

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 05/04/2024.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DETERMINAÇÃO DO TURNOVER PROTEICO E
SUPLEMENTAÇÃO COM AMINOÁCIDOS DE CADEIA
RAMIFICADA, ARGININA E ÁCIDO
DOCOSAHEXAENÓICO PARA CONTROLE DA
SARCOPENIA EM CÃES IDOSOS**

LETÍCIA GRAZIELE PACHECO

Zootecnista

2022

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DETERMINAÇÃO DO TURNOVER PROTEICO E
SUPLEMENTAÇÃO COM AMINOÁCIDOS DE CADEIA
RAMIFICADA, ARGININA E ÁCIDO
DOCOSAHEXAENÓICO PARA CONTROLE DA
SARCOPENIA EM CÃES IDOSOS**

Letícia Grazielle Pacheco

Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutora em
Zootecnia.**

2022

P116d	<p>Pacheco, Leticia Grazielle</p> <p>Determinação do turnover proteico e suplementação com aminoácidos de cadeia ramificada, arginina e ácido docosahexaenóico para controle da sarcopenia em cães idosos / Leticia Grazielle Pacheco. --, 2022</p> <p>110 p. : tabs.</p> <p>Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi</p> <p>1. Metabolismo proteico. 2. Traçadores. 3. Aminoácidos. I. Título.</p>
-------	--

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: DETERMINAÇÃO DO TURNOVER PROTEICO E SUPLEMENTAÇÃO COM AMINOÁCIDOS DE CADEIA RAMIFICADA, ARGININA E ÁCIDO DOCOSAHEXAENÓICO PARA CONTROLE DA SARCOPENIA EM CÃES IDOSOS

AUTORA: LETÍCIA GRAZIELE PACHECO

ORIENTADOR: AULUS CAVALIERI CARCIOFI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI (Participação Virtual)
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV UNESP Jaboticabal

Paulo Chiari

Prof. Dr. VLADIMIR ELIODORO COSTA (Participação Virtual) p/
Depto. de Biofísica e Farmacologia / IB/Botucatu - Unesp

Paulo Chiari

Prof. Dr. RICARDO SOUZA VASCONCELLOS (Participação Virtual) p/
Universidade Estadual de Maringá / UEM - Maringá/PR

Paulo Chiari

Prof. Dr. LUCIANO HAUSCHILD (Participação Virtual) p/
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Paulo Chiari

Profa. Dra. ANANDA PORTELLA FÉLIX (Participação Virtual) p/
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal do Paraná / Curitiba/PR

Paulo Chiari

Jaboticabal, 05 de abril de 2022

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Letícia Grazielle Pacheco nasceu em Jaboticabal - SP no ano de 1989. Iniciou os estudos na E.E. “José Luiz de Siqueira”, concluindo o ensino médio no ano de 2006. Em 2007 iniciou curso de Letras – Português/Inglês, na Faculdade de Educação São Luis em Jaboticabal – SP, concluindo o curso no ano de 2009. No ano de 2011 ingressou no curso de Graduação em Zootecnia na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Unesp, Jaboticabal, SP. Durante a graduação foi aluna de iniciação científica pela Fapesp sob a orientação das professoras Lizandra Amoroso e Nilva Kazue Sakomura. Concluiu a graduação em fevereiro de 2016. Se tornou Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia com ênfase em Nutrição de Monogástricos. Atualmente é doutoranda pelo Programa de Pós – Graduação em Zootecnia, com ênfase em Nutrição de Cães e Gatos, sob a orientação do Professor Doutor Aulus Cavalieri Carciofi.

“Se, a princípio, a ideia não é absurda, então não há esperança pra ela.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, aos orixás, guias e todas as entidades que guiam a mente ansiosa de um cientista até seu objetivo.

À minha mãe, dona Marlene, sempre presente com seus exageros e apelos e à minha irmã, Priscila, com todo o apoio e paciência de irmã mais velha, a quem tenho como melhor dos exemplos de disciplina. Aos pets Tuna, Micky e George por todo o carinho e amor genuíno.

À Suelen, Gustavo, Clarice e Sushi, família que eu me agreguei sem pedir licença e nela permanecerei até o final da minha existência, pois sei que eles estarão comigo em todo e qualquer momento.

Ao Bruno, irmão que a vida adulta me trouxe, que se aproximou num dia de seminário, foi abençoado com um xixi do Max e desde então nossa amizade só amadureceu, com quem aprendi sobre convivência, organização e carinho.

Ao professor Aulus por todo o cuidado sempre e pela oportunidade de ousar no doutorado, lembro de chegar oferecendo as possibilidades e ele, “por que não fazer todas?”, toda essa liberdade foi muito importante.

À ADM pelo financiamento do experimento e também por todo apoio, pois aceitaram também ousar em experimentos diversos para estudar a condição da idade nesses animais, nossa parceria foi muito positiva. Em especial às pessoas envolvidas em todas as discussões e etapas do processo: Olivier, Juliana e Luciano.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Ao CNPq (Conselho nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudos que possibilitou a dedicação integral ao programa de pós-graduação.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) processo n.º 2019/00790-8 pela bolsa de estudos que possibilitou a dedicação integral ao programa de pós-graduação.

Ao Centro de Isótopos Estáveis “Prof.º Carlos Ducatti” onde, depois de alguns anos, eu voltei e fui recebida como se não tivesse passado dois dias fora, encontrei as pessoas de braços abertos e prontas para estabelecerem novos laços.

À Camila, presente que o doutorado e o universo trouxeram que me ensinou entre práticas (coletas, manejo com gatos e cães), filosofias (discussões pela madrugada e durante coletas infinitas) e sentimentos (dos melhores possíveis) a ser uma pessoa melhor.

À Ludmilla, que me socorreu mesmo quando as duas precisavam de socorro, que estava sempre ali pra tudo o que precisasse e que soube me acolher no meio de alguns labirintos.

Aos funcionários que se tornaram uma família também, aguentando oscilações de humor, dramas pessoais, trocas de animais, discussões, sempre com muito amor e acolhimento. Elaine com todo o seu amor e carinho pelos animais que transborda e faz com que a gente sinta o dobro de responsabilidade por eles, Kelly com muita agilidade e sempre pronta pra ajudar e apoiar em qualquer situação, Diego sempre ali pra ajudar naquela gambiarra que dá certo no final, Claudinha com aquele amor maternal que cuida e acolhe, mas ao mesmo tempo bate se precisar e Lucas que, de repente, de repente mesmo, já era parceiro a ponto de iniciar os trabalhos antes das 6:30 e parar só depois das 20:00. Vocês são maravilhosos!

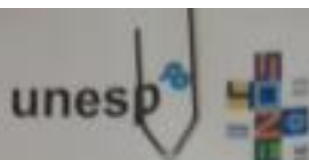
A todos com quem tive o prazer de conviver e trabalhar no Labnutri (Letícia Luís, Débora, Mayara, Pet, Ste, Carol, Fer, Pri, Amanda, Pierina, Érico, Duda, Tamy, Roberta, Thaila, Virgínia, Elô, Ju, Mari, Ariel, Pablo, Jean) e aos residentes que auxiliaram na manutenção da saúde dos animais (Marcos e Suellen). Alguns de vocês eu convivi e convivo ainda mais do que outros, mas ainda com muito amor em todas as lembranças e presença.

À Márcia que aparecia a qualquer horário, que ajudava a transportar equipamentos das câmaras e socorria quando tudo ali naquela salinha parecia que ia explodir, mesmo com medo de cachorros, sempre de bom humor e com aquele ar de mãezona.

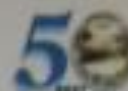
Aos animais que participaram do experimento (Ameixa, Amendoa, Amora, Bola, Bruno, Café, Chaves, Chokito, Churros, Coca, Coragem, Luigi, Major, Manolo, Mike, Napô, Pepita, Scott, Scooby, Thomas, Tobias e Zeca) que nos acompanharam por quase 3 anos de maneira incrível. E também aos outros animais do laboratório, gatos, cães e jabutis com quem convivi e aprendi muito.

É muito difícil lembrar o nome de todo mundo, principalmente porque tenho uma memória bastante ruim, mas quero que cada pessoa que me conhece e leia esses agradecimentos se sinta abraçado como um agradecimento, pois um “bom dia” pode ter mudado os rumos de um dia que parecia ruim. Algumas pessoas acabam tendo maior participação do que outras em algumas etapas e em outras nem tanto, mas serão lembradas por esses momentos, tenha certeza disso.

Às empresas BRF Ingredients, Affinity PetCare e Adimax Industria e Comércio de Alimentos pelo suporte financeiro ao Laboratório de Pesquisas em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "Sarcopevia innovation project research — FRA & BRA", protocolo nº 009537/18, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aulus Cavaleri Garçiofi, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 05 de julho de 2018.

Vigência do Projeto	20/08/2018 a 30/06/2020
Espécie / Linhagem	Cães domésticos
Nº de animais	20
Peso / Idade	15 Kg / 4 a 18 anos
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Laboratório de Pesquisa, Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos "Prof. Dr. Flávio Prada" FCAV/Unesp, Jaboticabal

Jaboticabal, 05 de julho de 2018.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

RESUMO

A fim de se aprofundar estudos acerca do metabolismo proteico, foram comparados quatro métodos para se determinar o fluxo de proteína em cães adultos e idosos, bem como avaliar os efeitos do fornecimento de uma dieta enriquecida com ácido docosaexaenoico (DHA), arginina e aminoácidos de cadeia ramificada (ACR) sobre o metabolismo de proteína. O primeiro experimento teve por objetivo estudar e padronizar os métodos de utilização dos compostos marcados. O segundo experimento comparou os métodos de determinação do turnover proteico com ^{13}C -Leucina, ^{13}C -Fenilalanina e ^{15}N -Glicina em cães adultos e idosos. Para isto foram avaliadas a digestibilidade, balanço de nitrogênio e fluxo proteico em arranjo fatorial 4x2 (4 métodos e 2 faixas etárias). No terceiro experimento foram avaliadas em cães adultos e idosos duas dietas, uma controle e outra suplementada com DHA, arginina e ACR. Foi adotado delineamento cross over e arranjo fatorial 2x2, com duas dietas (Controle x Teste) e duas faixas etárias (adultos x idosos). Na dieta teste a quantidade analisada de DHA, leucina, isoleucina, valina e arginina foram, respectivamente, 100%, 72%, 22%, 18%, e 35% maiores do que na dieta controle. No primeiro estudo os métodos não diferiram em si, obtendo-se resultados semelhantes de síntese e degradação proteica ($P>0,05$). Após esta experiência, os procedimentos experimentais de aplicação dos métodos foram melhorados para os estudos seguintes. No segundo experimento foi observado efeito de idade no metabolismo de proteína ($P<0,05$) sem efeito de métodos ($P>0,05$). Pelos quatro métodos de estudo, em média as taxas de síntese e degradação de proteína foram, respectivamente, 19% e 21% menores nos idosos em comparação aos adultos ($P<0,05$). Não houve efeito, no entanto, em digestibilidade e balanço de nitrogênio ($P>0,05$). Estes resultados suportam hipótese que alterações metabólicas sejam uma das causas implicadas no desenvolvimento de sarcopenia em cães. No terceiro experimento foi observado efeito de dieta, sendo que a suplementação nutricional proposta elevou o fluxo de proteína corporal dos cães ($P<0,05$), tanto em adultos como idosos. Apesar de estatisticamente semelhante, esta elevação foi 42% maior em adultos em comparação com idosos. Adicionalmente, ao final do período de recebimento das dietas experimentais, tendência à maior massa magra corporal (kg) foi observada para idosos alimentados com a dieta teste em comparação à controle ($P=0,06$). Como conclusão, os quatro métodos avaliados foram equivalentes na determinação de síntese e degradação de proteína. A suplementação alimentar com DHA, ACR e arginina elevou o fluxo proteico, podendo favorecer a desaceleração da perda de massa muscular e controle da sarcopenia, merecendo estudos de longo prazo.

Palavras-chave: geriatria, leucina, massa corporal magra, sarcopenia, isótopos estáveis.

ABSTRACT

To develop better study protocols to assess protein metabolism, four methods to estimate protein flux were compared in adult and old dogs. The dietary supply of docosahexaenoic acid (DHA), branched-chain amino acids (BCAA), and arginine was also evaluated. The first study aimed to investigate and standardize methods of study protein metabolism with stable isotopes. The second experiment compared the methods of ^{13}C -Leucine, ^{13}C -Phenylalanine, ^{15}N -Glycine in adult and old dogs. Nutrient digestibility, nitrogen balance, and protein flow were evaluated in a 4 (methods) x 2 (ages) factorial arrangement. The third study compared two diets in adult and old dogs, a control and a test diet supplemented with DHA, arginine, and BCAA. A cross over design and a 2 (diets) x 2 (ages) factorial arrangement was adopted. The test diet presented analyzed values of DHA, arginine, leucine, isoleucine and valine 100%, 35%, 72%, 22% and 18% higher, respectively, than the control treatment. In the first study, similar results of protein synthesis and degradation were observed for all evaluated methods ($P>0.05$). After this experience, the protocol of the stable isotopes' application was improved for the other studies. In study two, an age effect was observed for protein flow ($P>0.05$), without effect of method ($P<0.05$). Considering the four methods studied, the mean rates of protein synthesis and breakdown were, respectively, 19% and 21% lower in old than adult dogs ($P<0.05$). No age effect was observed for nutrient digestibility and nitrogen balance ($P>0.05$). These results support the hypothesis that metabolic alterations are involved in sarcopenia development in old dogs. In the third study a diet effect was observed: both in adult and old dogs fed the supplemented food higher protein flow was observed than for animals fed the control diet ($P>0.05$). Although statistically similar, this increase in protein flow was 42% higher for adult than for old dogs. In addition, at the end of the period of diet intake a tendency for higher lean body mass was observed for old dogs fed the supplemented food in comparison to control ($P=0.06$). As conclusion, the four methods evaluated were adequate with similar results of protein synthesis and degradation. A diet supplementation with DHA, arginine and BCAA increased the protein flow rate, possibly reducing sarcopenia development, deserving future studies.

Keywords: geriatrics, leucine, lean body mass, sarcopenia, stable isotopes.

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1.1 Introdução

O aumento dos cuidados e melhora da nutrição de cães tem levado ao aumento da expectativa de vida destes animais (Freeman, 2012; Larsen e Farcas, 2014). Com o envelhecimento, cães passam a demonstrar com mais frequência alterações fisiológicas de senectude, muitas das quais requerem estudos sobre possíveis alterações alimentares para se assegurar saúde e qualidade de vida a estes animais. Dentre as alterações frequentes em cães idosos, destacam-se a sarcopenia (Freeman, 2012; Saker, 2021).

O uso de traçadores metabólicos permite extrair informações valiosas acerca da cinética, turnover e metabolismo de um determinado nutriente de interesse, tornando-se uma ferramenta de alto potencial para elucidar questões fisiológicas, independentemente da idade do animal (Kim et al., 2016). O traçador ideal deve ser identificado com precisão suficiente quando fornecido em pequenas doses, devendo ainda representar e não afetar o metabolismo do elemento a ser traçado (Wolfe e Chinkes, 2005)

Os métodos mais conhecidos para se determinar turnover são o do precursor, dos produtos finais e da oxidação aminoacídica (Wagenmakers, 1999). Os três podem ser utilizados para dois propósitos: determinação das taxas de turnover, síntese e degradação proteica geral, ou serem aplicados para estudos de aminoácidos isolados quando em concentrações deficientes ou excessivas.

Dentro do princípio de obtenção, padronização e utilização de métodos minimamente invasivos, objetivou-se com este projeto estudar e comparar o metabolismo proteico de cães adultos jovens e idosos, utilizando-se isótopos estáveis como traçadores metabólicos, com vistas à melhor caracterização e compreensão da sarcopenia. Além disso, foi objetivo comparar e validar três traçadores para quantificação do turnover proteico corporal de cães e também testar uma dieta enriquecida com ácido docosaenoico e leucina a fim de verificar seu efeito sobre o metabolismo de proteína.

Conclusions

The studied old dog group presented sarcopenia, as animals demonstrated the same body condition score, but old animals lower lean mass % and higher fatty mass % than adults. For adult and old dogs, the consumption of the diet supplemented with branched-chain amino acids, arginine, and docosahexaenoic acid stimulated protein renovation, with higher rates of protein synthesis and breakdown. This might explain the tendency for higher lean mass (kg) in old dogs fed the test diet, and the preservation of body composition in adult dogs fed the test diet, as when fed the control food these animals presented an increase in fatty mass % and reduction in lean mass %. Long term studies with different dosages of the nutrient combination tested might allow a better comprehension of its role in delaying sarcopenia development in old dogs.

References

- Adams, V. J., Morgan, D. M., & Watson, P. (2018). Healthy ageing and the science of longevity in dogs. Part I: is grey the new gold?. *Companion Animal*, 23(1), 12-17.
- Alway, S. E., Myers, M. J., & Mohamed, J. S. (2014). Regulation of satellite cell function in sarcopenia. *Frontiers in aging neuroscience*, 6, 246.
- Bannenberg, G., & Serhan, C. N. (2010). Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(12), 1260-1273.
- Baptista, I. L., Leal, M. L., Artioli, G. G., Aoki, M. S., Fiamoncini, J., Turri, A. O., ... & Moriscot, A. S. (2010). Leucine attenuates skeletal muscle wasting via inhibition of

ubiquitin ligases. *Muscle & Nerve: Official Journal of the American Association of Electrodiagnostic Medicine*, 41(6), 800-808.

Birchenall-Sparks, M. C., Roberts, M. S., Staecker, J., Hardwick, J. P., & Richardson, A. (1985). Effect of dietary restriction on liver protein synthesis in rats. *The Journal of nutrition*, 115(7), 944-950.

Carlos, A. B. M., de Oliveira, C. V., Rodrigues, M. A. M., & Costa, V. E. (2019). Is breath testing without ¹³C-labelled external urea able to detect *Helicobacter pylori* infection? *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 411(22), 5641–5645. <https://doi.org/10.1007/s00216-019-01961-5>

Churchill, J. A., & Eirmann, L. (2021). Senior pet nutrition and management. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 51(3), 635-651.

Coplen, T. B. (2011). Guidelines and recommended terms for expression of stable-isotope-ratio and gas-ratio measurement results. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 25(17), 2538–2560. <https://doi.org/10.1002/rcm.5129>

Dodd, K. M., & Tee, A. R. (2012). Leucine and mTORC1: a complex relationship. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 302(11), E1329-E1342.

Dutta, C. (1997). Significance of sarcopenia in the elderly. *The Journal of nutrition*, 127(5), 992S-993S.

Freeman, L. M. (2018). Cachexia and sarcopenia in companion animals: An under-utilized natural animal model of human disease. *JCSM Rapid Communications*, 1(2), 1-17.

Garlick, P. J. (2005). The role of leucine in the regulation of protein metabolism. *The Journal of nutrition*, 135(6), 1553S-1556S.

Goloni, C., Peres, F. M., Senhorello, I. L., Di Santo, L. G., Mendonça, F. S., Loureiro, B. A., ... & Carciofi, A. C. (2020). Validation of saliva and urine use and sampling time on the doubly labelled water method to measure energy expenditure, body composition and water turnover in male and female cats. *British Journal of Nutrition*, 124(4), 457-469.

Hao, H., Tummala, P., Guzman, E., Mali, R. S., Gregorski, J., Swaroop, A., & Mitton, K. P. (2011). The transcription factor neural retina leucine zipper (NRL) controls photoreceptor-specific expression of myocyte enhancer factor Mef2c from an alternative promoter. *Journal of Biological Chemistry*, 286(40), 34893-34902.

Herbst, A., Pak, J. W., McKenzie, D., Bua, E., Bassiouni, M., & Aiken, J. M. (2007). Accumulation of mitochondrial DNA deletion mutations in aged muscle fibers: evidence for a causal role in muscle fiber loss. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 62(3), 235-245.

- Laflamme, D. P. (2005). Nutrition for aging cats and dogs and the importance of body condition. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 35(3), 713-742.
- Laflamme, D. P. (2008). Pet food safety: dietary protein. *Topics in companion*
- Larsen, J. A., & Farcas, A. (2014). Nutrition of aging dogs. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 44(4), 741-759.
- Lau, L. L., & McMurray, A. H. (1999). Mesenteric venous thrombosis in protein S deficiency: case report and literature review. *The Ulster medical journal*, 68(1), 33.
- Lawler, J. M., Kwak, H. B., Kim, J. H., & Suk, M. H. (2009). Exercise training inducibility of MnSOD protein expression and activity is retained while reducing prooxidant signaling in the heart of senescent rats. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(5), R1496-R1502.
- Lee, J. H., Jeon, J. H., & Lee, M. J. (2020). Docosahexaenoic acid, a potential treatment for sarcopenia, modulates the ubiquitin–proteasome and the autophagy–lysosome systems. *Nutrients*, 12(9), 2597.
- Lewandowicz, A., Sławiński, P., Kądalska, E., & Targowski, T. (2020). Some clarifications of terminology may facilitate sarcopenia assessment. *Archives of Medical Science: AMS*, 16(1), 225.
- Li, F., Yin, Y., Tan, B., Kong, X., & Wu, G. (2011). Leucine nutrition in animals and humans: mTOR signaling and beyond. *Amino acids*, 41(5), 1185-1193.
- Li, J. B., & Jefferson, L. S. (1978). Influence of amino acid availability on protein turnover in perfused skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 544(2), 351-359.
- Lighton, J. R. (2018). *Measuring metabolic rates: a manual for scientists*. Oxford University Press.
- Maria, A. P. J., Ayane, L., Putarov, T. C., Loureiro, B. A., Neto, B. P., Casagrande, M. F., ... & Carciofi, A. C. (2017). The effect of age and carbohydrate and protein sources on digestibility, fecal microbiota, fermentation products, fecal IgA, and immunological blood parameters in dogs. *Journal of animal science*, 95(6), 2452-2466.
- Matthews, D. E., Motil, K. J., Rohrbaugh, D. K., Burke, J. F., Young, V. R., & Bier, D. M. (1980). Measurement of leucine metabolism in man from a primed, continuous infusion of L-[1-3C] leucine. *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism*, 238(5), E473-E479.
- Matthews, D. E., Schwarz, H. P., Yang, R. D., Motil, K. J., Young, V., & Bier, D. M. (1982). Relationship of plasma leucine and α -ketoisocaproate during a L-[1-13C] leucine infusion in man: a method for measuring human intracellular leucine tracer enrichment. *Metabolism*, 31(11), 1105-1112.
- Meyer, H., & Stadtfeld, G. (1980). Investigations on the body and organ structure of dogs. In *Nutrition of the dog and cat: proceedings of the International Symposium on*

the Nutrition of the Dog and Cat, arranged by the Institute of Animal Nutrition in conjunction with the 200-year anniversary of the Veterinary School, Hannover, 26 June 1978/editor, RS Anderson.--. Oxford; New York: Pergamon Press.

Mitchell, W. K., Atherton, P. J., Williams, J., Larvin, M., Lund, J. N., & Narici, M. (2012). Sarcopenia, dynapenia, and the impact of advancing age on human skeletal muscle size and strength; a quantitative review. *Frontiers in physiology*, 3, 260.

Murphy, R. A., Mourtzakis, M., Chu, Q. S., Reiman, T., & Mazurak, V. C. (2010). Skeletal muscle depletion is associated with reduced plasma (n-3) fatty acids in non-small cell lung cancer patients. *The Journal of nutrition*, 140(9), 1602-1606.

Paul, D., Skrzypek, G., & Fórizs, I. (2007). Normalization of measured stable isotopic compositions to isotope reference scales – a review. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 21(18), 3006–3014. <https://doi.org/10.1002/rcm.3185>

Pereira, M. G., Baptista, I. L., Carlassara, E. O., Moriscot, A. S., Aoki, M. S., & Miyabara, E. H. (2014). Leucine supplementation improves skeletal muscle regeneration after cryolesion in rats. *PloS one*, 9(1), e85283.

Pereira, M. G., Silva, M. T., da Cunha, F. M., Moriscot, A. S., Aoki, M. S., & Miyabara, E. H. (2015). Leucine supplementation improves regeneration of skeletal muscles from old rats. *Experimental gerontology*, 72, 269-277.

Picou, D., & Taylor-Roberts, T. (1969). The measurement of total protein synthesis and catabolism and nitrogen turnover in infants in different nutritional states and receiving different amounts of dietary protein. *Clinical science*, 36, 283-296.

Preston, T., & McMillan, D. C. (1988). Rapid sample throughput for biomedical stable isotope tracer studies. *Biomedical & environmental mass spectrometry*, 16(1-12), 229-235.

Rizzoli, R., Reginster, J. Y., Arnal, J. F., Bautmans, I., Beudart, C., Bischoff-Ferrari, H., ... & Cooper, C. (2013). Quality of life in sarcopenia and frailty. *Calcified tissue international*, 93(2), 101-120.

Rudman D. Growth hormone, body composition, and aging. *J Am Geriatr Soc* 1985;33:800–807.

Saker, K. E. (2021). Nutritional concerns for cancer, cachexia, frailty, and sarcopenia in canine and feline pets. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, 51(3), 729-744.

Serhan, C. N., Yacoubian, S., & Yang, R. (2008). Anti-inflammatory and proresolving lipid mediators. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 3, 279-312.

Short, K. R., Vittone, J. L., Bigelow, M. L., Proctor, D. N., & Nair, K. S. (2004). Age and aerobic exercise training effects on whole body and muscle protein metabolism. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 286(1), E92-E101.

Tipton, K. D., & Wolfe, R. R. (2001). Exercise, protein metabolism, and muscle growth. *International journal of sport nutrition and exercise metabolism*, 11(1), 109-132.

- Uojima, H., Sakurai, S., Hidaka, H., Kinbara, T., Sung, J. H., Ichita, C., ... & Kobayashi, S. (2017). Effect of branched-chain amino acid supplements on muscle strength and muscle mass in patients with liver cirrhosis. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 29(12), 1402-1407.
- Wagenmakers, A. J. (1999). Tracers to investigate protein and amino acid metabolism in human subjects. *Proceedings of the Nutrition Society*, 58(4), 987-1000.
- Wakshlag, J. J., Barr, S. C., Ordway, G. A., Kallfelz, F. A., Flaherty, C. E., Christensen, B. W., ... & Davenport, G. M. (2003). Effect of dietary protein on lean body wasting in dogs: correlation between loss of lean mass and markers of proteasome-dependent proteolysis. *Journal of animal physiology and animal nutrition*, 87(11-12), 408-420.
- Wang, Y., Lin, Q. W., Zheng, P. P., Zhang, J. S., & Huang, F. R. (2013). DHA inhibits protein degradation more efficiently than EPA by regulating the PPAR γ /NF κ B pathway in C2C12 myotubes. *BioMed Research International*, 2013.
- Wannemacher Jr, R. W., & McCoy, J. R. (1966). Determination of optimal dietary protein requirements of young and old dogs. *The Journal of Nutrition*, 88(1), 66-74.
- Waterlow, J. C. (1984). Protein turnover with special reference to man. *Quarterly Journal of Experimental Physiology: Translation and Integration*, 69(3), 409-438.
- Waterlow, J. C., Golden, M. H. N., Garlick, P. J., & Picou, D. (1978). Measurements of Whole Body Protein Turnover in Man with 15 N-glycine. In *Recent Developments in Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine* (pp. 595-604). Springer, Boston, MA.
- Wei, H. K., Zhou, Y., Jiang, S., Tao, Y. X., Sun, H., Peng, J., & Jiang, S. (2013). Feeding a DHA-enriched diet increases skeletal muscle protein synthesis in growing pigs: association with increased skeletal muscle insulin action and local mRNA expression of insulin-like growth factor 1. *British journal of nutrition*, 110(4), 671-680.
- Williams, C. C., Cummins, K. A., Hayek, M. G., & Davenport, G. M. (2001). Effects of dietary protein on whole-body protein turnover and endocrine function in young-adult and aging dogs. *Journal of animal science*, 79(12), 3128-3136.
- Yao, Q., Ke, Z. Q., Guo, S., Yang, X. S., Zhang, F. X., Liu, X. F., ... & Liu, C. (2018). Curcumin protects against diabetic cardiomyopathy by promoting autophagy and alleviating apoptosis. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 124, 26-34.