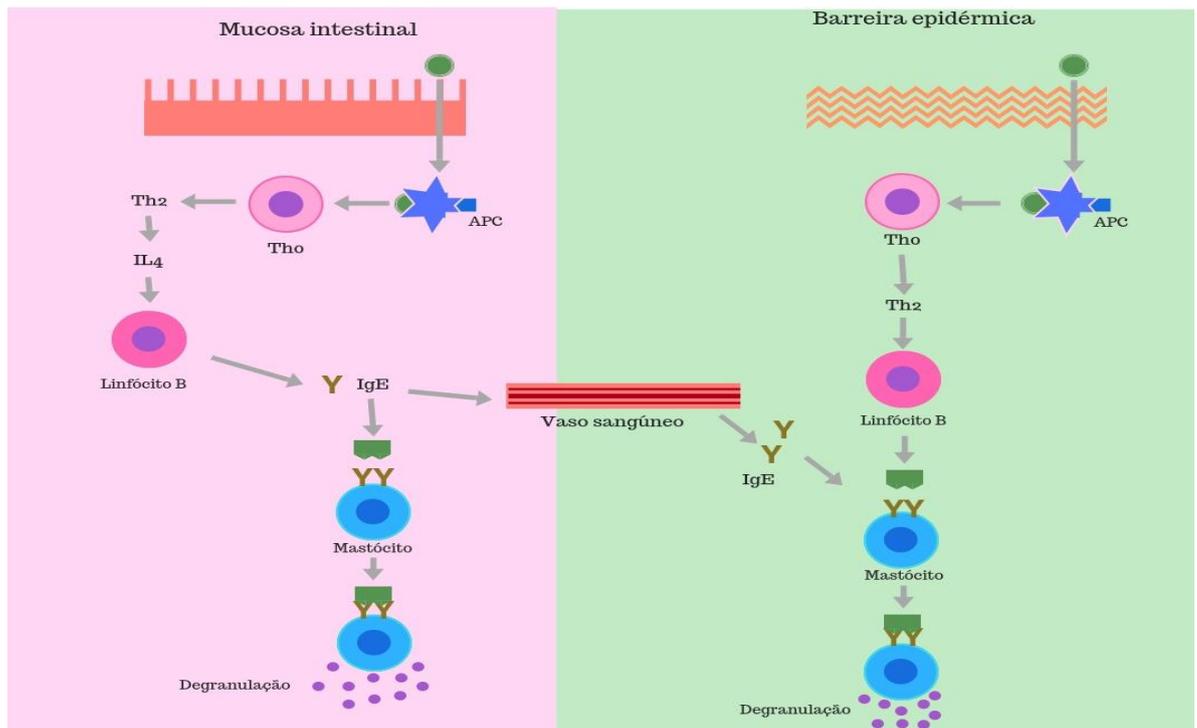


Figura 1: Esquema de reação de Hipersensibilidade tipo I. (Autora, 2019).

Hipersensibilidade dos tipos III e IV

As reações de hipersensibilidade tipo III, associadas à resposta mediada por anticorpos IgG, são reações normais do organismo a antígenos alimentares absorvidos pela corrente sangüínea, porém a presença de excesso de antígeno ou anticorpos pode levar à formação de imunocomplexos, contribuindo para o aumento da permeabilidade da mucosa intestinal e desempenhando um papel na patogênese das inflamações intestinais crônicas (Gocki e Bartuzi, 2016).

Em humanos e animais domésticos, reações de hipersensibilidade do tipo III estão envolvidas na doença celíaca, onde os anticorpos IgG e IgM contra a gliadina do glúten, em diferentes cereais, são formados e causam enterite duodenal (Marietta *et al.* 2011).

Na hipersensibilidade tipo IV, a reação é mediada por linfócitos T citotóxicos, cujo recrutamento demora de 24 a 48 horas, sendo conhecida como hipersensibilidade tardia (Bethlehem *et al.*, 2012). Os mecanismos imunológicos envolvidos ainda não estão completamente elucidados, e parecem estar

relacionados com a ativação de células T alérgeno-específicas, monócitos, eosinófilos e anticorpos, envolvendo principalmente o trato gastrointestinal.

As células T específicas levam a reações alérgicas tardias nos pacientes, células T CD8 + específicas para alérgenos ainda são desconhecidas, mas foram evidenciados Tc1 e Tc2 específicos para alérgenos. Sabe-se que a reação tardia é também mediada por células T CD4+ as quais diante do alérgeno irão produzir IFN e ativar células inflamatórias como os macrófagos, e citocinas como IL-4, IL-17 e IL-22, as quais desempenham um papel importante na alergia alimentar tardia. (Sicherer e Sampson, 2014)

Essas células T podem desencadear efeitos tóxicos diretos, induzindo apoptose celular, ou agir na liberação das citocinas que estimulam a resposta celular mediada (Nowak-Wegrzyn, 2015, Roudebush *et al.*, 2010).

ASPECTOS CLÍNICOS

Os sintomas da alergia alimentar em cães são semelhantes aos de outras doenças dermatológicas de origem alérgica, como prurido crônico, geralmente de moderado a grave, perene e contínuo, comumente associado a eritema, erupções papulares, alopecia ou hipotricose autoinduzidas, escoriações, erosões e dermatite piotraumática, geralmente encimadas por crostas (Figura 2 A e B). Piodermite bacteriana superficial recorrente são vistas em 66% dos cães, podendo também ser observada pododermatite (Rostaher *et al.*, 2017, Picco *et al.*, 2008).

Com a cronificação da resposta inflamatória, liquenificação, hiperpigmentação e distúrbios queratoseborréicos são comumente observados, sendo o supercrescimento de *Malassezia* spp. presente em aproximadamente 43% dos cães com hipersensibilidade alimentar (Picco *et al.*, 2008).

A otite externa bilateral é relatada em cerca de 56 a 80% dos cães com alergia alimentar, podendo ser o único sinal clínico desta morbidade em cães. Geralmente a otite associada à alergia alimentar é bilateral, tem caráter recorrente e tendência a cronificação, sendo associada à liquenificação, hiperplasia epitelial, estenose dos condutos auditivos, disbioses auriculares e otite média (Rostaher *et al.*, 2017, Cain *et al.*, 2017, Picco *et al.*, 2008).

Em menor porcentagem, alguns cães com reações adversas aos alimentos podem apresentar urticária, angioedema, doenças das unhas e fístula perianal (Favrot *et al.*, 2010). Respostas de hipersensibilidade do tipo III ou IV a antígenos alimentares podem também estar associados a quadros de vasculite, eritema multiforme, eritrodermia generalizada e síndromes de furunculose, celulite e seios drenantes, com piodermite profunda secundária. Em casos raros, a reação adversa a alimentos pode causar sinais neurológicos e respiratórios e alterações comportamentais (Cain *et al.*, 2017, Loeffler *et al.*, 2006).

Em um estudo retrospectivo realizado por Salzo e Larsson (2009), a topografia lesional dos animais com diagnóstico de alergia alimentar era predominante em membros torácicos e pélvicos, nas regiões lombar, abdominal, cervical ventral, axilar, facial (periocular e perioral), tóraco-abdominal e perineal (Figura 2 C e D). A presença de sinais gastrentéricos como aumento do peristaltismo, fezes amolecidas, diarreia e ou êmese crônicas intermitentes foram observadas em 20 a 30% dos animais (Carlotti, 2015).



Figura 2: A- Cão, bulldog francês, fêmea, 2 anos com lesão erosiva e alopecica em região facial secundária a autotraumatismo. B- Cão, Pitbull, fêmea, 3 anos com otite externa com pavilhão auricular apresentando lesões escoriativas por autotraumatismo. C – Cão, sem raça definida, fêmea, 1,5 anos com lesão localizada, alopecica com eritema em região peribucal devido a alergia

alimentar. D- Cão, sem raça definida, fêmea, 7 anos com blefarite secundária a alergia alimentar, região periocular com alopecia, lignificação e hiperpigmentação evidenciando cronicidade. (Fonte: autora, 2018.)

Dermatite atópica *lato sensu*

A dermatite atópica (DA) é uma dermatopatia inflamatória, pruriginosa, crônica e recorrente (Bizikova *et al.*, 2013, Olivry *et al.*, 2010;), que resulta da interação complexa de superantígenos de agentes infecciosos, irritantes primários, alérgenos ambientais e alimentares com defeitos na função da barreira epidérmica e hiperreatividade imunológica (Akdis *et al.*, 2006).

Em uma revisão de nomenclatura, a dermatite atópica foi subdividida em: “dermatite atópica *lato sensu*”, “dermatite atópica *stricto sensu*”, e “dermatite atópica *simili*”. A DA *stricto sensu* ocorre quando seus sinais clínicos são estritamente relacionados à sensibilização a alérgenos ambientais. A DA *lato sensu* se relaciona à polissensibilização e precipitação de seus sinais clínicos por trofoalérgenos e alérgenos ambientais. Já a dermatite atópica *simili* refere-se à presença de eczema atópico não relacionado à sensibilização alérgênica e a produção de IgE alérgenos -específicos (Pucheu-Haston *et al.*, 2015).

Segundo Favrot (2010), 23% dos casos de DAC são também induzidos ou exacerbados por alimentos, no entanto, em estudo recente foi possível observar que em uma população de cães com dermatite atópica, 90% apresentavam reação linfocitária positiva contra um ou mais alérgenos alimentares (Suto *et al.*, 2015). Olivry e Mueller (2017), relatam que 30% dos cães com dermatite atópica têm alergia alimentar. Em estudo realizado por Vandresen e Farias (2018) os trofoalérgenos precipitaram os sintomas da dermatite atópica em 33% dos cães com prurido perene.

Os mecanismos para o desenvolvimento de alergia alimentar em indivíduos com dermatite atópica não está claro, porém, resultados preliminares indicam que defeitos na função da barreira epidérmica, como a mutação da filagrina, e do intestino podem favorecer à penetração e sensibilização aos alérgenos alimentares através da exposição e absorção por via percutânea e gastrointestinal (Tsakok *et al.*, 2018, Tham e Leung, 2018).

Em alguns cães com DA, os alérgenos alimentares parecem atuar como um dos gatilhos da alergia, onde a sensibilização pode ocorrer primeiramente a alérgenos

alimentares e, posteriormente a alérgenos ambientais (Walker *et al.*, 2018, Čelakovská *et al.*, 2015).

A exposição contínua a alérgenos alimentares nestes indivíduos estimulam uma resposta Th2 e a sensibilização a estes. Com o estabelecimento da resposta imuno alérgica crônica há desencadeamento de inflamação tegumentar e prurido crônico, bem como uma diminuição na produção de ceramidas e da barreira da pele, o que favorece a penetração de alérgenos ambientais por via percutânea e a sensibilização a estes.

O excesso de resposta Th2 pode também inibir a resposta Th17 e a produção de peptídeos antimicrobianos tegumentares, o que predispõe à disbioses tegumentares e a infecções bacterianas e fúngicas recorrentes (Tsakok *et al.*, 2018, Pucheu-Haston *et al.*, 2015).

Os alérgenos alimentares podem causar reações adversas mediadas por células, o que perpetuaria a resposta inflamatória, e responderia por sinais clínicos de cronificação da doença e os sintomas de prurido crônico e perene, associado à disqueratoses e liquenificação cutânea nesses animais (Nowak-Wegrzyn, 2015, Roudebush *et al.*, 2010).

Algumas raças possuem predisposição à dermatite atópica *latu sensu* e podem se sensibilizar a alimentos e a alérgenos ambientais como o West Highland White Terrier, Pug, Leão da Rodésia, Pastor Alemão, Boxer, Bulldog Francês, Bull Terrier, Vizsla, Collies, Dálmata, Lhasa Apso, Schnauzer Miniatura, Labradores, Sharpei e Dachshund (Pucheu-Haston *et al.*, 2015, Picco *et al.*, 2008).

Cães com dermatite atópica *latu sensu* geralmente iniciam com quadro pruriginoso antes de um ano de idade, porém os sinais clínicos são indistintos das outras formas de dermatite atópica e de alergia alimentar verdadeira, como prurido crônico e perene em porção distal dos membros, axilas, regiões inguinal e flexurais, associados ou não a otites recorrentes (Pucheu-Haston *et al.*, 2015, Picco *et al.*, 2008).

Porém, cães com dermatite atópica *latu sensu* mais comumente apresentam prurido e lesões perianal e perioral, disqueratoses e dermatites seborreicas, malasseziose crônica e distúrbios gastrintestinais intermitente, e diferentemente de quadros de dermatite atópica canina *strictu sensu*, as crises alérgicas não possuem

sazonalidade, podendo ocorrer enquanto o cão estiver exposto ao alérgeno alimentar (Pucheu-Haston *et al.*, 2015, Picco *et al.*, 2008).

Assim o ICADA sustenta o conceito de que as reações cutâneas adversas aos alimentos podem se manifestar em cães com dermatite atópica, recomendando que todos cães diagnosticados com esta morbidade e que apresentem prurido perene devem passar por dieta de restrição com proteína original (Pucheu-Haston *et al.*, 2015, Gaschen; 2011).

As principais manifestações clínicas e predisposição racial presente em cães com alergia alimentar e cães com dermatite atópica *latu sensu* podem ser visualizadas no Quadro 2.

Quadro 2 – Sinais clínicos comparados entre cães com alergia alimentar e cães com dermatite atópica *latu sensu*.

	Alergia Alimentar	Dermatite atópica <i>latu sensu</i>
Idade de Início	Primeiros meses de vida Após 10 anos	Antes de 1 ano
Raça Predisposta	Boxer, Pastor Alemão, West Highland White Terrier, Pugs e Labradores	West Highland White Terrier, Pugs, Leão da Rodésia, Pastor Alemão, Boxer, Bulldog Francês, Bull Terrier, Vizsla, Collies, Dálmata, Lhasa Apso, Schnauzer Miniatura, Retrievers, Sharpei e Dachshund.
Sinais Clínicos	Prurido em face (periocular e perioral) otites Lesão tóraco-abdominal Lesão perineal Malasseziose Sintomas gastrintestinais (20-30%)	Prurido em face Prurido interdigital otites Lesão em axilas Lesões em Abdômen Disqueratoses e dermatite seborreica Malasseziose Sintomas gastrintestinais (1-4%)
Dieta Restritiva	Melhora 100% dos sinais clínicos	Melhora parcial dos sinais clínicos

Fonte: A autora, 2019.

DIAGNÓSTICO DA ALERGIA ALIMENTAR

A RAA deve ser investigada em todos os cães com quadros pruriginosos crônicos, após o descarte de outras dermatopatias pruritogênicas de origem infecto-parasitária ou de alergia à saliva de artrópodes. O diagnóstico da alergia alimentar baseia-se no histórico, nos sinais clínicos e na implementação de uma dieta de eliminação ou dieta restritiva (Olivry *et al.*, 2015, Provérbio *et al.*, 2010).

Dieta de eliminação

As dietas de eliminação têm sido consideradas o padrão ouro para diagnosticar a alergia alimentar em cães. Os ingredientes são geralmente escolhidos com base na história da dieta do animal e, preferencialmente, deve conter apenas ingredientes para os quais o animal não foi exposto previamente de forma regular. A dieta adotada pode ser caseira com proteína original ou um alimento comercial com proteína única e original, preferencialmente hidrolisado (hipoalergênico) ou ultra- hidrolisado (analergênico). A duração da dieta restritiva deve ser no mínimo de cinco semanas e máximo de oito semanas para cães (Olivry *et al.*, 2015, Provérbio *et al.*, 2010).

Há suspeição de alergia alimentar com a melhora superior a 90% dos sinais clínicos, em casos de alergia alimentar verdadeira, ou com a resolução parcial dos sinais clínicos, em casos dermatite atópica *latu sensu*, durante o período que o paciente realizou a dieta restritiva, e subsidiado através do desafio provocativo, quando é reintroduzida a dieta inicial e ocorre uma recidiva do quadro alérgico (Olivry *et al.*, 2015, Provérbio *et al.*, 2010, Picco *et al.*, 2008).

Os pacientes raramente respondem à dieta de eliminação durante a primeira semana e alguns experimentam uma redução do prurido durante a segunda ou terceira semana da dieta (Olivry *et al.*, 2015, Provérbio *et al.*, 2010).

Pacientes com sensibilidade a determinado alimento quando expostos novamente ao mesmo podem ter a exacerbação do prurido em algumas horas ou após dois a sete dias da ingestão do alérgeno alimentar, embora alguns cães que apresentem reações alérgicas tardia ao alimento possam demorar duas semanas para o aparecimento de sinais clínicos (Olivry *et al.*, 2015, Provérbio *et al.*, 2010).

Assim, o desafio alimentar deve ser realizado com um alimento de cada vez por um período de sete a quinze dias para determinar se ocorre uma reação alérgica àquele alimento em teste. Quando um alimento causa a recorrência de sinais clínicos, o cão deve ser medicalizado e a dieta restritiva é usada novamente por pelo menos quinze dias ou até que os sintomas regredam e, posteriormente, deve-se reintroduzir outro alimento para teste (Olivry *et al.*, 2015, Provérbio *et al.*, 2010, Picco *et al.*, 2008).

Os proprietários devem ser instruídos para que nenhuma fonte alimentar além da dieta restritiva seja oferecida ao paciente e isso inclui: suplementos alimentares, medicações com palatilizantes, petiscos, frutas e brinquedos mastigáveis que contenham proteína animal como palatilizante e aromatizante. Para uma adesão maior por parte dos tutores, petiscos com a mesma fonte proteica utilizada na dieta podem ser oferecidos para os animais em tratamento, sempre garantindo que não há contaminação proteica (Parr e Remillard, 2014).

Dieta de eliminação caseira

As dietas de eliminação caseiras para cães consistem em uma fonte de proteína original, a qual o animal nunca foi exposto de forma frequente, e uma fonte de carboidratos, preferencialmente inédita, como arroz integral, batata, batata salsa ou doce ou mandioca.

As dietas de eliminação caseira geralmente são menos balanceadas, e apresentam deficiência de cálcio, zinco, cobre e vitaminas D e E, não sendo recomendada para uma nutrição ao longo da vida. Estas devem idealmente serem realizadas por um nutricionista veterinário para que uma formulação adequada seja prescrita (Stockman *et al.*, 2013, Bethlehem *et al.*, 2012).

A dieta atual deve ser gradualmente substituída pela dieta restritiva ao longo de três a quatro dias para evitar desequilíbrios gastrintestinais, porém, estes são raros (Mueller e Unterer, 2018).

A orientação sobre a forma de fornecer a carne ao animal é importante, pois a carne crua predispõe a infecções gastrintestinais além de expor o animal ao risco de contrair doenças de caráter zoonótico (Mueller e Unterer, 2018).

As limitações envolvendo a dieta caseira, como o preparo, o risco de contaminação, as reações alérgicas cruzadas entre componentes alergênicos

alimentares, a necessidade de acompanhamento com médicos veterinários nutrólogos e a dedicação exigida do proprietário para sua elaboração têm feito com que rações comerciais com proteínas únicas (restrição antigênica) hidrolisadas ou ultra- hidrolisadas sejam cada vez mais utilizadas para o diagnóstico e a manutenção de animais com hipersensibilidade alimentar (Salzo e Larsson, 2009).

Dietas com restrição antigênica hidrolisada (hipoalergênicas)

Um número crescente de dietas com proteínas hidrolisadas estão disponíveis no mercado e podem ser usadas como dietas de eliminação. A dieta hidrolisada deve ser escolhida também com base na fonte proteica, optando-se preferencialmente por uma proteína original ou uma proteína com menor chance de desencadear uma reação alérgica aos cães (Mueller Unterer, 2018).

As dietas hidrolisadas são compostas de fragmentos de proteínas com pesos moleculares menores que 10 kDa que conferem maior digestibilidade, absorção e menor antigenicidade, visto que, em cães, a maior parte dos alérgenos alimentares possuem massa molecular entre 51 e 58 kDa, e a menor proteína que provocou uma resposta de IgE dependente continha uma massa molecular de 27 kDa (Pali-Schöll *et al.*, 2017, Suto *et al.*, 2015).

Assim, dietas hidrolisadas minimizariam as chances de antígenos alimentares de se ligarem a duas moléculas de IgE nas superfícies dos mastócitos e causarem desgranulação mastocitária e resposta alérgica inflamatória. Porém essas dietas podem auxiliar animais com hipersensibilidade do tipo I, IgE dependentes a alimentos, mas não animais que apresentam reações tardias, mediadas por células. (Ricci *et al.*, 2013, Cave *et al.*, 2006).

Vandresen e Farias (2018) compararam o efeito da dieta restritiva em cães com diagnóstico presuntivo de dermatite atópica, sendo um grupo alimentado com dieta caseira com proteína original e outro grupo com dieta comercial hidrolisada de soja, havendo redução significativa dos sinais clínicos em 50% e 63% dos cães, respectivamente. Em adição, cães submetidos à dieta comercial hidrolisada obtiveram uma melhora mais rápida à dieta, o que sugere menor potencial alergênico destas dietas.

É importante ressaltar que não existe uma padronização no mercado de dietas comerciais com proteínas hidrolisadas, e alimentos com estas podem conter desde

aminoácidos simples a polipeptídeos de grande peso molecular dependendo do grau de hidrólise (Ricci *et al.*, 2013, Cave *et al.*, 2006).

Embora as dietas hidrolisadas pareçam resultar em melhorias em muitos cães com RAA, com base em dados publicados, eles não são completamente confiáveis para descartar alergia alimentar, pois algumas rações podem ser insuficientemente hidrolisadas, além de conter uma fonte de proteína não confiável ou contaminação com outros alimentos. Além disso, algumas dessas dietas contêm soja como ingrediente listado, que pode ser um alérgeno em potencial para reações alérgicas em cães (Ricci *et al.*, 2013).

Há também relatos de que estas dietas podem conter uma ou mais proteínas animais não declaradas, podendo provocar uma reação alérgica em pacientes sensibilizados previamente a estas (Horvath-Ungerboeck *et al.*, 2017, Willis-Mahn *et al.*, 2014, Ricci *et al.*, 2013).

A contaminação observada na maioria das dietas comerciais hidrolisadas analisadas pode ocorrer devido limpeza inadequada da produção, armazenamento ou pelo transporte inadequado das matérias primas, sendo assim a reação cruzada entre os alérgenos alimentares pode ocorrer mesmo em dietas hidrolisadas. (Horvath-Ungerboeck *et al.*, 2017, Willis-Mahn *et al.*, 2014, Ricci *et al.*, 2013).

O quadro 3 compara as vantagens e desvantagens da dieta caseira frente a comercial hidrolisada.

Quadro 3 - Principais vantagens e desvantagens entre as dietas caseira e ração comercial hidrolisada.

	DIETA CASEIRA	RAÇÃO COMERCIAL
VANTAGENS	Ingredientes Controlados Alta Palatabilidade Não causa hiperlipidemia Livre de Conservantes	Dieta Balanceada Pronta para fornecer Menos alergênica Padronizada
DESVANTAGENS	Dieta Desbalanceada Contaminação Reação cruzada Trabalhosa Acompanhamento nutricional Custo Elevado	Contaminação Cruzada Palatabilidade Moderada Aumento da Lipemia Presença de Conservantes Custo Elevado Pouca eficácia em casos de reações celulares mediadas

Fonte: Autora, 2019.

Dietas com restrição proteica ultrahidrolisadas (analérgicas)

Rações ultrahidrolisadas são feitas a partir da remoção de fragmentos proteicos maiores via separação física ou filtração molecular, o que aumenta a qualidade do produto e diminuindo sua alergenicidade. A ultrafiltração do hidrolisado favorece a dietas ricas em aminoácidos com pesos moleculares inferiores a 3 kDa, o que minimiza contaminação proteica, evita as reações IgE dependentes e parece minimizar as respostas imunomediadas inflamatórias em cães com alergia alimentar (Bizikova e Olivry, 2016, Cave, 2006).

Em um estudo realizado por Olivry et al. (2017) comparando a presença de IgE sérica específica de frango em soro de cães submetidos a rações comerciais não hidrolisadas, hidrolisadas e ultrahidrolisadas, demonstrou-se que cães alimentados com ração ultrahidrolisada tiveram a menor presença de IgE sérica, sendo assim a hidrólise extensiva de um alérgeno alimentar necessária para prevenir o reconhecimento de epítomos alergênicos pela IgE, evitando o desencadeamento de uma reação alérgica ao alimento.

Entretanto, em um estudo realizado por Matricoti e Noli (2018), aproximadamente 30% dos cães alimentados com ração comercial ultrahidrolizada não apresentaram melhora clínica com a dieta, provavelmente devido serem alérgicos a proteína da ração mesmo que na sua forma ultrahidrolizada.

Teste alérgico no diagnóstico da alergia alimentar em cães

O diagnóstico da alergia alimentar em cães, como discutido anteriormente, é suspeito quando há involução dos sinais clínicos com uma dieta restritiva por até oito semanas e, subsidiado, com um desafio alimentar, se associado à recidiva dos sinais clínicos após reexposição com a dieta pregressa.

O período da dieta de eliminação demasiadamente longo, que requer dedicação e comprometimento do proprietário para que os alérgenos alimentares possam ser identificados; a possibilidade de reação cruzada entre alérgenos alimentares; o empirismo da seleção de dietas baseadas no histórico da exposição proteica pregressa e a baixa adesão à utilização de dietas caseiras ou comerciais com proteínas de difícil acesso tornaram necessário a investigação de novos testes que possam ser aplicados no diagnóstico da sensibilização a alérgenos alimentares

envolvidos na alergia alimentar, ou nas respostas inflamatórias associadas às reações adversas aos alimentos (Olivry *et al.*, 2015, Mueller e Unterer, 2018).

Testes sorológicos IgE e IgG específicos para alimentos

Os testes sorológicos para alimentos visam identificar a reatividade de anticorpos a componentes alimentares específicos. Esses testes são projetados para medir a imunoglobulina E (IgE) ou imunoglobulina G (IgG) séricas contra vários ingredientes alimentares.

As respostas mediada por anticorpos IgG são normais no organismo a antígenos alimentares absorvidos pela corrente sanguínea (Gocki e Bartuzi, 2016). Em estudo realizado por Zimmer *et al.* (2011), demonstrou-se que cães com alta concentração sérica de anticorpos específicos para proteínas alimentares, mesmo após dieta de eliminação, não apresentaram diminuição sérica em seus níveis. Em adição, um estudo revisional sobre os diagnósticos de alergia alimentar, os testes sorológicos para IgE e IgG específicos para alimentos mostraram baixa sensibilidade e especificidade, tendo valor limitado para diagnóstico. A reatividade de IgG sérica para antígenos alimentares provavelmente ocorre por ser um componente da imunidade da mucosa, e não representa uma reação de hipersensibilidade do tipo I a proteínas dietéticas (Mueller e Olivry, 2017, Hagen-Plantinga *et al.*, 2017).

Teste de contato para alimentos (Patch Test)

Dois estudos avaliaram o teste de contato com alimentos *in natura* em múltiplos cães com dermatite alérgica, com o objetivo de avaliar a resposta tardia ou inflamatória celular mediada a alérgenos alimentares. Para sua realização, os alimentos crus e ou cozidos foram colocados em câmaras (*Finn chambers*) e as mesmas eram fixadas na pele do cão alérgico por 48 horas. Após esse período, a ocorrência de reações tegumentares de aspecto pápulo-pustular, manchas ou placas eritematosas eram analisadas. Ambos os estudos concluíram que, devido a seu alto valor preditivo negativo, o teste de contato pode ser útil na seleção dos ingredientes de dietas restritivas, principalmente em relação às reações as proteínas do alimento, porém, devido ao baixo valor preditivo positivo, não podem ser usados para diagnóstico definitivo de alergia alimentar (Johansen *et al.*, 2017,

Bethlehem *et al.*, 2012). Dietas comerciais também foram utilizadas em *patch test* mas mostraram baixos valores preditivos positivos e negativos.

Teste de proliferação de linfócitos

A resposta de proliferação de linfócitos a antígenos alimentares foram avaliados em uma série de estudos japoneses que concluíram que podem ser úteis na detecção da reação inflamatória não mediada por IgE a alérgenos alimentares em cães, porém, devido a dificuldade de execução, este teste permanece sendo utilizado em protocolos experimentais (Kawano *et al.*, 2013, Ishida *et al.*, 2012).

Teste de puntura para alimentos

Os testes cutâneos têm sido utilizados há décadas para o diagnóstico da sensibilização a alérgenos ambientais e o teste cutâneo de puntura tem sido considerado o principal método para confirmar sensibilização alérgica mediada por IgE na medicina. É um procedimento pouco invasivo e quando realizado corretamente tem boa reprodutibilidade (Schou Nielsen *et al.*, 2017, Warford *et al.*, 2016, Fatteh *et al.*, 2014).

Para avaliação da sensibilização a alérgenos alimentares, o teste de puntura é considerado de alta sensibilidade, mas baixa especificidade, devendo ser acompanhado por uma dieta de eliminação posterior (Hammond e Lieberman, 2018, Weiser *et al.*, 2014).

Um importante pré-requisito para a realização de teste cutâneo com resultados confiáveis é a disponibilidade de preparações alergênicas estáveis e padronizadas, isto é, com potência, estabilidade e composição conhecidas. A qualidade e a quantificação dos alérgenos presentes nos extratos é muito importante para interpretação e valoração dos testes. Quando realizado com extratos padronizados, o teste cutâneo de puntura apresenta valores preditivos positivos de 60 a 75%, e valor preditivo negativo de até 95% (Warford *et al.*, 2016, Fatteh *et al.*, 2014, Soldera *et al.*, 2015, Lieberman *et al.*, 2010).

Na tentativa de definir a acurácia do teste de puntura no diagnóstico da alergia alimentar em humanos, Hill *et al.* (2004) determinaram os valores médios de corte para o diâmetro médio das pápulas ao teste com leite de vaca, clara de ovo e amendoim, acima dos quais o valor preditivo positivo para o diagnóstico de alergia

alimentar fosse alto. Os valores dos diâmetros definidos como diagnóstico positivo para leite de vaca e amendoim foram de 8 mm, e para ovo foi de 7 mm.

Em pacientes humanos com dermatite atópica, a combinação entre o teste de puntura e o teste de contato (*atopic patch test*) demonstrou ter uma alta sensibilidade, com um alto valor preditivo negativo, e boa especificidade, o que melhorou seu valor preditivo positivo e, talvez, possa ser útil na confecção do diagnóstico da alergia alimentar, sem necessidade de desafio dietético (Hammond e Lieberman, 2018, Chung *et al.*, 2010).

Técnica de aplicação e interpretação

Para a realização do teste de puntura, uma tricotomia com máquina de tosa é realizada na região lateral do tórax dos cães. Em seguida, após a higienização do local com solução fisiológica, são feitas marcações dos pontos de aplicação do extrato de alérgenos, com intervalos que distam 1,5 centímetros entre cada um, com caneta dermatográfica.

Puntores são utilizados na pele em um ângulo de 45° a 60° sobre uma gota do extrato alergênico, elevando-a para permitir a penetração do extrato, ou, as punturas são realizadas a partir de puntores de plástico com ponta dupla *Duotip Test II* ® (Lincoln Diagnostics, Decatur, EUA), os quais são mantidos individualmente em imersão em um extrato alergênico, e removidos no momento da realização da puntura.

Após a introdução epicutânea do alérgenos pelo puntor (Figura 3), aguarda-se 15 minutos para sua leitura. Para auxiliar a interpretação dos testes são necessários os controles negativo e positivo. As soluções usadas como controle negativo são geralmente os diluentes utilizados na conservação dos extratos, servindo para detectar dermatografismo e reatividade inespecífica da pele ao diluente e/ou a puntura. A histamina, na concentração de 10mg/mL é utilizada como controle positivo para ajudar a detectar a supressão mediada por medicamentos ou variações no desempenho dos técnicos que realizam o teste (Soldera *et al.*, 2015, Lieberman *et al.*, 2010, Cocco *et al.*, 2007).

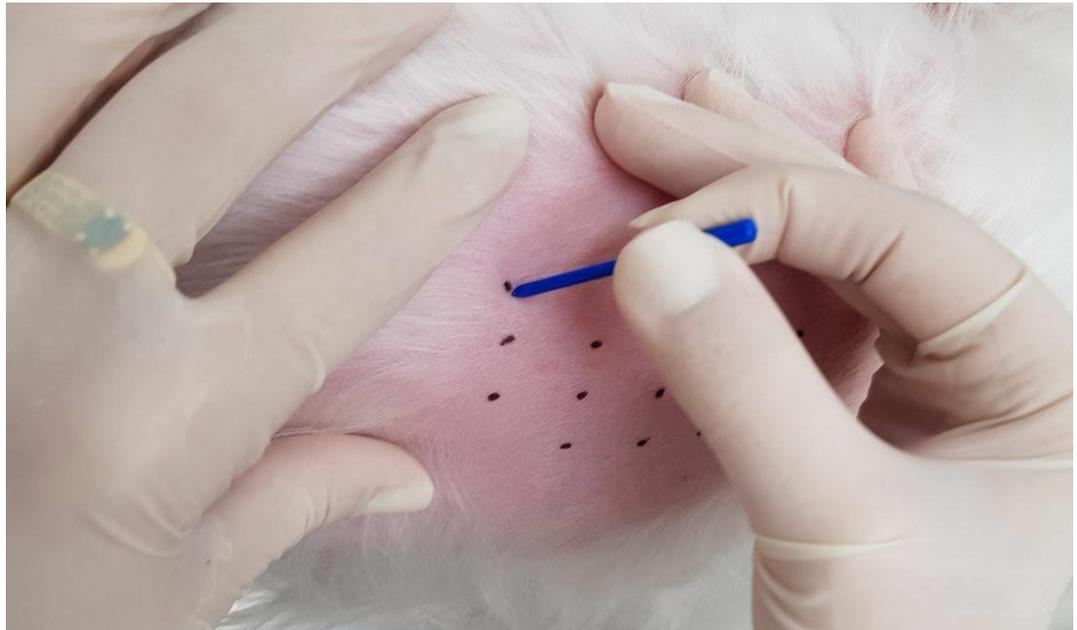


Figura 3: Introdução epicutânea de alérgeno utilizando puntor de plástico Duotip® em um cão com dermatite alérgica (Autora, 2018).

São considerados positivos os resultados com formação de pápula de pelo menos 3mm de diâmetro médio acima do diâmetro da pápula do controle negativo que, em geral, tem formação papular ausente ou mínima. O surgimento de pápula significativa representa uma reação em que há presença do anticorpo IgE específico ao alérgeno testado. O significado do teste positivo relaciona-se a uma sensibilização e não necessariamente à alergia, sendo necessária uma correlação clínica para comprovação da doença (Soldara *et al.*, 2015, Lierberman *et al.*, 2010, Cocco *et al.*, 2007).

Alguns fármacos inibem a reatividade ao teste e recomenda-se que os pacientes evitem anti-histamínicos por 15 dias antes da aplicação dos testes de leitura imediata, e a aplicação de corticosteróides tópicos por três semanas, já que podem reduzir tanto a fase imediata quanto tardia da reação cutânea (Schou Nielsen *et al.*, 2017, Soldara *et al.*, 2015, Cocco *et al.*, 2007).

Teste de puntura para alimentos na medicina veterinária

Na medicina veterinária, apenas a partir da década de 90, foram estudados testes cutâneos com extratos alimentares com intuito diagnóstico da alergia alimentar. Inicialmente, utilizou-se a técnica de teste intradérmico, porém reações

cutâneas positivas a alérgenos alimentares ocorreram em animais saudáveis. Talvez, isto pode ter ocorrido devido à falta de padronização dos extratos alergênicos ou variações na técnica utilizada para o teste, ou devido a irritabilidade dos extratos utilizados. Desde então, nenhuma outra técnica de teste cutâneo de leitura imediata foi estudada para o diagnóstico de reação adversa a alérgenos alimentares em cães com dermatite alérgica (Kunkle *et al*, 1992, Jeffers *et al.*, 1991).

Assim, os testes de puntura para avaliação de reações imediatas mediadas por IgE a alérgenos alimentares em cães com dermatite alérgica não tem sido estudadas de forma crítica, sendo desconhecido a sua sensibilidade, especificidade e os valores preditivos positivos e negativos na confecção do diagnóstico da alergia alimentar em cães e gatos, bem como sua correlação com testes intradérmicos ou sorológicos.

CAPÍTULO 2

Artigo científico a ser submetido para publicação na revista científica de publicação periódica *Veterinary Dermatology*

Avaliação do teste de puntura no diagnóstico da alergia alimentar em cães

Camilla Oliveira Rosa Alcalá*, Marconi Rodrigues de Farias*, Juliane Possebom*.

* Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Escola de Ciências da Vida da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, Brasil.

Correspondência: Marconi Rodrigues de Farias, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Rua Imaculada Conceição, 1155, Curitiba, PR, Brasil. E-mail: camilla.alcala@hotmail.com

Fontes de financiamento:

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Governo Federal, bolsa de estudos para a pós-graduação *stricto sensu*. Brasília, Distrito Federal, Brasil.

Conflitos de interesse:

Não foram declarados conflitos de interesse.

Introdução – O teste de puntura tem sido utilizado no diagnóstico da sensibilização a alérgenos ambientais e alimentares na medicina humana. Porém ainda não há estudos em relação ao uso do teste de puntura para o diagnóstico de alérgenos alimentares em cães com dermatite alérgica na medicina veterinária.

Objetivo – Estabelecer a acurácia do uso do teste de puntura para o diagnóstico de alérgenos alimentares em cães com dermatite alérgica, visando testar uma nova forma de teste alérgico para alimentos e avaliar a dieta restritiva baseada no teste.

Animais- 34 cães com diagnóstico de dermatite alérgica para o grupo de estudos e 10 cães hígdos para o grupo controle.

Métodos – O teste de puntura foi realizado inicialmente em 10 cães hígdos (grupo controle) para avaliação do potencial irritativo do teste puntura com extratos alergênicos de alimentos na concentração de 1:20 p/v de concentração com 50% de glicerol e 0.45% de fenol. Após o teste de puntura para alimentos e alérgenos ambientais foi realizado em 34 cães com Dermatite Alérgica, dos quais 25 animais foram submetidos à dieta restritiva baseada no teste por 60 dias e posterior reexposição ao alimento positivo no teste avaliando pVAS e CADESI-4 nos dias 0, 30, 60 e após reexposição. Os valores de pVAS e CADESI-4 observados ao longo do estudo foram analisados por meio de ANOVA de mensurações repetidas, considerando valor de $p < 0,05$.

Resultados – No grupo de cães controle apenas 2 animais reagiram a um único alérgeno alimentar, leite e trigo. Dos 34 cães submetidos ao teste de puntura para alérgenos ambientais e alimentares, 4 (12%) reagiram só a alérgenos ambientais, 4 (12%) só a alérgenos alimentares e 26 (76%) cães a ambos os alérgenos. No grupo teste (n=25) houve uma melhora significativa da pVAS e CADESI-4 após 30 e 60 dias de exclusão dietética, ocorrendo piora significativa dos scores com a reexposição ao alérgenos alimentar. Foi possível diminuir o uso da medicação contínua em 11 (46%) dos cães do grupo teste.

Conclusão e Importância clínica – O teste de puntura se apresentou como importante método de triagem dos alérgenos alimentares que determinam prurido no animal alérgico, permitindo diminuição de terapia medicamentosa e melhora dermatológica.

Introdução

As reações adversas aos alimentos em humanos geralmente são mediadas por uma reação de hipersensibilidade do tipo I, caracterizada pela penetração de alérgenos alimentares pela mucosa intestinal, processamento e apresentação antigênica por células dendríticas a linfócitos Th0, os quais são ativados para Th2 e produzem citocinas IL-4 e IL-13, que induzem proliferação de linfócitos B, formação de plasmócitos e IgE alérgenos específicos.^{1,2} Imunoglobulinas IgE geralmente são citotrópicas e se aderem às superfícies de mastócitos e APCs e, cada vez que entram em contato com os alérgenos específicos, conduzem à desgranulação de mastócitos e a liberação de mediadores pró inflamatórios.^{1,2} Em geral, os plasmócitos formados nas placas de Peyer intestinais tem caráter migratório, podendo por via linfática, se deslocarem até a pele, e desencadear sintomas clínicos de alergia alimentar à distância. Penetração percutâneas e sensibilização de alérgenos alimentares também têm sido demonstradas ocorrer principalmente em humanos com dermatite atópica.^{1,2,3}

Em cães, as reações cutâneas adversas a alimentos são geralmente de caráter celular mediada e desencadeadas por proteínas de diferentes espécies animais e vegetais e representam até 10% das doenças alérgicas tegumentares, embora possam ocorrer em até 30% dos cães com dermatite atópica.^{1,4} Em estudo recente, observou-se numa população de cães com dermatite atópica, que 90% apresentavam reação linfocitária positiva contra um ou mais alérgenos alimentares.

5

Reações tegumentares contra alérgenos alimentares se caracterizam por prurido, geralmente crônico, perene, de intenso a grave, primário, mormente em

áreas interdigitais e regiões abdominal, axilar, inguinal, perioral e perianal.^{6,7} Sinais gastrentéricos têm sido observados como comorbidade em 20 a 30% destes pacientes.⁶ Eritema e erupção papular são lesões elementares comumente observadas, mormente associadas à alopecia autoinduzida, escoriações, crostas e dermatite piotraumática.^{6,7} A cronicidade da resposta inflamatória celular mediada pode levar à distúrbios queratoseborréicos, hiperpigmentação e liquenificação, sendo comum o aparecimento de piodermite superficial e de supercrescimento de *Malassezia* spp., as quais podem ocorrer com frequência de 66 e 43%, respectivamente, em cães.^{7, 8}

A otite externa é relatada em cerca de 56 a 80% dos cães com reações adversas a alimentos, podendo ser o único sinal clínico desta morbidade. Geralmente esta tem caráter bilateral, recorrente e tendência a cronificação, sendo associada à liquenificação, hiperplasia epitelial, estenose dos condutos auditivos, disbioses auriculares e otite média.^{6,7,8,9}

Assim, as reações adversas ao alimento devem ser consideradas em todos os cães com quadros pruriginosos crônicos e perenes. Seu diagnóstico se baseia no histórico, nos sinais clínicos e na implementação de uma dieta restritiva por mínimo de cinco e máximo de oito semanas.^{10,11} A dieta restritiva deve conter ingredientes os quais o animal não teve exposição pregressa regular¹², e o diagnóstico é então presumido com a melhora ou resolução parcial dos sinais clínicos durante o período que o paciente se mantém com a dieta restritiva, e subsidiado através do desafio provocativo, quando a dieta pregressa é reintroduzida, e ocorre uma recidiva do quadro clínico imunoalérgico.^{12, 13, 14}

O diagnóstico baseado em dieta restritiva, por ser demasiadamente longo, mormente realizado com proteínas exóticas e de difícil acesso, ser pouco sensível devido à existência de reações cruzadas entre alérgenos alimentares e pelas dificuldades relacionadas aos desafios dietético, tem tido baixa adesão e desistências ao longo de sua implementação, o que torna necessário a pesquisa de novos testes para o diagnóstico dos alérgenos alimentares envolvidos nas reações adversas aos alimentos em cães.^{5,12}

Em pacientes humanos com dermatite atópica, a combinação entre o teste de punção e o teste de contato (*atopic patch test*) mostrou ter uma alta

sensibilidade e uma melhor especificidade que ambos os testes isoladamente, além de um alto valor preditivo negativo e positivo, podendo ser útil no diagnóstico da reação adversa alimentar nestes pacientes.^{17,18}

A resposta inflamatória mediada por células a alimentos tem sido demonstrada em cães e o *atopic patch test* se mostrou um teste útil na seleção dos ingredientes para instituição dietas restritivas, principalmente em relação as reações adversas às proteínas do alimento, porém, por ter baixo valor preditivo positivo, não pode ser usado para o diagnóstico definitivo de reação adversa alimentar.^{15,16}

Já os testes de puntura para alimentos em cães com dermatite alérgica nunca foram realizados e podem ajudar a determinar a ocorrência de uma resposta de hipersensibilidade do tipo I a alérgenos alimentares nestes.

Diante da importância dos alérgenos alimentares na sensibilização e precipitação de sinais clínicos tegumentares de doenças alérgicas em cães, mormente em cães com dermatite atópica, o objetivo deste estudo é avaliar o uso do teste de puntura no diagnóstico da sensibilização a alérgenos alimentares em cães com prurido crônico relacionado à dermatites alérgicas.

Material e Métodos

Animais

O estudo desenvolvido teve caráter experimental, longitudinal, controlado e alocação de conveniência, sendo aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), sob registro 01251 – 2ª versão.

O grupo de estudo (Grupo 1) foi composto por 34 cães, independente da raça, gênero ou idade, com hábitos predominantemente domiciliares, os quais apresentavam histórico de prurido crônico, perene, de intenso a grave, responsivo a glicocorticoides e ou a oclacitinib, principalmente nas regiões interdigital, pavilhões auriculares e condutos auditivos, abdominal, axilar,

inguinal, perioral, periocular e perianal, o qual persistia mesmo após a exclusão de dermatopatias infecto- parasitárias e controle adequado de ectoparasitos.

Foram excluídos do grupo de estudo pacientes que utilizaram corticoides e antihistamínicos, tópicos e/ou sistêmicos, por um período de 30 dias antes de sua inclusão no projeto; pacientes que tivessem piodermite superficial e ou malasseziose, ou com eritrodermia ou liquenificação que impossibilitassem à realização do teste de puntura; pacientes agressivos e/ou agitados e que possuíssem outro tipo de doença sistêmica e/ou imunodepressora; e os cães que obedeciam os critérios de inclusão, mas somente reagiram a alérgenos ambientais após a realização do teste alérgico de puntura. Cães que estavam em terapia com oclacitinib 0.4–0.6 mg/kg uma vez ao dia (Apoquel®, Zoetis; São Paulo, Brasil), tinham a medicação suspensa por no mínimo 48 horas antes da execução do teste alérgico.

Para avaliar a existência de irritabilidade das concentrações dos extratos alergênicos alimentares utilizados no trabalho, foi estabelecido um grupo controle (Grupo 2) composto por 10 cães hípidos, sem indício de lesões dermatológicas e histórico de dermatopatias progressas, independente da raça e do gênero.

Teste de Puntura

Para a realização do teste de puntura, em ambos os grupos, foram utilizadas soluções a base de salina e histamina (10 mg/mL), como controle negativo (CN) e positivo (CP), respectivamente, e extratos alergênicos ambientais e alimentares. Os extratos alergênicos ambientais testados foram *Dermatophagoides farinae* (Df), *D. pteronyssinus* (Dp), *Blomia tropicalis* (Bt), *Cynodon dactylon* (Cn), *Lolium perenne* (Lp) e *Lolium multiflorum* (Lm) contendo 10 HEP de potência (equivalente a 10.000 UBE/mL).

Os extratos alergênicos alimentares utilizados foram proteínas de origem bovina, frango, suíno, leite, ovo, pescado, trigo e soja, na concentração de 1:20 p/v (peso/volume).

Todos os extratos e controles utilizados foram manipulados pelo Laboratório Veterinary Allergenic, na concentração de 50% de glicerol e 0,45%

de fenol, para permitir sua conservação e melhor estabilidade durante sua aplicação na pele dos cães (Figura 1A).

Em seguida, cinco gotas de cada extrato era instilado em um eppendorf individual que era, subsequentemente, encaixado em uma bandeja de alérgenos, e perfeitamente ocluído com um puntor de ponta dupla *Duotip Test II*® (Lincoln Diagnostics, Decatur, EUA) para teste cutâneo, o qual permanecia com suas pontas inteiramente imersas no extrato alergênico. No intervalo entre os testes, a bandeja com os alérgenos ficava armazenada sob refrigeração entre 6 e 10°C (Figura 1 B).

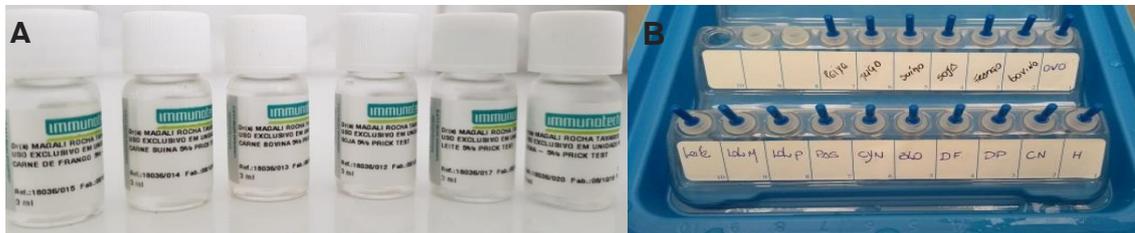


Figura 1 – A: extratos alergênicos de leite, ovo, bovino, frango, suíno, trigo, soja e peixe 1:20 p/v de concentração com 50% de glicerol e 0.45% de fenol utilizados nos testes de puntura em cães dos grupos 1 e 2. **B:** Extratos alérgicos armazenados individualmente em uma bandeja de alérgenos.

Os cães de ambos os grupos foram contidos de maneira etológica, sendo realizada tricotomia de aproximadamente 15x12 cm da região lateral torácica, higienização da área com solução fisiológica e marcação da pele com caneta dermatográfica, em pontos equidistantes de 1,5 cm (Figura 2 A). A puntura foi realizada, ao lado de cada marcação, com puntores do tipo *Duotip Test II* imersos nos alérgenos específicos a serem testados, os quais eram pressionados em um ângulo de 45 a 60° contra a superfície da pele, permitindo que uma pequena escoriação da epiderme fosse realizada, viabilizando a penetração percutânea de alérgenos (Figura 2 B). O teste de puntura de alérgenos ambientais e alimentares foi realizado simultaneamente em cada animal.

A leitura do teste foi realizada após 15 minutos da puntura, sendo possível a evidência de pápulas eritematosas (Figura 2 C), as quais foram demarcadas com caneta dermatográfica e sua mensuração (média entre o

diâmetro maior e perpendicular) realizada por meio de um paquímetro (Figura 2 D).

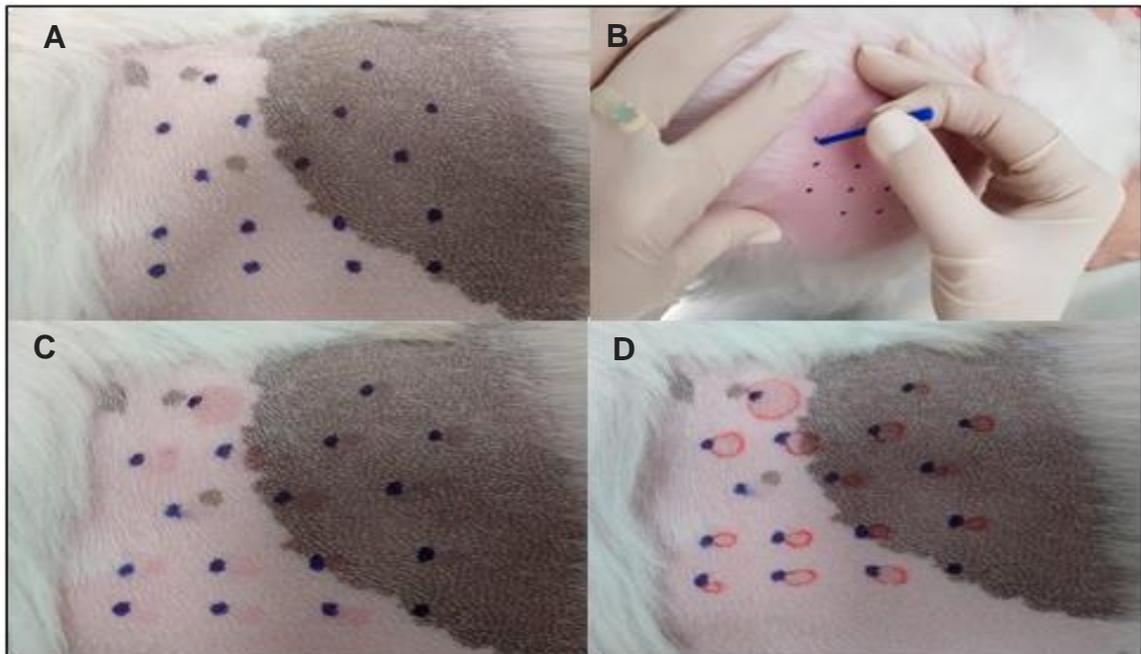


Figura 2 – **A:** Marcação da pele com caneta dermatográfica. **B:** Puntura com puntor DUOTIP Test II ® em um ângulo de 45° contra a superfície da pele. **C:** Formação das reações papulares após 15 minutos da puntura. **D:** Dermancação das reações papulares

Os animais foram considerados sensibilizados aos alérgenos testados quando o diâmetro médio da pápula era ao menos 3 mm superior ao diâmetro médio da reação papular formada pelo controle negativo.

Dieta restritiva e avaliação dos cães

Todos os cães incluídos no grupo 1 foram avaliados (Dia 0) e estabelecido seus escores lesionais pela escala de CADESI-4¹⁴, e a intensidade de prurido a partir da escala Visual de Prurido (pVAS).¹⁹

Em seguida, todos foram submetidos a uma dieta restritiva caseira, realizada a base de arroz ou batata como fonte de carboidrato, e uma fonte proteica a qual o paciente foi negativo no teste de puntura por 60 dias. Avaliações subsequentes foram realizadas nos dias 30 e 60, e julgado seus escores lesionais e de prurido conforme os critérios previamente estabelecidos.

Após 60 dias, todos cães foram desafiados por sete dias com uma dieta caseira contendo uma proteína animal ou vegetal a qual reagiu positivamente no teste de puntura e, novamente, verificado seus índices lesionais e de prurido. O

desafio era realizado apenas com uma proteína positiva, a qual era escolhida de acordo com a intensidade de reação no teste de puntura..

Animais com prurido intenso a grave que necessitassem de medicação no período da dieta restritiva foram tratados com oclacitinib 0.4–0.6 mg/kg uma vez ao dia (Apoquel®, Zoetis; São Paulo, Brasil), sendo o mesmo sempre suspenso sete dias antes (dia 23 e 53) de cada reavaliação e estabelecimento dos escores de CADESI-4 e pVAS. Nos cães cujo prurido havia apresentado melhora significativa já no dia 30, o uso do oclacitinib foi descontinuado. No período da reexposição, nenhuma medicação de controle de prurido e inflamação foi utilizada até a avaliação do paciente. Assim, o cão permanecia sem a utilização de medicação do dia 53 até a reavaliação, no dia 60, e desde o início do desafio, até a reavaliação no dia 67.

Análise estatística

Os dados epidemiológicos dos cães participantes, bem como a resposta aos testes realizados e a estimativa de sua melhora clínica, foram apresentados descritivamente em percentual, média e desvio padrão. As variáveis inclusas foram raça, idade, gênero, estado reprodutivo, idade ao início do quadro pruriginoso, reação a alérgenos ambientais ou alimentares, aspectos clínicos apresentados, diminuição no uso de medicações, da frequência de prurido ou da melhora dermatológica observada pelo proprietário.

As proporções entre animais que responderam positivamente ao teste com alérgenos ambientais, alimentares ou ambos foram comparadas usando-se o teste de comparação entre proporções, com intervalo de confiança a 95%, e $p < 0,05$.

Para análise da resposta a dieta restritiva as proteínas testadas foi utilizado o teste ANOVA de medidas repetidas, tendo como variável explanatória o tempo de exclusão dietética e nova reintrodução, e como variável de resposta os dados ordinais das escalas CADESI-4 e pVAS. No mesmo intuito, as porcentagens de animais fazendo uso de medicação foram analisadas por meio de um modelo misto generalizado. Os dados foram expressos em médias, considerando intervalo de confiança de 95% e $p < 0,05$.

Resultados

Aspectos clínicos

Dos cães do grupo 1, submetidos ao teste de puntura, cinco (20%) cães eram sem raça definida e 20 (80%) de raça específica. Destes, quatro (16%) eram da raça Lhasa Apso, três (12%) eram Shih Tzu, três (12%) eram Bulldog Francês, dois (8%) das raças Bull Terrier e Pug, um (4%) das raças Beagle, Golden Retriever, Maltês, Pastor Alemão, Border Collie, Pit Bull Terrier e Chihuahua. Desses cães, 9 (36%) eram machos e 16 (64%) eram fêmeas. A mediana de idade foi de 3 anos, sendo a idade mínima 1 ano e a idade máxima 6 anos. Em 10 cães (40%) o prurido teve início antes de 1 ano de idade, em 5 (20%) entre 1 a 2 anos de idade e nos outros 10 (40%) após os 2 anos de idade (Tabela 1). Todos os cães eram intra-domiciliados com acesso a ambiente externo frequentemente.

Em relação aos principais sinais clínicos apresentados, 21(84%) apresentavam prurido interdigital, 18(72%) prurido perioral, 17 (68%) prurido periorbital e 7 (28%) prurido perianal. Desses 25 cães, 14 cães (56%) tinham histórico ou apresentavam no momento da consulta disbiose bacteriana ou fúngica, as quais eram confirmadas através de citologia, 11 (44%) tinham otite externa bilateral, 7 (28%) tinham pele parcialmente liquenificada e 3 (12%) tinham distúrbios gastrintestinais, diarreia ou fezes amolecidas. (Tabela 1).

Em relação à raça e ao sexo dos 10 cães do grupo controle, quatro eram da raça Lhasa apso, dois eram da raça Shitzu e havia um cão das raças Chihuahua, Yorkshire, Labrador e um cão sem raça definida. A mediana de idade foi \pm 2,5 anos. Quatro cães (40%) eram machos e seis (60%) eram fêmeas, 6 (60%) eram intra-domiciliados e 4 (40%) tinham exposição a ambientes externos e ao domicílio (Tabela 1).

Tabela 1. Aspectos epidemiológicos dos cães do grupo controle e do grupo 1.

	Grupo Controle	Grupo 1
Raças	Lhasa Apso (4/10) Shih Tzu (2/10) Chihuahua (1/10) Yorkshire (1/10) Labrador (1/10) S.R.D(1/10)	Lhasa Apso (4/25) Shih Tzu (3/25) Bulldog Frances (3/25) Pug (2/25) Beagle (1/25) Border Collie (1/25) Chihuahua (1/25) Golden Retriever (1/25) Maltes (1/25) Pastor Alemão (1/25) Pit Bull (1/25)
Gênero	Femeas (6/10) Machos (4/10)	Femeas (16/25) Machos (9/25)
Idade mediana	2,5 anos	3 anos
Idade do início dos sinais clínicos	Hígidos	> 1 ano (10/25) 1 a 2 anos (5/25) > 2 anos de idade (10/25)
Sinais clínicos	Hígidos	prurido interdigital (21/25) prurido perioral (18/25) prurido periorbital (17/25) disbiose (14/25) otite (11/25) prurido perianal (7/25) pele liquenificada (7/25) distúrbios gastrintestinais (3/25)

Teste de puntura

Dos 10 cães do grupo controle submetidos ao teste de puntura, dois reagiram a uma proteína alimentar, sendo um a proteína do leite e o outro ao trigo.

Dos 34 cães submetidos inicialmente ao teste de puntura para alérgenos ambientais e alimentares, quatro (12%) reagiram apenas a alérgenos ambientais; quatro (12%) reagiram apenas a alérgenos alimentares e 26 (76%) dos cães

reagiram a alérgenos ambientais e alimentares, percentual com intervalo de confiança de 95% e $p < 0,00001$.

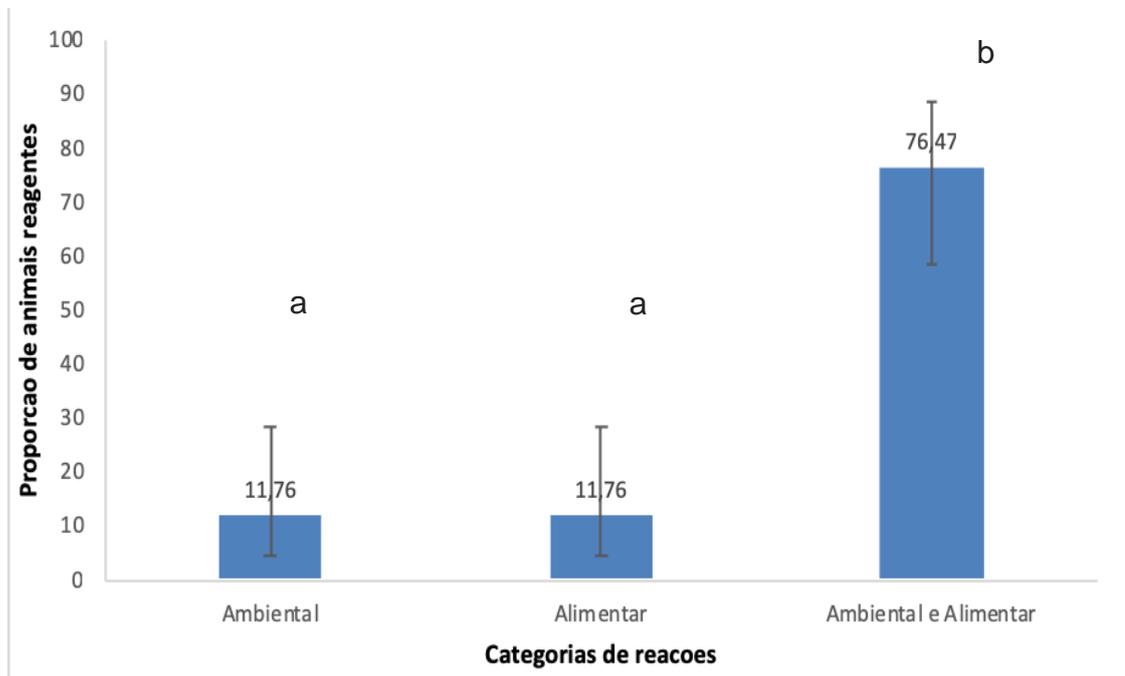


Figura 3. Proporção percentual de animais com dermatite alérgica reagentes ao teste de puntura para alérgenos ambientais e alimentares isoladamente, bem como, para alérgenos alimentares e ambientais em concomitância, apresentando-se respectivos intervalos de confiança de 95%.

* letras diferentes entre os grupos demonstram diferença estatisticamente.

Assim, dos 34 cães inicialmente avaliados, quatro foram excluídos por reagirem apenas aos alérgenos ambientais. Em adição, houve perda de mais cinco cães, dois por terem apresentado distúrbios gastrintestinais graves com introdução da dieta caseira e três devido desistência dos tutores.

Assim, permaneceram no grupo de estudo 25 cães, os quais foram submetidos à dieta restritiva caseira baseada no resultado dos testes de puntura e desafiados com a proteína reacional.

Dos 25 cães do Grupo 1 incluídos no estudo, 21 (84%) reagiram aos alérgenos ambientais e alimentares, e 04 (16%) reagiram apenas a alérgenos alimentares. Dos 21 cães que reagiram a alérgenos ambientais, 18 (72%) reagiram ao *D. pteronyssinus* (*Dp*), 14 (56%) reagiram a *Dermatophagoides farinae* (*Df*), 13 (52%) *Blomia tropicalis* (*Bt*), 13 (52%) a *Lolium perenne* (*Lp*), 12 (48%) a *Cynodon dactylon* (*Cn*) e 5 (20%) ao *Lolium multiflorum* (*Lm*).

Em relação aos alérgenos alimentares, 20 (80%) reagiram a trigo, 16 (64%) a ovo, 14 (56%) a suíno, 13 (52%) a bovino, 11 (44%) a soja, 10 (40%) a leite, 9 (36%) a peixe e 7 (28%) a frango. Desses cães, 24 (96%) reagiram a mais de um alérgeno alimentar e apenas 1 (4%) reagiu a uma única proteína alimentar, a qual foi suíno (Figura 4).

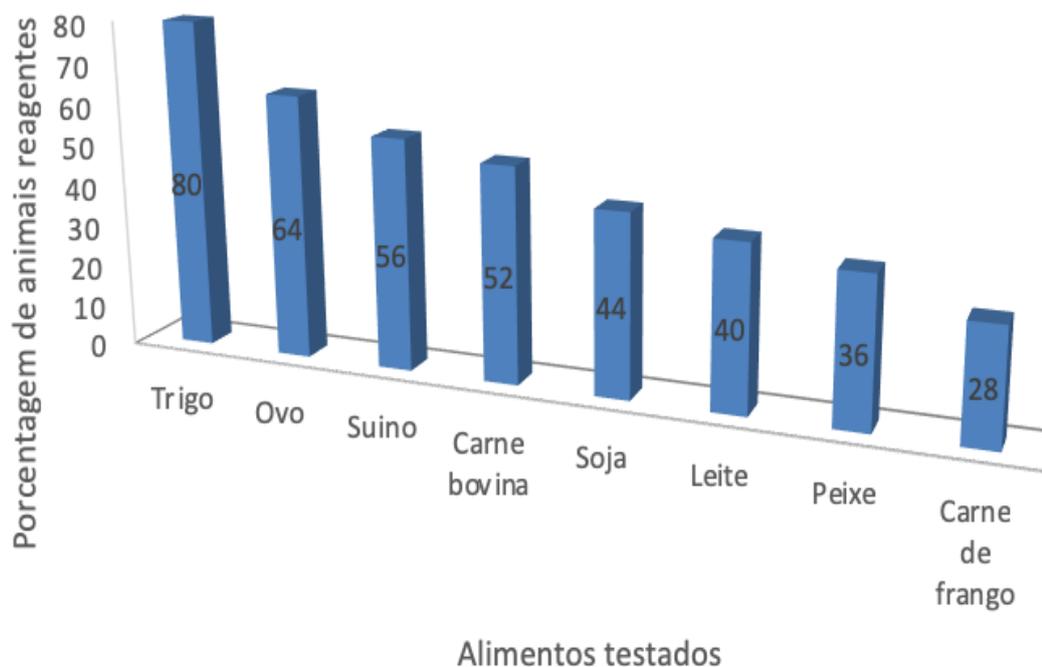


Figura 4 – Percentual de cada alérgeno alimentar aos quais os cães apresentaram reação positiva no teste de puntura.

Dieta restritiva e relação com a escala visual de prurido e CADESI-4

A média dos resultados do escore pVAS e do CADESI-4 nos dias 0, 30, 60 e após à reexposição alimentar (PRA) mostram que o estabelecimento de dieta restritiva baseada nos resultados do teste de puntura para alérgenos alimentares, com posterior reintrodução da proteína positiva no teste alérgico, mostrou diferenças significativas ao longo do tempo em relação aos parâmetros avaliados ($p=0,0001$).

Uma minimização média significativa do prurido foi observado entre os dias 0 e 30 ($p=0,0001$). Já entre os dias 30 e 60 não houve redução média significativa do prurido ($p=0,281$), porém, com a exposição à proteína positiva no teste de puntura, houve um aumento significativo da média deste, em relação aos tempos 30 e 60 ($p=0,0001$) (Figura 5A).

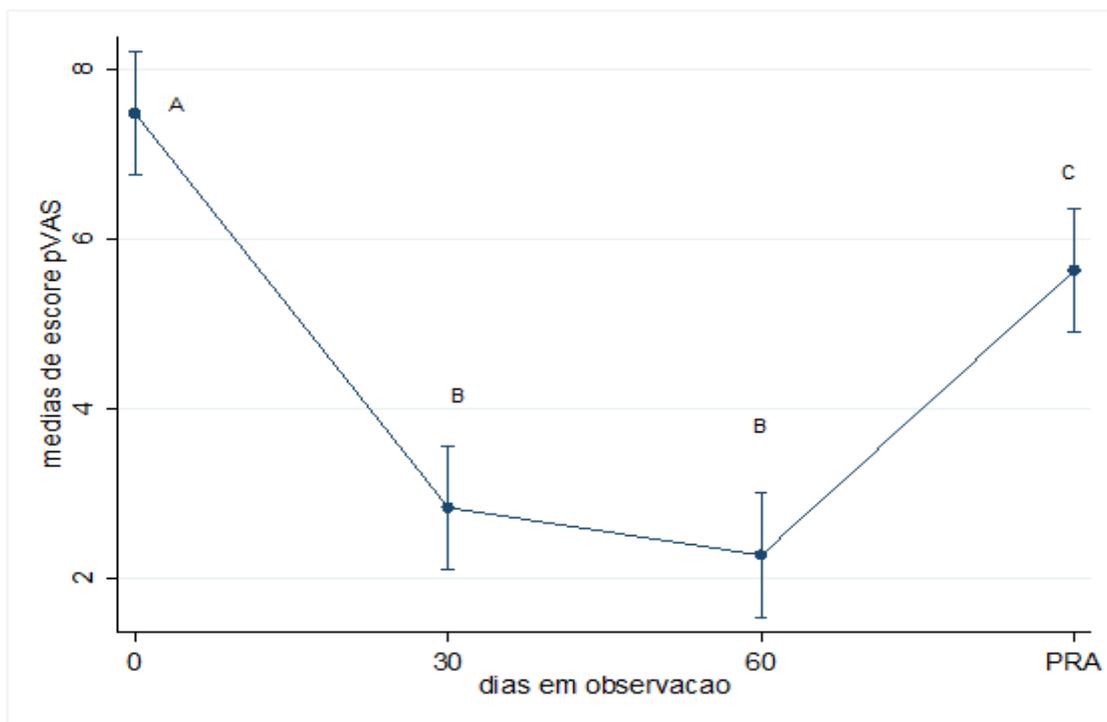


Figura 5A. Distribuição linear média do escore pVAS entre os tempos pré-exclusão alimentar (dia 0), 30 e 60 dias de exclusão alimentar, e 7 dias após reintrodução alimentar (PRA).

*Letras diferentes representam diferença estatística significativa nos resultados ($p=0,001$)

*Letras iguais representam sem diferença estatística significativa nos resultados ($p=0,281$)

Todos os cães apresentaram melhora do prurido durante o período de exclusão dietética, sendo que 4 (16%) tiveram melhora inferior a 50%, 15 (60%) dos cães apresentaram melhora entre 50 a 80% na diminuição do prurido e seis (24%) cães tiveram melhora superior a 80% do prurido (Quadro 1).

Após a reexposição, 4 (16%) não apresentaram piora significativa do prurido, 21 (84%) dos cães tiveram piora do quadro após o desafio com as proteínas que acusaram reação positiva no teste de puntura, sendo que 15 (60%) apresentaram piora entre 50 – 80%, 4 (16%) piora de mais de 80% e 2 (8%) piora entre 25 -50% do prurido (Quadro 1).

Com relação aos seis cães que tiveram melhora de mais de 80% do prurido, todos pioraram após o desafio com o alimento ao que reagiram no teste alérgico, sendo que quatro (67%) aumentaram mais de seis pontos na escala visual de prurido após à reexposição, ou seja, piora acima de 80%, e dois (33%) aumentaram em 4 - 6 pontos na escala visual de prurido, ou seja, piora entre 50-80%. Os alérgenos alimentares de carne bovina, seguido de trigo e frango foram os que desencadearam as maiores reações pruríticas após a reexposição alimentar.

Em relação às lesões, houve minimização significativa da média dos escores lesionais com a introdução da dieta restritiva entre os dias 0 e 30 ($p < 0,0001$). Entre os dias 30 e 60, não houve involução sintomato-lesional média significativa ($p = 0,655$), entretanto, houve piora dos escores médios lesionais após à reexposição à dieta ofensora ($p = 0,039$) (Figura 5B).

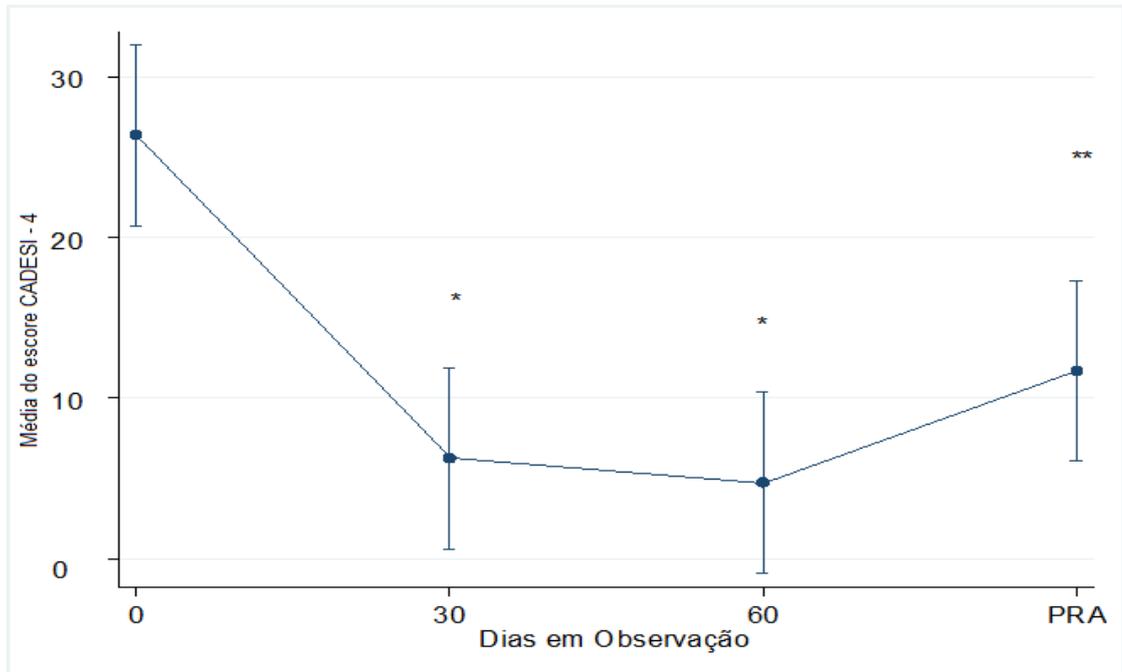


Figura 5B. Distribuição linear média do escore CADESI entre os tempos pré-exclusão alimentar (dia 0), 30 e 60 dias de exclusão alimentar, e 7 dias pós reintrodução alimentar (PRA).

*diferença significativa entre dias 0 e 30, 0 e 60 e 0 e 90 ($p = 0,0001$)

**diferença significativa entre 60 dias e PRA ($p = 0,039$)

Dieta restritiva e relação ao uso de medicação

Os cães foram acompanhados em relação à necessidade de medicação para controle do prurido nos dias 0, 30 e 60 enquanto realizavam a dieta, e observou-se que houve uma diminuição média do uso de medicação quando os cães estavam sobre a dieta restritiva baseada no teste de puntura, nos dias 30 e 60 em comparação com o dia 0 ($p = 0,0001$) (Figura 6).

No início da dieta restritiva dos 25 cães, 24 (96%) tiveram que usar oclacitinib para controle do prurido. No retorno em 30 dias foi possível descontinuar o uso da medicação em 9 (38%) animais e com 60 dias em mais 2(8%) animais.

Assim, após exclusão dietética, 13 (54%) dos 24 cães necessitavam de uso diário de oclacitinib, entretanto, em 11(46%), este era de caráter leve à moderado e em apenas 2 (8%) era de moderado à intenso.

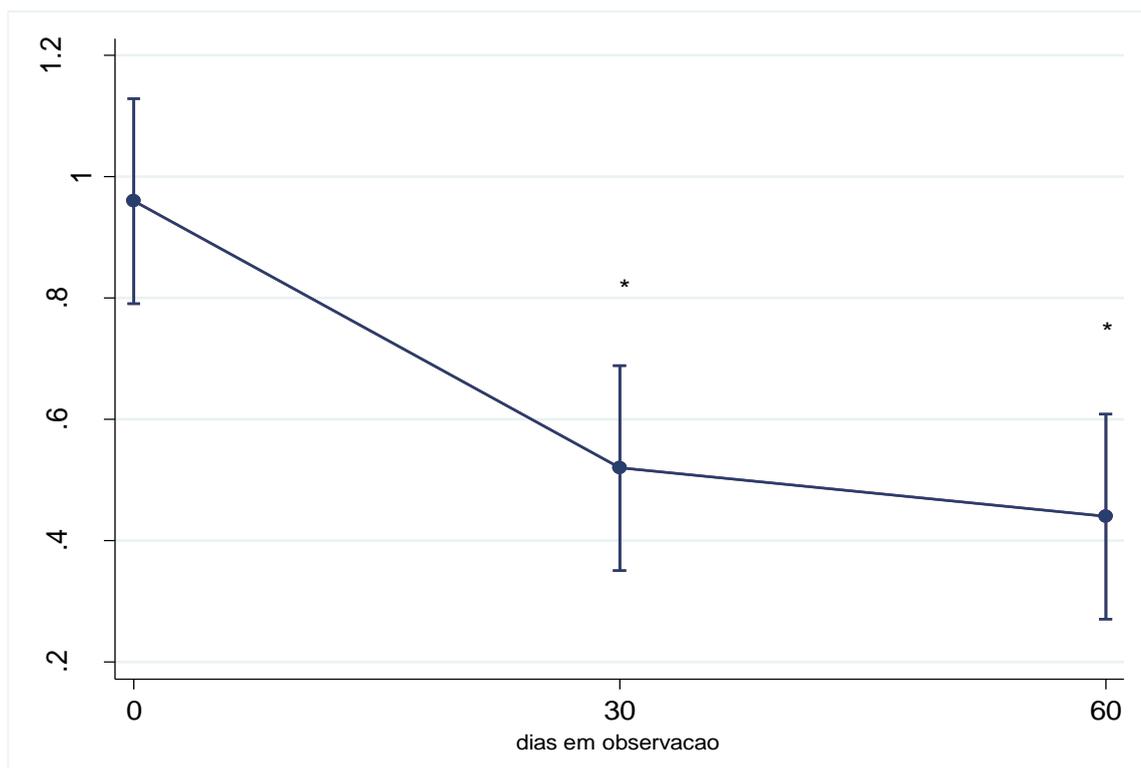


Figura 6. Distribuição linear média da porcentagem de animais em tratamento medicamento entre os tempos pré-exclusão alimentar (dia 0), 30 e 60 dias de exclusão alimentar.

*diferença significativa entre dias 0 e 30, 0 e 60 ($p=0,0001$)

Dos 11 cães que foi possível a suspensão de medicação contínua para controle do prurido todos melhoraram com a dieta e 8 (73%) tiveram aumento importante do prurido após reexposição alimentar. Dos 13 cães que necessitaram de uso regular de oclacitinib, 8 (62%) tiveram melhora significativa do prurido com a dieta e 5 (38%) pouca melhora e 12 (92%) tiveram piora do quadro após desafio dietético.

Discussão

O teste de puntura foi associado a baixo potencial irritativo, e apenas dois cães hígdos reagiram positivamente a um alérgeno testado, o que qualificou seu uso em cães com morbidades alérgicas. A positividade observada no teste de puntura pode estar relacionada a efeito irritativo da própria puntura ou pelo veículo glicerinado a 50% no qual os extratos alergênicos são conservados.^{20, 21}

Poucos cães reagiram apenas a extratos alimentares no teste de puntura, e a maioria reagiram a alérgenos alimentares e ambientais. Isto denota que a alergia alimentar isolada não é comum em cães, e que a maioria dos cães estudados tinham dermatite atópica e eram polissensibilizados, o que denota a importância da hipersensibilidade alimentar no processo de polissensibilização e sinais clínicos destes animais.^{6,12,13}

As reações positivas ao teste de puntura com extratos alimentares sugerem que cães podem apresentar uma hipersensibilidade imediata, IgE dependente a

estes, e que uma resposta Th2 a proteínas alimentares possa talvez ser responsável por reações tegumentares eritematosas e pruritogênicas.^{1,2,5}

Outro fato que faz sugerir que haja reação de hipersensibilidade do tipo I a alérgenos alimentares nos cães incluídos no presente estudo é a boa resposta ao oclacitinib, que é um inibidor seletivo da *janus kinase 1* e impede à ação de citocinas Th2, como IL4, IL13 e IL31, que participam da resposta imediata IgE dependente a alérgenos.^{23,24,25}

Os achados do presente estudo diferem dos dados observados quando a escolha do alimento para dieta restritiva é feita de forma empírica, através da anamnese, onde de 55 a 80% dos cães apresentam melhora do prurido com dieta e cerca de 30 a 55% apresentam piora deste com a exposição provocativa.^{26, 27}

Assim, o presente estudo evidencia que a escolha do alimento para dieta restritiva baseada no teste alérgico de puntura apresentou um percentual maior de melhora nos sinais clínicos em relação às escolhas empíricas, baseadas na anamnese, sendo este percentual de 84%. Também foi possível observar que mais de 70% teve piora do quadro após desafio, sendo um percentual maior de cães, o que sugere que o teste alérgico de puntura para alérgenos alimentares é útil e pode ser recomendado na seleção de dietas restritivas em cães com suspeição de alergia alimentar.

Com a dieta restritiva foi possível minimizar o uso de medicamentos regulares para o controle do prurido e naqueles cães que necessitavam de medicação contínua para o controle do quadro, quando associada dieta restritiva ao uso de maleato de oclacitinib, os cães que apresentavam prurido intenso, se mantiveram com prurido leve.

Vale ressaltar que dos quatro cães que reagiram apenas a alimentos no teste de puntura, todos apresentaram melhora significativa do prurido e das lesões após a instituição de dietas restritivas, sendo possível a suspensão do uso de medicações precocemente e, quando reexpostos, todos voltaram apresentar quadro pruriginoso significativo, o que evidencia que o teste de puntura com extratos proteicos alimentares pode ser uma ferramenta futura para diagnosticar a monossensibilização a alérgenos alimentares em cães.

Os benefícios observados com os presentes resultados podem estar relacionados às evidências de reações cruzadas entre alérgenos alimentares, como ovo e frango; leite e bovino; peixe e frango e frango e suíno, o que limita a sensibilidade no diagnóstico de alergia alimentar baseado em dietas restritivas empíricas. Assim, o estabelecimento de dietas restritivas baseadas em testes alérgicos *in vivo* pode levar ao reconhecimento precoce destas reações cruzadas e minimizar o número de diagnósticos falso negativos, o que melhoraria à acurácia da identificação da alergia alimentar em cães.^{2,17}

Aqueles cães que foram positivos no teste, mas não melhoraram com a dieta restritiva, ou não pioraram com a reexposição, demonstraram reações falso positivas, o que pode estar relacionado à reação irritativa aos extratos utilizados ou por reações cruzadas entre alérgenos alimentares e ambientais.¹⁷

Dentre os alimentos testados no presente estudo, os que apresentaram maior índice de reação foi o trigo entre as proteínas vegetais e o ovo, suíno e bovino entre as proteínas animais, respectivamente, sendo essas proteínas presentes na maioria das formulações das rações comerciais.^{2,4} Assim, à

exposição contínua a estes alimentos podem suscitar sensibilização e reações alérgicas imediatas a estes em cães.

Outro fato importante é que 60% dos pacientes estudados tiveram seus sinais clínicos antes de dois anos de idade e 40%, antes de um ano. Talvez, a sensibilização aos alérgenos alimentares em cães tenha início precoce, devido à exposição a dietas hiperproteicas e com variáveis fontes de proteínas animais. Em humanos, tem sido demonstrado que alimentos hiperosmóticos e industrializados com corantes, aromatizantes e conservantes, têm causado disbioses e diminuição da variedade microbiana intestinal, o que favorece ao crescimento de bactérias intestinais produtoras de superantígenos que estimulam uma resposta inflamatória Th2 intestinal e quebra da tolerância imunológica.^{30,31}

A hiper-reatividade da resposta Th2 associadas a alimentos pode diminuir a produção de ceramida cutânea e de peptídeos antimicrobianos, o que prejudica a barreira tegumentar, pode favorecer à infecções recorrentes e a entrada percutânea de alérgenos ambientais, como alérgenos de ácaros e poléns, conduzindo à polissensibilização, principalmente em indivíduos com dermatite atópica, que já apresentam a barreira de pele intrinsecamente prejudicada e tendência à resposta Th2.^{1,2,32,33}

Melhora significativa do prurido e dos escores lesionais foi visto em mais de 80% dos animais submetidos à dieta restritiva. Apesar de muitos cães terem realizado o uso concomitante do controle medicamentoso com a dieta restritiva, o uso deste era sempre suspenso sete dias antes da avaliação do CADESI IV e do pVAS e, desta forma, os índices de melhora não sofreram interferência medicamentosa. Ressalta-se também que 84% dos cães tiveram recorrência em mais de 50% dos índices prurido após o desafio dietético, o que permite sua associação à sensibilização a proteínas dietéticas.

Outro dado relevante é a ausência de diferença estatística de melhora entre os dias 30 e 60 de dieta restritiva, o que pode levantar a hipótese que se a dieta restritiva for estabelecida baseada no teste de puntura para alérgenos alimentares, talvez o período de 30 dias possa ser suficiente para interrupção da dieta restritiva, podendo os animais serem desafiados com as proteínas reativas no teste de forma precoce, antes de oito semanas.¹²

Em humanos, o teste de puntura para diagnóstico de alergia alimentar em indivíduos com dermatite atópica se mostrou com alta sensibilidade, mas baixa especificidade, com valores preditivo positivo de 60 a 75% e preditivo negativo de até 95%. Quando associado ao teste de contato alérgico (*atopic patch test*), a combinação dos dois testes aumentou a sensibilidade e especificidade e se mostrou útil para determinar a quais alimentos indivíduos com dermatite atópica possui alergia. Isto se deve ao fato que indivíduos com dermatite atópica podem fazer uma reação imediata IgE dependente a alérgenos alimentares, e uma reação tardia, celular mediada, a trofoalérgenos ou a aditivos da dieta.^{34,35}

Estudos futuros que avaliem a associação entre o teste de puntura e o *atopic patch test*, mormente em cães com dermatite atópica, talvez possam melhorar a sensibilidade, especificidade e os valores preditivos dos testes *in vivo*, e permitir um diagnóstico precoce de reações tegumentares adversas a alimentos.

O presente estudo permitiu concluir que o teste de puntura com extratos de proteínas alimentares é um teste rápido, viável e seus resultados podem servir de guia para o estabelecimento de protocolos de dieta restritiva em cães com

suspeição de alergia alimentar e ou dermatite atópica *latu sensu*, minimizando de forma significativa sua medicalização.

Agradecimentos:

Os autores agradecem a equipe da Clínica Veterinária da PUCPR por permitirem a realização deste estudo.

Referências

1. Rakshanda Bhagat, Amir Amin Sheikh, VS Wazir, Aditya Mishra and Uttarani Maibam. Food allergy in canines: A review. J. Entomol. Zool. Stud. 2017; 5(6): 1522-1525.
2. Pali-Schöll, I., Herrmann, I., Jensen-Jarolim, E., and Iben, C. Allergies, with Focus on Food Allergies, in Humans and Their Animals. Springer International Publishing AG 2017 . E. Jensen-Jarolim (ed.), Comparative Medicine.
3. Mueller, R., Olivry, T., Prélaud, P. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (2): common food allergen sources in dogs and cats. BMC Veterinary Research. 2016, 12:9.
4. Roudebush, P., Guilford, W.G., Jackson, H.A. Adverse reactions to food. In: Hand, M.S., Thatcher, C.D., Remillard, R.L., Roudebush, P., Novotny, B.J. (Eds.), Small Animal Clinical Nutrition, 5th ed. Mark Morris Institute, Topeka, KS, USA. 2010, pp. 609–625.
5. Mueller, R.S., Olivry, T. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (4): can we diagnose adverse food reactions in dogs and cats with in vivo or in vitro tests? BMC Vet Res. 2017, 13: 275.
6. Favrot C, Steffan J, Seewald W. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. Vet Dermatol. 2010; 21:23-31.
7. Rostaher, A., Hofer-Inteeworn, N., Kummerle-Fraune, C., Fischer, N.M., Favrot, C. Triggers, risk factors and clinico-pathological features of urticaria in dogs - a prospective observational study of 24 cases. Vet Dermatol. 2017, 28: 38-e39.
8. Cain, C.L., Bradley, C.W., 2nd, Mauldin, E.A. Clinical and histologic features of acute-onset erythroderma in dogs with gastrointestinal disease: 18 cases (2005-2015). J. Am. Vet. Med. Assoc. 2017, 251: 1439-1449.
9. Picco, F., Zini, E., Nett, C., Naegeli, C., Bigler, B., Rufenacht, S., Roosje, P., Gutzwiller, M.E., Wilhelm, S., Pfister, J., et al. A prospective study on canine

- atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Vet Dermatol.* 2008, 19: 150-
10. Pucheu-Haston, C. M., Bizikova, P., Eisenschenk, M. N. C., Santoro, D., Nuttall, T., & Marsella, R. Review: The role of antibodies, autoantigens and food allergens in canine atopic dermatitis. *Vet Dermatol.* 2015, 26(2): 115–e30.
 11. Carlotti D.N., Dip ECVD. Food Allergy in Dogs and Cats: Current Dermatological Perspectives. *European College of Vet Dermatol*, 2015.
 12. Olivry, T., Mueller, R.S., Prelaud, P. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (1): Duration of elimination diets. *BMC Vet Res.* 2015, 11:225.
 13. Proverbio D, Perego R, Spada E, Ferro E. Prevalence of adverse food reactions in 130 dogs in Italy with dermatological signs: a retrospective study. *J Small Anim Pract.* 2010;51:370–4.
 14. Olivry T, Saridomichelakis M, Nuttall T, Bensignor E, Griffin CE, Hill PB. Validation of the Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI)-4, a simplified severity scale for assessing skin lesions of atopic dermatitis in dogs. *Vet Dermatol.* 2014 Apr;25(2):77-85.
 15. Johansen, C., Mariani, C., Mueller, R.S., 2017. Evaluation of canine adverse food reactions by patch testing with single proteins, single carbohydrates and commercial foods. *Veterinary Dermatology* 28, 473-e109.
 16. Bethlehem S, Bexley J, Mueller RS., 2012. Patch testing and allergen-specific serum IgE and IgG antibodies in the diagnosis of canine adverse food reactions. *Vet Immunol Immunopathol* 145:582–589.
 17. Suto, A., Suto, Y., Onohara, N., Tomizawa, Y., Yamamoto-Sugawara, Y., Okayama, T., & Masuda, K. Food allergens inducing a lymphocyte-mediated immunological reaction in canine atopic-like dermatitis. *J Vet Sci.* 2015, 77(2), 251–254.
 18. Bernstein, I. L., Li, J. T., Bernstein, D. I., Hamilton, R., Spector, S. L., Tan, R., Sicherer, S., Golden, D. B., Khan, D. A., Nicklas, R. A., Portnoy, J. M., Blessing-Moore, J., Cox, L., Lang, D. M., Oppenheimer, J., Randolph, C. C., Schuller D. E., Tilles, S. A., Wallace, D. V., Levetin, E., Weber, R., American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, American College of Allergy, Asthma and Immunology. Allergy diagnostic testing: an updated practice parameter. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology: Official Publication of the Ann Allergy Asthma Immunol.* 2008, 100(3 Suppl 3), S1–148.
 19. Rybnicek J, Lau-Gillard PJ, Harvey R et al. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Vet Dermatol* 2009; 20: 115–122
 20. Matricoti, I., Noli, C. An open label clinical trial to evaluate the utility of a hydrolysed fish and rice starch elimination diet for the diagnosis of adverse food reactions in dogs. *Vet Dermat.* 2018.
 21. Ling, L., Ospina, M. B., Sideri, K., & Vliagoftis, H. Retrospective analysis on the agreement between skin prick test and serum food specific IgE antibody results in adults with suspected food allergy. *Allergy, Asthma & Clin Immunol.* 2016,12(1).

22. Gaschen FP, Merchant SR. Adverse food reactions in dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 2011; 41:361-379.
23. Banovic, F., Tarigo, J., Gordon, H., Barber, J. P., & Gogal, R. M. Immunomodulatory in vitro effects of oclacitinib on canine T-cell proliferation and cytokine production. *Veterinary Dermatology.* 2018.
24. Collard WT, Hummel BD, Fielder AF et al. The pharmacokinetics of oclacitinib maleate, a Janus kinase inhibitor, in the dog. *J Vet Pharmacol Ther* 2014; 37: 279–285.
25. Gonzales AJ, Bowman JW, Fici GJ et al. Oclacitinib (APOQUEL®) is a novel Janus kinase inhibitor with activity against cytokines involved in allergy. *J Vet Pharmacol Ther* 2014; 37: 317–324.
26. Salzo, P.S.; Larsson, C.E. Food hypersensitivity in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.3, p.598-605, 2009.
27. Vandresen G, Farias F.R. Efficacy of hydrolyzed soy dog food and homemade food with original protein in the control of food-induced atopic dermatitis in dogs. *Pesq. Vet. Bras.* 2018. 38(7):1389-1393.
28. Hilger C, Swiontek K, Hentges F, Donnay C, de Blay F, Pauli G: Occupational Inhalant Allergy to Pork followed by Food Allergy to Pork and Chicken: Sensitization to Hemoglobin and Serum Albumin. *Int Arch Allergy Immunol* 2010;151:173-178.
29. Martin A, Sierra MP, Gonzalez JL, et al. Identification of allergens responsible for canine cutaneous adverse food reactions to lamb, beef and cow's milk. *Vet Dermatol* 2004;15(6):349–56.
30. Chinthrajah, R. S., Hernandez, J. D., Boyd, S. D., Galli, S. J., & Nadeau, K. C. Molecular and cellular mechanisms of food allergy and food tolerance. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 2016. 137(4), 984–997.
31. Tordesillas L, Goswami R, Benede S, Grishina G, Dunkin D, Jarvinen KM, et al. Skin exposure promotes a Th2-dependent sensitization to peanut allergens. *J Clin Invest* 2014;124:4965-75.
32. Stapel SO, Asero R, Ballmer-Weber BK et al. Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report. *Allergy* 2008; 63: 793–796.
33. Veenhof E.Z., Knolb E. F. , Willemseac T. and V.P.M.G. Immune responses in dogs with cutaneous adverse food reactions Ruttencd* *Veterinary Quarterly* Vol. 32, No. 2, June 2012, 87–98.
34. Chung BY, Kim HO, Park CW, et al. Diagnostic usefulness of the serum-specific IgE, the skin prick test and the atopy patch test compared with that of the oral food challenge test. *Ann Dermatol* 2010;22(4):404–11
35. Hammond, C., & Lieberman, J. A. (2018). Unproven Diagnostic Tests for Food Allergy. *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 38(1), 153–163.
36. Johansen, C., Mariani, C., & Mueller, R. S. (2017). Evaluation of canine adverse food reactions by patch testing with single proteins, single carbohydrates and commercial foods. *Veterinary Dermatology*, 28(5), 473–e109.

CAPITULO 3

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Na rotina clínica de dermatologia veterinária, a maior casuística são as dermatopatias alérgicas, porém o diagnóstico seguido é o clínico após exclusão das demais dermatopatias pruriginosas e, na maioria das vezes, a determinação de quais alérgenos desencadeiam o quadro alérgico não é realizada. Atualmente, apenas o diagnóstico dos alérgenos ambientais através do teste intradérmico ou do teste de puntura é realizado na medicina veterinária.

O teste de puntura é utilizado como forma de diagnóstico dos alérgenos alimentares na medicina humana, podendo a partir dele iniciar uma dieta restritiva melhorando a condição clínica do paciente, porém na medicina veterinária não existem estudos sobre a eficácia deste método para triagem alimentar.

O estudo realizado demonstrou a importância de uma dieta alimentar associada ao tratamento convencional em cães com Dermatite Atópica, pois a grande maioria dos pacientes alérgicos tem o alimento como precipitador de prurido, como foi possível observar na resposta positiva a alimentos e alérgenos ambientais no teste de puntura nos cães.

O teste de puntura apresentou uma boa acurácia no diagnóstico dos alérgenos alimentares, sendo que a maioria dos animais apresentaram melhora significativa da pVAS e CADESI-4 quando submetidos a dieta restritiva baseada no teste e a piora do quadro clínico quando reexposto ao alimento alergênico, demonstrando que o teste pode ser utilizado como teste de triagem dos alérgenos alimentares para posterior escolha de uma dieta comercial ou caseira.

A possibilidade de associar dieta restritiva com uma imunoterapia alérgeno-específica baseando-se nos resultados do teste de puntura, aumentariam as chances de controle do quadro alérgico, diminuiriam as recidivas de crise e possivelmente a necessidade de terapia medicamentosa crônica, aumentando a qualidade e expectativa de vida desses pacientes.

Mais estudos em relação a eficácia do teste de puntura para alimentos em cães precisam ser realizados afim de poder se determinar a sensibilidade e especificidade e a aplicabilidade do teste na rotina clínica.

REFERÊNCIAS

- Akdis CA, Akdis M, Bieber T, Bindslev-Jensen C, Boquniewicz M, Eigenmann P, Hamid Q, Kapp A, Leung DY, Lipozencic J, Luger TA, Muraro A, Novak N, Platts-Mills TA, Rosenwasser L, Scheynius A, Simons FE, Spergel J, Turjanmaa K, Wahn U, Weidinger S, Werfel T, Zuberbier T. Diagnosis and treatment of atopic dermatitis in children and adults: European Academy of Allergology and Clinical Immunology/American Academy of Allergy, Asthma and Immunology/Practall Consensus Report. 2006; 61:969-987.
- Bates, N., Rawson-Harris, P., Edwards, N., 2015. Common questions in veterinary toxicology. *Journal of Small Animal Practice* 56, 298-306.
- Battais F., Pineau F., Popineau Y., Aparicio C., Kanny G., Guerin L., Moneret-Vautrin D. A., Denery-Papini S. Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Clinical & Experimental Allergy*. Volume 33, July 2003, Pages 962-970.
- Bethlehem S, Bexley J, Mueller RS., 2012. Patch testing and allergen-specific serum IgE and IgG antibodies in the diagnosis of canine adverse food reactions. *Veterinary Immunologic Immunopathology* 145:582–589.
- Bizikova, P., Olivry, T., 2016. A randomized, double-blinded crossover trial testing the benefit of two hydrolysed poultry-based commercial diets for dogs with spontaneous pruritic chicken allergy. *Veterinary Dermatology* 27, 289-e270.
- Bizikova P, Santoro D, Marsella R, Nuttall T, Eisenschenk MNC, Pucheu-Hastou CM. Review: Clinical and histological manifestations of canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 2013; 24: 260–e57.
- Brandt, K. G.; Sampaio, M. M. S. C.; Miuki, C. J. Importância da microflora intestinal. *Revisões e Ensaio: Pediatria*, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 117-127, 2006.
- Burks, W., James, J., Eigenmann, P., 2011. *Food Allergy*. Elsevier Health Sciences, 24pp.
- Cain, C.L., Bradley, C.W., 2nd, Mauldin, E.A., 2017. Clinical and histologic features of acute-onset erythroderma in dogs with gastrointestinal disease: 18 cases (2005-2015). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 251, 1439-1449.
- Carlotti DN, Dip ECVD.(2018) Food Allergy in Dogs and Cats: Current Dermatological Perspectives. *European College of Veterinary Dermatology*. <http://www.ddlzagreb.hr/wpcontent/uploads/2015/06/food-allergy-indogs-and-cats.pdf>.
- Cave, N.J., 2006. Hydrolyzed protein diets for dogs and cats. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 36, 1251–1268.

- Čelakovská J., Ettlerová K., Ettler K., JVaněčková J. & Bukač J. 2015. Evaluation of food allergy to wheat, cow milk, egg, soy and peanuts in patients suffering from atopic dermatitis, *Food and Agricultural Immunology*, 26:1, 26-37.
- Chehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal Allergy Clin Immunology* 2005;115(1):3–12 [quiz: 13].
- Cocco R. R. , Camelo-Nunes I. C. , Pastorino A. C. , Silva L. , Roselka R S. S. , Rosário Filho N.A. , Solé D. Abordagem laboratorial no diagnóstico da alergia alimentar. *Rev Paul Pediatr.* 2007;25(3):258-65
- Deng, Y., Misselwitz, B., Dai, N., Fox, M., 2015. Lactose intolerance in adults: Biological mechanism and dietary management. *Nutrients* 7, 8020-8035.
- Favrot C, Steffan J, Seewald W, Picco F., 2010. A prospective study on the clinical features of chronic canine atopic dermatitis and its diagnosis. *Veterinary Dermatology* 21(1):23–31.
- Gaschen FP, Merchant SR. Adverse food reactions in dogs and cats. *Veterinary Clinical North American Small Animal Practice.* 2011; 41:361-379.
- Gershwin LJ (2015) Comparative immunology of allergic responses. *Annu Rev Anim Biosci* 3:327–346.
- Hagen-Plantinga, E. A., Leistra, M. H. G., Sinke, J. D., Vroom, M. W., Savelkoul, H. F. J., & Hendriks, W. H. (2017). Measurement of allergen-specific IgG in serum is of limited value for the management of dogs diagnosed with cutaneous adverse food reactions. *The Veterinary Journal*, 220, 111–116.
- Hardy, J.I., Hendricks, A., Loeffler, A., Chang, Y.M., Verheyen, K.L., Garden, O.A., Bond, R., 2014. Food-specific serum IgE and IgG reactivity in dogs with and without skin disease: Lack of correlation between laboratories. *Veterinary Dermatology* 25, 447–470.
- Hensel, P., Santoro, D., Favrot, C., Hill, P., Griffin, C., 2015. Canine atopic dermatitis: Detailed guidelines for diagnosis and allergen identification. *BMC Veterinary Research* 11, 196.
- Hill DJ, Heine RG, Hosking CS. The diagnostic value of skin prick testing in children with food allergy. *PediatrAllergyImmunol*, 2004;15:435–44.
- Horvath-Ungerboeck, C., Widmann, K., Handl, S., 2017. Detection of DNA from undeclared animal species in commercial elimination diets for dogs using PCR. *Veterinary Dermatology* 28, 373-e386.
- Ishida, R., Kurata, K., Masuda, K., Ohno, K., Tsujimoto, H., 2012. Lymphocyte blastogenic responses to food antigens in cats showing clinical symptoms of food hypersensitivity. *Journal of Veterinary Medical Science* 74, 821-825.

- Jeffers G, Shanley KJ, et al. Diagnostic testing of dogs for food hypersensitivity. *J Amer Vet Med Assn* 1991; 198:245-250.
- Johansen, C., Mariani, C., Mueller, R.S., 2017. Evaluation of canine adverse food reactions by patch testing with single proteins, single carbohydrates and commercial foods. *Veterinary Dermatology* 28, 473-e109.
- Kang MH, Kim HJ, Jang HJ, Park HM (2014) Sensitization rates of causative allergens for dogs with atopic dermatitis: detection of canine allergen-specific IgE. *Journal of Veterinary Sciences* 15(4):545–550.
- Kawano, K., Oumi, K., Ashida, Y., Horiuchi, Y., & Mizuno, T. (2013). The prevalence of dogs with lymphocyte proliferative responses to food allergens in canine allergic dermatitis. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 16(4), 735–739.
- Kuehn A., Codreanu-Morel F., Lehnert-Weber C., Doyen V., Gomez-André S. A., Bienvenu F., Fischer J., Ballardini N., Hage M – van., Perotin J., Silcret-Grieu S., Chabane H., Hentges F., Ollert M., Hilger C., Morisset M.. Cross-reactivity to fish and chicken meat – a new clinical syndrome. *Allergy European Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Volume 71, Issue 12, December 2016 Pages 1772-1781.
- Kunkle GA, Horner S. Validity of skin testing of diagnosis of food allergy in dogs. *J Amer Vet Med Assn* 1992; 200:677-680.
- Lieberman, J. A., & Sicherer, S. H. (2010). Diagnosis of Food Allergy: Epicutaneous Skin Tests, In Vitro Tests, and Oral Food Challenge. *Current Allergy and Asthma Reports*, 11(1), 58–64.
- Ling, L., Ospina, M. B., Sideri, K., & Vliagoftis, H., 2016. Retrospective analysis on the agreement between skin prick test and serum food specific IgE antibody results in adults with suspected food allergy. *Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 12(1).
- Loeffler A, Soares-Magalhaes R, Bond R, Lloyd D. A retrospective analysis of case series using home-prepared and chicken hydrolysate diets in the diagnosis of adverse food reactions in 181 pruritic dogs. *Veterinary Dermatology* 2006; 17; 273-279.
- Marietta EV, David CS, Murray JA., 2011. Important lessons derived from animal models of celiac disease. *Int Rev Immunol* 30(4):197–206.
- Martin A, Sierra MP, Gonzalez JL, et al. Identification of allergens responsible for canine cutaneous adverse food reactions to lamb, beef and cow's milk. *Veterinary Dermatology* 2004;15(6):349–56.
- Moreira, L. F. Estudo dos componentes nutricionais e Imunológicos na perda de peso em Camundongos com alergia alimentar. 2006. Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- Mueller, R. S., & Unterer, S., 2018. Adverse food reactions: Pathogenesis, clinical signs, diagnosis and alternatives to elimination diets. *The Veterinary Journal*, 236, 89–95.
- Mueller, R.S., Olivry, T., 2017. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (4): can we diagnose adverse food reactions in dogs and cats with in vivo or in vitro tests? *BioMed Central Veterinary Research* 13, 275.
- Mueller RS, Olivry T, Prélaud P. 2016. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (2): common food allergen sources in dogs and cats. *BioMed Central Veterinary Research* 12(1):9.
- Mueller RS, Jackson H. Atopy and adverse food reaction. In: Foster AP, Foil CS, editors. *BSAVA Manual of Small Animal Dermatology*. 2nd ed. Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association; 2003. pp. 125–136
- Olivry, T., Mueller, R.S., Prélaud, P., 2015. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (1): Duration of elimination diets. *BioMed Central Veterinary Research* 11, 225.
- Olivry, T., De Boer, D.J., Favrot, C., Jackson, H.A., Mueller, R.S., Nuttall, T., Prélaud, P., 2010a. Treatment of canine atopic dermatitis: 2010 clinical practice guidelines from the International Task Force on Canine Atopic Dermatitis. *Veterinary Dermatology* 21, 233–248.
- Olivry, T., Mueller, R.S., Prélaud, P., 2015. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (1): Duration of elimination diets. *BioMed Central Veterinary Research* 11, 225.
- Pali-Schöll .I, Herrmann I., Jensen-Jarolim E., and Iben C. Allergies, with Focus on Food Allergies, in Humans and Their Animals. Springer International Publishing AG 2017 . E. Jensen-Jarolim (ed.), *Comparative Medicine*.
- Parr, J.M., Remillard, R.L., 2014. Common confounders of dietary elimination trials contain the antigens soy, pork, and beef. *Journal of the American Animal Hospital Association* 50, 298-304.
- Picco, F., Zini, E., Nett, C., Naegeli, C., Bigler, B., Rufenacht, S., Roosje, P., Gutzwiller, M.E., Wilhelm, S., Pfister, J., et al., 2008. A prospective study on canine atopic dermatitis and food-induced allergic dermatitis in Switzerland. *Veterinary Dermatology* 19, 150-155.
- Pomeroy BS. Allergy and allergic reactions in the dog. *Cornell Vet* 1934; 24:335-341.
- Proverbio D, Perego R, Spada E, Ferro E. Prevalence of adverse food reactions in 130 dogs in Italy with dermatological signs: a retrospective study. *Jornaul Small Animal Pract.* 2010;51:370–4.

- Pucheu-Haston, C. M., Bizikova, P., Eisenschenk, M. N. C., Santoro, D., Nuttall, T., & Marsella, R. (2015). Review: The role of antibodies, autoantigens and food allergens in canine atopic dermatitis. *Veterinary Dermatology*, 26(2), 115–e30.
- Rakshanda B., Amir A. S., Wazir V.S., Aditya M., and Uttarani M. Food allergy in canines: A review. *Journal of Entomology and Zoology Studies* 2017; 5(6): 1522-1525.
- Restani, P.; Ballabio, C.; Tripodi, S.; Fiocchi, A. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology: June 2009 – Volume 9 - Issue 3 - p 265–269.
- Rybnicek J, Lau-Gillard PJ, Harvey R et al. Further validation of a pruritus severity scale for use in dogs. *Veterinary Dermatology* 2009; 20: 115–122
- Ricci R, Granato A, Vascellari M et al. Identification of undeclared sources of animal origin in canine dry foods used in dietary elimination trials. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2013; 97: 32–38.
- Ricci, R., Hammerberg, B., Paps, J., Contiero, B., & Jackson, H., 2010. A comparison of the clinical manifestations of feeding whole and hydrolysed chicken to dogs with hypersensitivity to the native protein. *Veterinary Dermatology*. 2010; 21: 358-66.
- Rostaher, A., Fischer, N.M., Kummerle-Fraune, C., Couturier, N., Jacquenet, S., Favrot, C., 2017. Probable walnut-induced anaphylactic reaction in a dog. *Veterinary Dermatology* 28, 251-e266.
- Roudebush, P., Guilford, W.G., Jackson, H.A., 2010. Adverse reactions to food. In: Hand, M.S., Thatcher, C.D., Remillard, R.L., Roudebush, P., Novotny, B.J. (Eds.), *Small Animal Clinical Nutrition*, 5th ed. Mark Morris Institute, Topeka, KS, USA, pp. 609–625.
- Salzo, P.S.; Larsson, C.E. Food hypersensitivity in dogs. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.61, n.3, p.598-605, 2009.
- Schou Nielsen, J., Meteran, H., Ulrik, C. S., Porsbjerg, C., & Backer, V. (2017). Natural history of skin prick test reactivity. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 119(2), 184–188.e1.
- Shimakura, H., Uchiyama, J., Saito, T., Miyaji, K., Fujimura, M., Masuda, K., Sakaguchi, M. (2016). IgE reactivity to hen egg white allergens in dogs with cutaneous adverse food reactions. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 177, 52–57.
- Stapel SO, Asero R, Ballmer-Weber BK et al. Testing for IgG4 against foods is not recommended as a diagnostic tool: EAACI Task Force Report. *Allergy* 2008; 63: 793–796.

- Soldera K., Martininghi B. B., Oliveira A. S., Dias C. P., Pitrez P. M., Roncada C. Teste cutâneo em doenças alérgicas: uma revisão sistemática. *Sci Med.* 2015;25(1):78-87.
- Stokes C, Waly N. Mucosal defence along the gastrointestinal tract of cats and dogs. *Veterinary Res* 2006;37(3):281–93.
- Suto, A., Suto, Y., Onohara, N., Tomizawa, Y., Yamamoto-Sugawara, Y., Okayama, T., & Masuda, K., 2015. Food allergens inducing a lymphocyte-mediated immunological reaction in canine atopic-like dermatitis. *Journal of Veterinary Medical Science*, 77(2), 251–254.
- Tham. E. H. and Leung, D. Y. M. Mechanisms by Which Atopic Dermatitis Predisposes to Food Allergy and the Atopic March. *Allergy Asthma Immunol Res.* 2018;10:e24. English. Published online Aug 30, 2018.
- Taylor S.L., Remington B.C., Panda R., Goodman E. R., Baumert J. L. Detection and control of soybeans as a food allergen. *Handbook of Food Allergen Detection and Control.* Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. 2015, Pages 341-366.
- Tsakok, T., Marrs, T., Mohsin, M., Baron, S., du Toit, G., Till, S., & Flohr, C. (2017). Does atopic dermatitis cause food allergy? A systematic review. *The Lancet*, 389, S95.
- Vandresen G, Farias F.R. Efficacy of hydrolyzed soy dog food and homemade food with original protein in the control of food-induced atopic dermatitis in dogs. *Pesq. Vet. Bras.* 2018. 38(7):1389-1393.
- Veenhof E.Z., Knolb E. F. , Willemseac T. and V.P.M.G. Immune responses in dogs with cutaneous adverse food reactions Ruttencd* *Veterinary Quarterly* Vol. 32, No. 2, June 2012, 87–98.
- Verlinden, A., Hesta, M., Millet, S., Janssens, G.P.J., 2006. Food allergy in dogs and cats: A review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 46, 259–273.
- Zimmer, A., Bexley, J., Halliwell, R. E. W., & Mueller, R. S. (2011). Food allergen-specific serum IgG and IgE before and after elimination diets in allergic dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 144(3-4), 442–447.
- Walker, M. T., Green, J. E., Ferrie, R. P., Queener, A. M., Kaplan, M. H., & Cook-Mills, J. M. (2018). Mechanism for initiation of food allergy: Dependence on skin barrier mutations and environmental allergen costimulation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 141(5), 1711–1725.e9.
- Warford, S., Lew, D., Michael, C., & Lieberman, J. (2016). Skin Puncture Test Response Is Not Altered By Season of Testing. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 137(2), AB163.

ANEXO A

Normas para a submissão do artigo na Veterinary Dermatology

Title Page

The title of the article should be concise but informative. Drug trade names will not be included in the title. The first name, middle initial(s), and last name of each author must be given. Professional affiliations of the authors at the time of the study should be indicated using the symbols *, †, ‡, §, ¶, then **, †† etc., in this order; these are not superscripts. Titles (e.g. professor) and qualifications (e.g. DipACVD) are not required.

Please provide full address details for all of the authors. If an author's affiliation has changed since the study was performed, the author's new affiliation should be identified. The name of the corresponding author, any conflicts of interest and sources of funding (see section 2.5) should be stated. If information in the text has been presented at a scientific meeting, this should be indicated. A short running title of no more than 40 characters (counting letters and spaces) should also be included. The short running title will be used in the journal at the top of the page, see current publications. Keywords are NOT required.

Abstract

The abstract should be no more than 250 words and must be constructed using the subheadings given below. While this format is most appropriate for scientific studies, the authors of reviews, brief communications and case reports are encouraged to also provide a structured abstract using the following:

- Background – A brief explanation of why the study was performed.
- Hypothesis/Objectives – A statement of the principal hypothesis tested in the study, a brief statement of the major objectives, or both.
- Animals – A concise description of the number of animals used in the study including the population from which they were drawn (e.g. research colony, hospital population) and any special characteristics of the animals (e.g. disease status).
- Methods – A statement of overall study design (e.g. randomized, blinded, placebo-controlled clinical trial; retrospective study) and principal interventions or methods.
- Results – Concise statement of important results including numerical description of critical variables and statement of statistical significance.
- Conclusions and clinical importance – A summary of conclusions based on results of the study and statement of clinical importance of these conclusions. The results should not be restated.

Materials and Methods

These should be described in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. References for study design and statistical methods should be to standard works (with pages stated) when possible rather than to papers where designs or methods were originally reported. Specify any statistics computer programs used. Report losses to observation (such as dropouts from a clinical trial).

The methods of data collection and use of statistical analysis will be checked by the referees, editors and, if necessary, a statistician. It is highly recommended that

authors consult a professional statistician for advice on complex statistical analyses. It is also recommended that authors provide details of which statistical methods and the *P*-value, if relevant, have been used for each component of the data set (e.g. $P = 0.08$; ANOVA).

Drugs and therapeutic agents should be given in the format: drug ingredient (trade name; manufacturer name, city, (state), country), e.g. fenbendazole (Panacur; Intervet-Schering Plough, Milton Keynes, UK). Drug names should follow the recommended International Non-Proprietary Names (rINN). Common examples include cefalexin, ciclosporin, meticillin and rifampicin.

Products such as equipment or methods should be given as: Product name (Company name; town or city, (state) and country); e.g. Datex CD 200-02 (Datex; Hatfield, UK); or SuperScript[®] III First-Strand Synthesis kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The detailed information about drugs, therapeutic agents and products need only be given once.

Results

Present your results in a logical sequence in the text, tables and illustrations. Do not repeat in the text data in the tables or illustrations. In manuscripts describing more than one animal, all animals should be assigned a case number.

Discussion

The discussion should emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Include the implications of the findings and their limitations, including implications for future research. Relate the observations to other relevant studies. Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not completely supported by your data. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly indicate them as such.

Recommendations , when appropriate, may be included.

Acknowledgements (should be made on the title page or as a separate supplementary file and not included on the manuscript). These are to indicate support, advice or technical help that does not justify authorship. Please use first and second (family) names, e.g. The authors would like to thank Fred Flintstone for assistance with statistical analysis.

Funding sources should be included in the declared sources of funding (see section 2.5).

Language and style. The language of publication is English. Authors for whom English is a second language must have their manuscript thoroughly, and preferably professionally, edited by an English speaking person before submission to make sure that the English is of high quality. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp . All services are paid for and arranged by the author; use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

5.2. Units, Abbreviations and Nomenclature. All units of measurement must follow the SI system. Concentrations of solutions should be given as molar concentrations (e.g. mmol/L). All other concentrations should be expressed as percentages. Drug dosages should be given as: e.g. mg/kg; $\mu\text{g}/\text{kg}$; also use 'once daily', 'twice daily' etc. Spell out numbers one to nine, keep 10 onwards as

numerals. However, use Arabic numerals for numbers used with units of measure (e.g. 9 kg, 5 h, 10 mmol/L). Use h, min, s, for hour, minute, second, respectively. Abbreviations of biological, medical, chemical and other terms should be used only when such abbreviations are both internationally recognized and unambiguous. The first use of an abbreviation must be explained by also giving the unabbreviated term.

All biological, medical, chemical and other names should be given in keeping with the latest international nomenclature. If an animal or micro-organism is being mentioned in the text for the first time, the binomial name should be given, e.g. carp (*Cyprinus carpio*). Thereafter, this can be abbreviated to *C. carpio*. Please check recent articles for information about the spelling of dog and cat breeds.

5.3. Figures (illustrations): Graphs, Tables, Clinical Photographs and Photomicrographs. Figure legends must be given at the end of the manuscript. Sufficient information should be included to allow the figure to be understood without reference to the text. Authors wishing to use any previously published figures must submit written permission from the copyright holder. Figure legends should be written in the following style:

1. Organ or tissue; animal identification, Case No. A sentence describing the change that is visible in the print. (For photomicrographs add: staining method with names of stains and counter stains and magnification, e.g. avidin–biotin–peroxidase complex method, Mayer's Haematoxylin counter stain, x40).
2. Graph or Table: statement of how data is expressed. Identification of symbols in table, graph, or photo: e.g. N, nucleus.

Examples:

1. Photomicrograph: Intra-epidermal, intact sub-corneal pustule showing small numbers of acantholytic cells and numerous neutrophils. H&E.
2. Table: Comparison of eosinophil counts over time between the control and treatment groups. Error bars indicate the mean \pm SD.

5.3.1. Graphs. To ensure high-quality reproduction, symbols should be clear and even throughout and of sufficient size, that when reduced for publication, each item will still be legible. Graph axes should be labelled in sans serif (Helvetica or Arial) font. Letters, Numbers and Titles belong in the legends for illustrations, not on the illustrations themselves.

Software programmes such as GraphPad can be used to download graphs into a word document for submission as an image/figure file.

5.3.2. Tables should be limited to those containing data important to understanding and interpreting results and reducing or clarifying the text. Tables may be included within the word file containing the main text, placed after the figure legends; alternatively, large tables should be submitted as separate table files (e.g. in Word or Excel). Number tables consecutively in the order of the first citation in the text and supply a brief title for each. Give each column a short or abbreviated heading. Place explanatory material in footnotes, not in the heading. Explain in the footnotes all non-standard abbreviations that are used in each table. Identify statistical measures of variations such as standard deviation. Ensure that each table is cited in the text. If you use data from another published or unpublished source, obtain written permission and acknowledge fully.

5.3.3. Figures; Clinical Photographs & Photomicrographs (histopathology) Such figures should be ideally be originally captured and submitted in a neutral data

format such as TIFF or EPS. There is no requirement to convert an original uncompressed JPEG file to TIFF or EPS format. (JPEG format will be accommodated but must fulfil the format criteria given below and should be uncompressed). PowerPoint, PDFs and Word graphics are usually unsuitable for reproduction.

Figures should have a minimum resolution of 300 dpi; grey tone and line drawings require 600–1200 dpi. Photographic material should be of such quality that high-contrast reproductions can be made. Poor-quality images may be removed from a manuscript and where critical to the content may lead to rejection of a manuscript. Graphics created in the CMYK colour palette (print colours) are preferable to those created in RGB (screen colours) to maximize the consistency of print reproduction. Images supplied in RGB will be converted to CMYK for printing; this may lead to some variations in colour representation. Immunofluorescence images may be submitted in RGB.

When symbols, arrows, numbers or letters are used to identify parts of the illustrations, identify and explain each one clearly in the legend. Clinical and histopathology (photomicrograph) figures must be no more than 19 cm in width and must be submitted at a resolution of 300 dpi. Limit figures to those that reduce or clarify the text. These should be free of extraneous material and, where possible, if portions of the handler such as fingers or hands are to be included, particularly adjacent to lesions, they should be gloved.

Montage (composite plates) figures are allowed and should have no tooling (space bars) to separate the individual images. Each part should be labelled in the top left-hand corner in black, (or if appropriate for clarity in white) in Arial, in lower case, with no brackets, starting with a, b, c, etc.

5.3.3.1 Photomicrographs. The microscope must be set up for Koehler illumination, so that the light is evenly dispersed in the image.

The epidermis should be at the top of the image and horizontal; the background above the epidermis should be bright and white.

Authors are not obliged to use length or scale bars, reviewers/editors may recommend their use because it is deemed to be critical to the understanding of photomicrograph; they are required for electron micrograph images. Magnification (scale) bars should be black, approximately 1 cm long and placed in the lower right corner, 5 mm above the lower margin and with the right end 5 mm from the right margin. The overall magnification can be specified as, for example, (x40) where $x_{10} \text{ eye lens} \times x_4 \text{ lens} = x_{40} \text{ overall}$.

For more information about the preparation of images please see the guidelines as attached here . While these guidelines were written some time ago and technology has moved on the general principles are still applicable. Please ensure that individual figures files are no larger than 5 MB. If your file is substantially bigger than this, please contact the Editorial Office: VDEedoffice@wiley.com; to discuss file saving and submission options.

5.4. References. (Please note that EndNote™ and Refman™ software for the Journal of the American Veterinary Medical Association can be used for Veterinary Dermatology; please adapt to Vancouver style).

5. Supporting Information. Supporting information, such as data sets, additional figures, tables, video or audio files that will not be published in the print edition of the journal, but will be available via the online edition, may be submitted. Supporting

information must be important ancillary information that is relevant to the parent article but which does not or cannot appear in the printed edition of the Journal. Supporting information will be published as submitted, and will not be corrected or checked for scientific content, typographical errors or functionality. Supporting information should be uploaded at the time of manuscript submission using the file designation 'Supporting information'. It should be clearly stated at the time of submission that the Supporting Information is intended to be made available through the online edition. The content of the Supporting information must not be altered after the paper has been accepted for publication. Authors should note that the publishers will not be held responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) will be directed to the corresponding author of the article. The availability of Supporting information should be indicated in the main manuscript by a paragraph, to appear after the References, headed "Supporting information" and providing titles of figures, tables etc. In order to protect reviewer anonymity, material posted on the author's website cannot be reviewed.

5.6. Animal Experiments. Animal experiments are to be undertaken only with the purpose of advancing knowledge and in a manner that avoids unnecessary discomfort to the animals by the use of proper management and laboratory techniques. They shall be conducted in compliance with federal, state and local laws and regulations, and in accordance with the internationally accepted principles and guidelines for the care and use of agricultural, laboratory or experimental animals. In the interests of the reproducibility of results, accurate information about any test animals used in the experiments (origin, inbreeding etc.), as well as information about the housing conditions (diet, environment etc.), should be given. For further information and guidance on how to report on animal experiments see: ARRIVE guidelines for reporting animal research

6. AFTER ACCEPTANCE

Upon acceptance of a paper for publication, the manuscript will be forwarded to the Production Editor who is responsible for the production of the journal.

6.1 Proof Corrections. The corresponding author will receive an e-mail alert containing a link to a website. A working e-mail address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site; the file should be opened, read on screen, and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no e-mail address is available; in your absence, please arrange for a colleague to access your e-mail to retrieve the proofs. Proofs must be returned to the Production Editor within one week of receipt.

ANEXO B

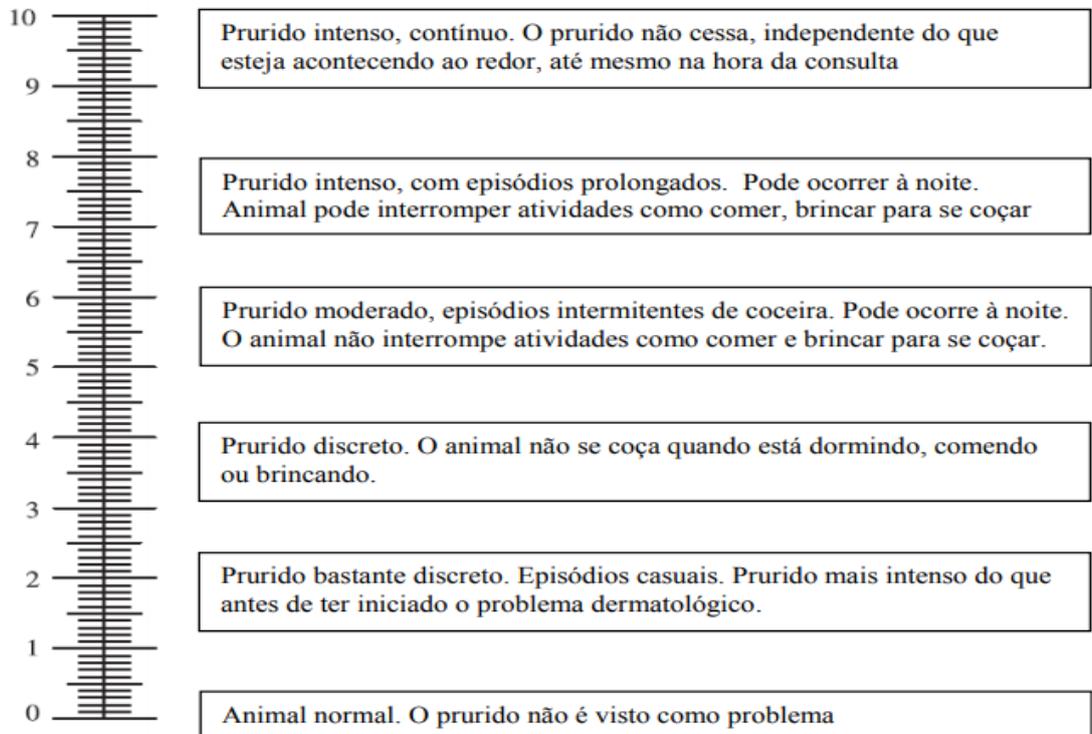
Ficha de avaliação para mensuração da extensão e severidade das lesões dermatológicas na dermatite atópica canina com índice CADESI – 4.

CADESI-4 (ICADA)		Eritema	Liquenificação	Escoriações e/ou Alopecia	TOTAL
Área Perilabial*		1			
Pina Medial (parte côncava da pina)	Esquerda	2			
	Direita	3			
Axilas	Esquerda	4			
	Direita	5			
Membros torácicos**	Esquerda	6			
	Direita	7			
Membros Pélvicos**	Esquerda	8			
	Direita	9			
Flexura anticubital	Esquerda	10			
	Direita	11			
Flexura carpiana***	Esquerda	12			
	Direita	13			
Flanco	Esquerda	14			
	Direita	15			
Áreas Inguinais(virilha)	Esquerda	16			
	Direita	17			
Abdômen		18			
Períneo(da vulva/escroto ao ânus)		19			
Cauda Ventral (proximal)		20			
Grau de cada local e cada tipo de lesão: <i>negativo (0); discreto (1); moderado (2); acentuado (3).</i>			TOTAL de Pontuação (20 x 3 x 3 = 180)		

** esquerda e direita combinadas; **lados dorsal e palmar combinados; ***dos coxins cárpicos ao metacárpico*

ANEXO C

Escala Visual de Prurido



Fonte: Adaptado de RYBNICEK et al, 2009

ANEXO D

Parecer de Aprovação do CEUA

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 01251 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: COMPARAÇÃO ENTRE TESTE DE PUNTURA E TESTE DE CONTATO NO DIAGNOSTICO DE TROFOALÉRGENOS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA INDUZIDA POR ALIMENTO

AVALIAÇÃO DO TESTE DE PUNTURA NO DIAGNOSTICO DE TROFOALÉRGENOS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA INDUZIDA POR ALIMENTO

AVALIAÇÃO DO TESTE DE CONTATO PARA DISGNOSTICO DE HIPERSENSIBILIDADE A TROFOALÉRGENOS EM CÃES COM DERMATITE ATÓPICA

PESQUISADOR RESPONSÁVEL

MARCONI RODRIGUES DE FARIAS

EQUIPE DE PESQUISA

CAMILLA OLIVEIRA ROSA ALCALÁ, JULIANE POSSEBOM DE OLIVEIRA, GABRIELA RIBEIRO RODRIGUES

INSTITUIÇÃO

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CURSO

Escola Ciências da Vida – Medicina Veterinária

VIGÊNCIA DO PROJETO	08/2018 a 12/2019	QUANTIDADE DE ANIMAIS	40
ESPECIE/LINHAGEM	<i>Canis lupus familiaris</i>	Nº SISBIO (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
SEXO	Variável	ATIVIDADES (Somente animais de vida livre)	Não se aplica
IDADE / PESO	Variável	ESPECIE – GRUPO TAXONÔMICOS (de vida livre)	Não se aplica
ORIGEM DO ANIMAL	CVE PUCPR	LOCAL (IS) (Somente animais de vida livre)	Não se aplica

O colegiado da CEUA certifica que este protocolo que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794/2018 e Decreto nº 6.899/2009, e com as normas editadas pelo CONCEA e foi **APROVADO** pela CEUA - PUCPR em reunião de colegiado. Se houver mudança do protocolo o pesquisador deve enviar um relatório à CEUA descrevendo de forma clara e sucinta, a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciar antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por esta CEUA em qualquer tempo.

Atenciosamente,
Prof. Dr. Sérgio Luiz Rocha
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

