

## PERFIL INFLAMATÓRIO E TOLERÂNCIA ALIMENTAR DE HIDROLISADO DE VÍSCERAS DE FRANGO EM CÃES COM REAÇÃO CUTÂNEA ADVERSA AO ALIMENTO

ANA CAROLINA A. L. CAMARGO<sup>1</sup>, MARIANA Y.H. PORSANI<sup>1</sup>, MARIA EDUARDA G. TOZATO<sup>1</sup>, CLAUDIA E.N. CHUMPITAZ<sup>1</sup>, TICIANE G.B. FREIRE<sup>1</sup>, JHENNIFER C. FENERICK<sup>1</sup>, JHOISSE H.G. RODRIGUES<sup>2</sup>, STEHPANIE S. THEODORO<sup>1</sup>, ELOISE C. DE RAMOS<sup>1</sup>, CAROLINA C. OLIVEIRA, LUCAS B. SCARPIM<sup>1</sup>; AULUS C. CARCIOFI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, SP, Brasil. <sup>2</sup>Faculdade Anclivepa São Paulo, SP, Brasil.

Contato: carolina.leite@unesp.br / Apresentador: ANA CAROLINA A. L. CAMARGO<sup>1</sup>

**Resumo:** A reação cutânea adversa ao alimento (CAFR) é dermatopatia de patogênese complexa. Foi avaliado o perfil inflamatório de cães com CAFR confirmada, comparando citocinas séricas, proteína C-reativa (PCR) e calprotectina fecal após desafio alimentar (M1) e após 8 semanas com dieta experimental com proteína hidrolisada de vísceras de frango (PHF) (M2), bem como com valores de citocinas séricas de cães saudáveis. Dos 47 cães triados pelo protocolo diagnóstico padrão-ouro, 13 tiveram diagnóstico confirmado. O tempo mediano para recidiva pós-desafio foi 6 dias, enquanto o da remissão clínica na dieta PHF de 8 semanas. Os escores clínicos de CAFR aumentaram após o desafio ( $P<0,001$ ) e retornaram aos valores basais em M2, com remissão clínica. As regiões mais afetadas em M1 foram patas, orelhas e face. Em M1, IL-2 e IL-6 foram maiores em CAFR do que em cães saudáveis ( $P<0,05$ ), reduzindo em M2 na análise pareada ( $P<0,05$ ). IFN- $\gamma$  também diminuiu de M1 para M2 ( $P=0,025$ ). Não houve diferença para IL-10, IL-17A e calprotectina fecal, enquanto IL-31 tendeu a diminuir em M2 ( $P=0,06$ ). A PCR aumentou entre M1 e M2 ( $P=0,045$ ), permanecendo dentro da referência. Todos os cães CAFR responderam a PHF e IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$  destacam-se como potenciais biomarcadores da atividade inflamatória.

**Palavras-Chaves:** Cães; reação cutânea adversa ao alimento; proteína hidrolisada; status inflamatório

## INFLAMMATORY STATUS AND FOOD TOLERANCE EVALUATION OF HYDROLYZED POULTRY BY-PRODUCTS IN DOGS WITH CUTANEOUS ADVERSE FOOD REACTION

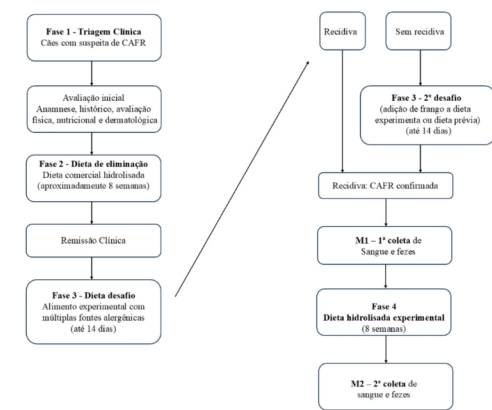
**Abstract:** Cutaneous adverse food reaction (CAFR) is a dermatopathy with complex pathogenesis. This study evaluated the inflammatory profile of dogs with confirmed CAFR by comparing serum cytokines, C-reactive protein (CRP), and fecal calprotectin after a food challenge (M1) and after 8 weeks of an experimental diet containing hydrolyzed poultry meal (HPM) (M2), as well as serum cytokines with healthy dogs. Of 47 dogs screened using the gold-standard diagnostic protocol, 13 were diagnosed with CAFR. The median time to relapse after the food challenge was 6 days, while clinical remission during HPM diet occurred after 8 weeks. Clinical scores increased after the challenge ( $P<0.001$ ) and returned to baseline at M2, with remission. The most affected regions at M1 were paws, ears, and face. At M1, IL-2 and IL-6 concentrations were higher than in healthy dogs ( $P<0.05$ ) and decreased at M2 in paired analysis ( $P<0.05$ ). IFN- $\gamma$  also decreased from M1 to M2 ( $P=0.025$ ). No differences were observed for IL-10, IL-17A, or fecal calprotectin, while IL-31 tended to decrease at M2 ( $P=0.06$ ). CRP increased between M1 and M2 ( $P=0.045$ ) but remained within the reference range. All CAFR dogs responded to HPM, and IL-2, IL-6, and IFN- $\gamma$  emerged as potential biomarkers of inflammatory activity in CAFR.

**Keywords:** Dogs; cutaneous adverse food reaction; hydrolyzed protein; inflammatory status

**Introdução:** A reação cutânea adversa ao alimento (CAFR) é dermatopatia inflamatória pruriginosa não sazonal, desencadeada pela perda da tolerância oral a ingestão de componentes dietéticos (Mueller & Unterer, 2018). O diagnóstico baseia-se em protocolo padrão-ouro com dieta de eliminação seguida de desafio alimentar (Olivry & Mueller, 2020). Sua patogênese imunológica não é totalmente compreendida e parece envolver mecanismos de hipersensibilidade dos tipos I, III e IV (Verlinden et al., 2006). Há escassez de estudos que avaliaram de forma integrada o quadro clínico associado ao perfil inflamatório sistêmico em cães durante as fases do diagnóstico e controle da CAFR. O objetivo deste estudo foi avaliar o status inflamatório em cães com CAFR confirmada após o desafio alimentar e após 8 semanas alimentados com dieta hidrolisada experimental e compará-lo ao de cães saudáveis, além de avaliar o tempo de resposta ao desafio alimentar e as principais regiões anatômicas acometidas.

**Material e Métodos:** Foram triados 47 cães com suspeita de reação cutânea adversa ao alimento (CAFR), submetidos a protocolo diagnóstico padrão-ouro baseado em dieta de eliminação seguida de desafio alimentar (Comitê de Ética nº 920/2024). Foram excluídos cães com doenças concomitantes ou uso contínuo de fármacos capazes de interferir na avaliação dermatológica ou na resposta inflamatória sistêmica. Cães clinicamente saudáveis, sem histórico de alterações dermatológicas, foram utilizados como grupo controle para comparação de citocinas específicas. O estudo foi conduzido em 4 fases (Figura 1). A avaliação dermatológica foi realizada por meio dos índices CADESI-4, CADLI e escala visual analógica de prurido (VAS). Amostras de sangue foram coletadas por venopunção da veia jugular após jejum de 12 horas nos momentos de recidiva clínica após o desafio alimentar (M1) e após oito semanas de dieta experimental à base de proteína hidrolisada de vísceras de frango (PHF) (M2), sendo realizada uma única coleta no grupo controle. As citocinas séricas (IL-2, IL-6, IL-10 e IFN- $\gamma$ ) foram determinadas por plataforma Luminox, enquanto IL-17A, IL-31, proteína C-reativa e calprotectina fecal foram quantificadas por ELISA. Os desfechos dermatológicos e imunológicos foram analisados por modelos lineares mistos no software R (v.4.4.2), considerando o animal como efeito aleatório e nível de significância de 5%, com comparações por médias marginais estimadas e ajustadas ( $P<0,05$ ).

**Resultado e Discussão:** Dos 47 cães submetidos ao protocolo diagnóstico 13 foram confirmados (27,6%)(Olivry & Mueller, 2016). O tempo mediano para recidiva após o desafio alimentar foi de 6 dias (2–12) e para remissão clínica com PHF de 8 semanas (1–12). As regiões mais acometidas foram patas e face (Figura 2). Os escores clínicos aumentaram após o desafio ( $P<0,001$ ) e retornaram aos valores basais em M2, com 100% de resposta clínica a dieta com PHF (Tabela 1). Em M1, as concentrações de IL-2 e IL-6 foram maiores que no grupo controle ( $P<0,05$ ), com redução significativa ao teste pareado comparando M1 e M2 para IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$  ( $P<0,05$ ). A análise estatística, no entanto, não diferenciou os valores de IL-2 e IL-6 no M2 com os dos cães saudáveis, sugerindo controle parcial da inflamação. IL-31 apresentou tendência de redução no M2 ( $P=0,06$ ) e IL-10 tendência de aumento ( $P=0,09$ ). IL-17 e calprotectina fecal não variaram ( $P>0,05$ ). A PCR aumentou discretamente entre M1 e M2 ( $P<0,05$ ), porém permaneceu dentro dos valores de referência (Cerón et al., 2005) (Tabela 2). A redução de IL-2, IL-6 e IFN- $\gamma$  após o controle dietético sugere diminuição da ativação de células T e da resposta inflamatória associada à exposição ao alérgeno alimentar (Verlinden et al., 2006). No entanto, em comparação ao grupo saudável, os valores verificados sugerem persistência do quadro inflamatório e controle clínico da CAFR, mas não sua remissão. A concentrações de calprotectina fecal se mantiveram abaixo do ponto de corte de 50  $\mu\text{g/g}$ , indicativo de inflamação intestinal clinicamente relevante (Heilmann et al., 2011).

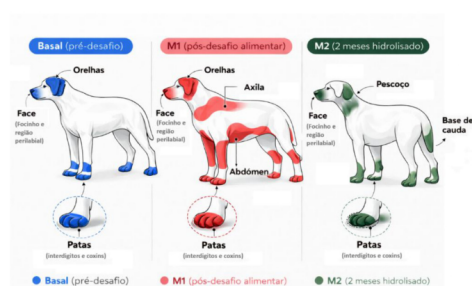


**Figura 1** – Fluxograma do delineamento experimental utilizado para diagnóstico de reação cutânea adversa ao alimento (CAFR) e avaliação da resposta inflamatória após consumo de dieta experimental à base de proteína hidrolisada de vísceras de frango.

**Tabela 1.** Médias e erro padrão dos índices dermatológicos empregados nas diferentes etapas experimentais.

| Índice   | Basal                    | M1<br>(Pós-desafio)       | M2<br>(Pós-dieta<br>experimental<br>hidrolisada) | P-valor |
|----------|--------------------------|---------------------------|--------------------------------------------------|---------|
| VAS      | 2,00 ± 0,34 <sup>a</sup> | 6,69 ± 0,31 <sup>b</sup>  | 1,54 ± 0,27 <sup>a</sup>                         | < 0,001 |
| CADESI-4 | 4,31 ± 0,96 <sup>a</sup> | 13,20 ± 2,58 <sup>b</sup> | 4,00 ± 1,06 <sup>a</sup>                         | < 0,001 |
| CADLI    | 3,54 ± 2,60 <sup>a</sup> | 9,62 ± 7,02 <sup>b</sup>  | 2,23 ± 2,74 <sup>a</sup>                         | < 0,001 |

Letras diferentes (<sup>a</sup>, <sup>b</sup>) na mesma linha indicam diferença estatística significativa ( $P < 0,05$ ).  
VAS: Escala Visual Analógica de Prurido. CADESI-4: Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index. CADLI: Canine Atopic Dermatitis Lesion Index



**Figura 2.** Principais regiões anatómicas de manifestação cutânea em cães diagnosticados com reação cutânea adversa ao alimento nos momentos experimentais.

**Tabela 2.** Médias e desvio padrão das concentrações séricas de citocinas, proteína C-reativa (PCR) e calprotectina fecal em cães saudáveis controle e cães com CAFR nos momentos M1 (após desafio alimentar) e M2 (após dois meses de dieta hidrolisada experimental).

| Biomarcador           | Grupo controle         | M1 (Pós-desafio)         | M2 (Pós-dieta)           | EPM   | P-valor (ANOVA) | P-valor (PAREADO) |
|-----------------------|------------------------|--------------------------|--------------------------|-------|-----------------|-------------------|
| IL-2* (pg/mL)         | 22,2±9,9 <sup>a</sup>  | 525,5±270,9 <sup>a</sup> | 127,2±43,0 <sup>ab</sup> | 103,0 | 0,023           | 0,028             |
| IL-6* (pg/mL)         | 12,9±6,14 <sup>a</sup> | 185,5±86,9 <sup>a</sup>  | 92,0±47,3 <sup>ab</sup>  | 38,6  | 0,015           | 0,011             |
| IL-10 (pg/mL)         | -                      | 172,2±100,7              | 462,7±204,8              | 117,3 | -               | 0,094             |
| IFN- $\gamma$ (pg/mL) | 10,2±6,7               | 46,4±20,0                | 38,7±18,7                | 10,3  | 0,112           | 0,025             |
| IL17 (pg/mL)          | -                      | 9,56±0,9                 | 9,49±0,8                 | 0,59  | -               | 0,851             |
| IL31 (pg/mL)          | -                      | 13,5±3,6                 | 12,7±3,9                 | 2,6   | -               | 0,065             |
| PCR (mg/L)            | -                      | 0,75±0,03                | 0,8±0,02                 | 0,02  | -               | 0,045             |
| Calprotectina (µg/g)  | -                      | 0,56±0,2                 | 0,55±0,19                | 0,14  | -               | 0,856             |

O P-valor (ANOVA) refere-se à comparação entre os três grupos (Controle, M1 e M2) e o P-valor (PAREADO) refere-se à comparação entre M1 e M2 nos animais doentes. O traço (-) indica que o parâmetro não foi avaliado no grupo controle saudável. Letras diferentes indicam diferença estatística ( $P < 0,05$ ).

IL: interleucina; PCR: proteína C-reativa; EPM: erro padrão da média

\* transformação em log

**Conclusão:** Cães com CAFR desenvolveram resposta inflamatória sistêmica durante exposição a alérgenos alimentares, que se reduziu com o controle dietético com PHF. IL-2 e IL-6 identificaram-se como potenciais biomarcadores inflamatórios. Em M2 seus valores foram semelhantes aos do M1 e de cães saudáveis, sugerindo controle parcial da inflamação. A baixa calprotectina fecal não indica inflamação intestinal ativa.

**Agradecimentos:** À MBRF Pet Food e MBRF Ingredientes e à CAPES pela bolsa de estudos. Ao LaCTAD/UNICAMP pelo suporte nas análises de citocinas.

**Referências Bibliográficas:** CERÓN, J. J.; ECKERSALL, P. D.; MARTÍNEZ-SUBIELA, S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, v. 34, n. 2, p. 85-99, 2005. HEILMANN, R. M.; GUARD, B. C.; WEBER, K.; SUCHODOLSKI, J. S.; STEINER, J. M. Development and analytical validation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the quantification of canine calprotectin in serum and feces from dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 25, n. 3, p. 693, 2011. MUELLER, R. S.; UNTERER, S. Adverse food reactions in dogs and cats. *The Veterinary Journal*, v. 236, p. 101-117, 2018. OLIVRY, T.; MUELLER, R. S. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals. *BMC Veterinary Research*, v. 12, n. 1, p. 1-4, 2016. OLIVRY, T.; MUELLER, R. S. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (7): signalment and cutaneous manifestations of dogs and cats with adverse food reactions. *BMC Veterinary Research*, v. 15, n. 1, p. 140, 2019. OLIVRY, T.; MUELLER, R. S. Critically appraised topic on adverse food reactions of companion animals (9): time to flare of cutaneous signs after a dietary challenge in dogs and cats with food allergies. *BMC Veterinary Research*, v. 16, n. 1, p. 158, 2020. VERLINDEN, A.; HESTA, M.; MILLET, S.; JANSSENS, G. P. J. Food allergy in dogs and cats: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 46, n. 3, p. 259-273, 2006.