

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP**

**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TEOR DE PROTEÍNA E SÓDIO EM ALIMENTOS  
EXTRUSADOS SOBRE O “TURNOVER” DA ÁGUA  
CORPORAL DE GATOS**

**Caroline Alves Garcia**

Zootecnista

**2019**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**TEOR DE PROTEÍNA E SÓDIO EM ALIMENTOS  
EXTRUSADOS SOBRE O “TURNOVER” DA ÁGUA  
CORPORAL DE GATOS**

**Caroline Alves Garcia**

**Orientador: Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi**

**Coorientadora: Profa. Dra. Bruna Agy Loureiro**

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

**2019**

G216t Garcia, Caroline Alves  
Teor de proteína e sódio em alimentos extrusados sobre o “turnover” da água corporal de gatos / Caroline Alves Garcia. -- Jaboticabal, 2019  
37 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi  
Coorientadora: Bruna Agy Loureiro

1. Nutrição animal. 2. Isótopos. 3. Água. I. Título.

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 DISSERTAÇÃO: TEOR DE PROTEÍNA E SÓDIO EM ALIMENTOS EXTRUSADOS SOBRE O "TURNOVER" DA ÁGUA CORPORAL DE GATOS

**AUTORA: CAROLINE ALVES GARCIA**

**ORIENTADOR: AULUS CAVALIERI CARCIOFI**

**COORIENTADORA: BRUNA AGY LOUREIRO**

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

  
Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI

Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal - UNESP

  
Prof. Dr. RICARDO SOUZA VASCONCELLOS

Universidade Estadual de Maringá / UEM - Maringá/PR

  
Profa. Dra. MÁRCIA DE OLIVEIRA SAMPAIO GOMES (Videoconferência)

Departamento de Clínica Médica / FMVZ - USP - São Paulo,SP

Jaboticabal, 08 de março de 2019

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Caroline Alves Garcia** – Nascida em 02 de maio de 1991 na cidade de Araraquara – SP. Em março de 2012 ingressou no curso de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de Jaboticabal. Durante a graduação foi membro bolsista do Programa de Educação Tutorial – PET e bolsista da FAPESP de iniciação científica sob orientação do Professor Dr. Ricardo Andrade Reis. Desenvolveu seu Trabalho de Conclusão de Curso no ano de 2016 sob orientação do Professor Dr. Aulus Cavalieri Carciofi. Graduou-se em março de 2017 e ingressou no mesmo mês no curso de Mestrado em Zootecnia sob orientação do Professor Dr. Aulus Cavalieri Carciofi e coorientação da Professora Dra. Bruna Agy Loureiro, durante esse período foi bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*"If you can dream it, you can do it" 🐭*

**WALT DISNEY**

## *Dedico*

*Aos meus pais, Vera Lucia Alves da  
Cunha Garcia e Ricardo Torres Garcia, por  
todo amor, carinho e dedicação e aos  
meus avôs (in memoriam) Nadir e Elcídio.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, por todas as oportunidades por ter guiado meus pensamentos e passos, e me abençoado em cada decisão.

Aos meus pais, Vera Lúcia e Ricardo por tudo que fizeram pelos filhos. O que me tornei se deve principalmente por todo ensinamento que vocês nos passaram.

Ao meu irmão Guilherme Alves Garcia, por ser tão parceiro e sempre estar comigo em qualquer situação.

Ao meu marido Thomaz Marques Sena por todos esses anos de companheirismo, paciência, amor e tantos outros sentimentos maravilhosos que compartilhamos! Por ter esse coração enorme, sempre disposto a ajudar! Obrigada por ter se tornado esse homem maravilhoso, sou muito orgulhosa por ter você ao meu lado e poder te chamar agora de marido!

Agradeço imensamente aos meus filhos peludos Thor, Pina, Moana e Rayka, não imagino como teria sido minha vida acadêmica sem vocês ao meu lado! Muito obrigada pelo amor incondicional, por serem tão lindos, carinhosos e brincalhões! Vocês são os amores da minha vida!

Aos meus sogros Ivanilde e Irso, por terem colocado no mundo uma das pessoas mais especiais da minha vida, por estarem sempre nos ajudando e serem como meus segundos pais.

Agradeço ao meu orientador, Professor Dr. Aulus Cavalieri Carciofi, por ter me acolhido no grupo, pelas oportunidades, por todo aprendizado que me proporcionou e por ser uma pessoa iluminada. Muito obrigada por tudo!

À minha coorientadora, Professora Dra. Bruna Agy Loureiro, por toda ajuda, paciência, companheirismo e amizade. Muito obrigada por tudo que você me ensinou!

Agradeço ao Prof. Ricardo Souza Vasconcellos e à Profa. Márcia de Oliveira Sampaio Gomes por poderem participar da banca de defesa e ajudarem na melhoria do trabalho.

Aos meus padrinhos mais que especiais Jane e Marco Antônio, por serem pessoas tão maravilhosas. Eu não poderia ter padrinhos melhores!

Às minhas companheiras de experimento Bruna e Francine, muito obrigada por vocês terem paciência comigo, a transição da faculdade para o mestrado teria sido muito mais difícil se eu não tivesse vocês! Obrigada por tudo que vocês me ensinaram e por termos convivido tão próximas durante os 9 meses do experimento e nos meses seguintes nas análises.

Ao Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”, seus animais, funcionários, pós-graduandos e estagiários o meu muito obrigada, vocês foram parte essencial do meu crescimento profissional e pessoal!

Agradeço especialmente aos meus amigos pós-graduandos Amanda, Fernanda, Lara, Letícia, Lucas e Ludmilla por tornarem os dias mais leves, por mais cansativos que eles fossem.

Aos meus amigos petianos Ana Flávia, Caio, Luiz Henrique, Mayara, Phillip e Thomaz, muito obrigada pela amizade que durou mais que nossa permanência no grupo, pelas horas de conversas que me faziam desligar do mestrado.

Aos meus amigos de infância Augusto e Marcelo! Não tenho palavras para descrever o quanto é importante ter vocês na minha vida até hoje!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pela bolsa concedida (Processo 132673/2017-7).

À FAPESP pelo auxílio ao projeto que deu origem a esse estudo (Processo 2013/20340-0) e que o tornou possível.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas da Faculdade de Medicina da USP – Ribeirão Preto pelas análises realizadas.

À Affinity PetCare pelo apoio financeiro ao Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”.

À Manzoni Industrial S. A. pela doação da extrusora, tornando possível a fabricação das dietas.

## SUMÁRIO

	Página
CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais.....	ii
RESUMO.....	iii
ABSTRACT.....	iv
<b>CAPÍTULO 1 – Considerações Gerais.....</b>	<b>1</b>
INTRODUÇÃO.....	1
REVISÃO DE LITERATURA.....	3
Importância da água.....	3
Balanço hídrico.....	4
Método da água marcada com isótopo de deutério.....	10
REFERÊNCIAS.....	12
<b>CAPÍTULO 2 - Crude protein and sodium intake effects on water turnover of cats fed extruded diets.....</b>	<b>18</b>
Summary.....	20
Introduction.....	21
Material and Methods.....	23
Results.....	30
Discussion.....	31
References.....	36

## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado **“Dietas com diferentes proporções de proteína e carboidratos para gatos: efeito no metabolismo energético, produção de oxalato e métodos para mensuração do gasto energético”**, protocolo nº 6.185/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi, 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 junho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da 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 04 de maio de 2016.

Vigência do Projeto	06/06/16 a 06/03/2017
Espécie / Linhagem	SRD
Nº de animais	8
Peso / Idade	4 Kg / 2 anos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Animais do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada” – Unesp - Jaboticabal

Jaboticabal, 04 de maio de 2016.

  
**Profª Drª Lizandra Amoroso**  
Coordenadora – CEUA

## TEOR DE PROTEÍNA E SÓDIO EM ALIMENTOS EXTRUSADOS SOBRE O “TURNOVER” DA ÁGUA CORPORAL DE GATOS.

**RESUMO** – Devido às peculiaridades fisiológicas dos gatos no balanço hídrico, a ingestão de dietas secas pode resultar na produção de baixo volume e concentração de urina, pois os gatos não compensam totalmente a baixa ingestão de água através dos alimentos bebendo mais água. Essa condição tem sido apontada como possível fator de risco para o desenvolvimento das doenças do trato urinário inferior em gatos. Assim, estratégias para aumentar a produção de urina podem ser importantes para a prevenção da urolitíase. Os efeitos da ingestão de dietas extrusadas com quantidades crescentes de proteína bruta (PB) e sódio (Na) foram avaliados no fluxo de água em gatos, comparando-se o método tradicional de balanço hídrico e a técnica de diluição de deutério. O estudo seguiu um delineamento de blocos casualizados, com três blocos de oito gatos, dois gatos por tratamento em cada bloco, totalizando seis repetições por alimento. Dietas com diferentes quantidades de PB e Na foram avaliadas: 28% de PB e 0,58% de Na, 39% de PB e 0,64% de Na, 52% de PB e 0,76% de Na e 64% de PB e 0,87% de Na. Após a adaptação, os gatos foram alojados individualmente durante 8 dias para coleta total de fezes e urina para medir o balanço hídrico (WB), excreção de ureia, e características das fezes e urina. Foram computadas as ingestões e as excreções diárias de água. O óxido de deutério foi adicionalmente utilizado para avaliar o turnover de água, com os gatos alojados em um gatil coletivo. Os dados foram analisados pelo teste F e as médias comparadas por contrastes polinomiais ( $P < 0,05$ ). Os métodos foram comparados pela correlação de Pearson, análise de Bland e Altman e teste t de Student. O aumento da PB elevou linearmente a excreção renal de ureia ( $P < 0,001$ ) e, juntamente com o maior consumo de Na, elevou a carga renal soluto, resultando em um aumento linear na produção de urina ( $P < 0,001$ ), com maior ingestão compensatória de água ( $P = 0,013$ ). A densidade urinária, a água metabólica e as perdas de água fecais e insensíveis não diferiram ( $P > 0,05$ ). O pH da urina aumentou linearmente com o aumento de PB e Na ( $P = 0,001$ ). O fluxo de água aumentou linearmente com o método de deutério ( $P < 0,001$ ), sendo superior ( $20,85 \pm 11,11$  mL/cat/dia) ao verificado com o método BH. Maiores quantidades de PB e Na nas rações secas aumentaram a produção de urina e o consumo de água dos gatos, sendo uma possível opção a ser explorada para aumentar a micção. O método do isótopo estável é preferível para estudar o metabolismo da água, pois não altera a rotina de vida do animal.

**Palavras-chave:** deutério, balanço hídrico, isótopos estáveis

## PROTEIN AND SODIUM CONTENT OF EXTRUDED FOOD IN THE BODY WATER TURNOVER OF ADULT CATS

**ABSTRACT** - Because of the physiological peculiarities of cats in the water balance, ingestion of dry diets can result in the production of low volume and urine concentration because cats do not fully compensate for the low water intake through food drinking more water. This condition has been pointed out as a possible risk factor for the development of lower urinary tract diseases in cats. Thus, strategies to increase urine production may be important for the prevention of urolithiasis. The of extruded diets intake with increasing amounts of crude protein (CP) and sodium (Na) were evaluated on the water flux of cats, comparing the traditional water balance method and the deuterium dilution technique. The study followed a randomized block design, with three blocks of eight cats, two cats per treatment in each block, totaling six repetitions per food. Diets with different amounts of CP and Na were evaluated: 28% CP and 0.58% Na; 39% CP and 0.64% Na; 52% CP and 0.76% Na; 64% CP and 0.87% Na. After adaptation, cats were housed individually for 8 days for total collection of faeces and urine to measure water balance (WB), urea excretion, and characteristics of faeces and urine. The daily intakes and excretions of water were computed. Deuterium oxide was additionally used to evaluate water turnover, with cats housed in a collective cattery. Data were analysed by F test and means compared by polynomial contrasts ( $P < 0.05$ ). The methods were compared by Pearson correlation, Bland and Altman analysis and Student's t test. The increase on CP elevated linearly the renal excretion of urea ( $P < 0.001$ ), and together with the higher Na intake elevated the renal solute load resulting in a linear increase on urine production ( $P < 0.001$ ), with a compensatory higher water intake ( $P = 0.013$ ). The urinary density, metabolic water, and the faecal and insensible water losses did not differ ( $P > 0.05$ ). The urine pH increased linearly with the CP and Na increase ( $P = 0.001$ ). The water flux increased linearly with the deuterium method ( $P < 0.001$ ), been higher ( $20.85 \pm 11.11$  mL/cat/day) than the verified with the WB method. Higher CP and Na amounts on dry diets increased urine production and water consumption of cats, being a possible option to be explored to increase urination. The stable isotope method is preferable to study water metabolism, as it does not alter the animal's life routine.

**Keywords:** deuterium, water balance, stable isotope

## **CAPÍTULO 1 – Considerações gerais**

### **INTRODUÇÃO**

No ano de 2017 o mercado *Pet* Brasileiro alcançou um faturamento de R\$20,3 bilhões, desses, o *pet food* representou 68,6% obtendo um crescimento de 9,9% em relação ao ano anterior, sendo o segmento *Pet* que mais se desenvolveu segundo a Associação Brasileira da Indústria de Produtos para Animais de Estimação - ABINPET (2018). Esses dados, incluindo o fato da população canina e felina do Brasil ser a segunda maior, somados à crescente demanda dos proprietários por alimentos industrializados que não somente forneçam nutrientes essenciais aos animais, mas também promovam melhorias na saúde, bem estar e reduza o risco do aparecimento de doenças, demonstram o potencial de crescimento e a importância econômica deste setor.

Esses aspectos tornam-se desafiadores para as indústrias *pet food*, porque além de formular alimentos completos e balanceados que objetivem somente nutrir, atualmente é necessário a disponibilização de rações no mercado que previnam doenças, entre elas a urolitíase, especialmente em gatos. Esses animais são mais predispostos à formação de urólitos por serem menos sensíveis à sede e desidratação, o que os leva à ingerirem menos água voluntariamente, concentrando a sua urina principalmente quando alimentados com dietas contendo baixa umidade (Anderson, 1982; Zoran, 2002; Wellman et al., 2007).

A predisposição à formação de urólitos pode ser correlacionada à fatores dietéticos e não dietéticos (KIENZLE et al., 1991; ZENTEK; SCHULZ, 2004). A dieta influência nas características da urina podendo atuar contribuir bem como prevenir a formação dos urólitos em felinos, mediante fatores como a composição de minerais, quantidade de hidroxiprolina, oxalato, fibras, aminoácidos sulfurados, proteínas e amido (Carciofi et al., 2005; Stevenson & Rutgers, 2006; Bartges & Kirk, 2012; Jeremias, 2013).

Sobre essa questão, algumas alternativas vêm sendo exploradas, como a modulação do pH urinário através da composição dietética, que torna-se um desafio pelo fato de ser necessário conciliar as medidas preventivas dos dois urólitos mais comuns (oxalato de cálcio e estruvita) que são em sua essência opostas, pois a estruvita associa-se a um pH mais alcalino enquanto o oxalato de cálcio a um pH ácido (Kienzle, Schuknecht & Meyer, 1991; Allen & Kruger, 2000; Zentek & Schulz, 2004; Carciofi & Jeremias, 2010; Jeremias et al., 2013). Outra forma seria aumentar a ingestão e a excreção renal de água, que podem diminuir a concentração de substâncias calculogênicas na urina, além de aumentar a frequência de micção, diminuindo a possibilidade de formação, a permanência e o desenvolvimento do urólito no trato urinário (Bartges, Osborne & Lulich, 2000; Bartges & Callens, 2015).

Alguns métodos para aumentar a excreção urinária em gatos são demonstradas em estudos, a forma mais simples consiste em alimentá-los com dietas com elevada umidade aumentando a ingestão hídrica e conseqüentemente a excreção (Anderson, 1982; Gaskell, 1985; Carciofi et al., 2005). Outras formas utilizadas, consiste em trabalhar sobre a formulação dos alimentos, como aumentar o teor de proteína, pois esta pode estar associada a maior ingestão total de água e volume urinário (Burger, Anderson & Holme, 1980; Wellman et al., 2007). A metabolização da proteína resulta no aumento dos níveis de ureia a qual eleva o tônus do filtrado glomerular e a osmolalidade da urina promovendo retenção de água (Hawthorne, & Markwell, 2004; Paßlack et al., 2014).

O aumento do sódio em dietas secas também torna-se uma alternativa a ser explorada (Hawthorne, & Markwell, 2004; Paßlack et al., 2014), pois irá atuar juntamente com outros eletrólitos no excesso de bases modificando o pH urinário principal fator relacionado a formação de urólitos (Kienzle & Wilms-Eilers, 1994; Wagner et al., 2006; Yamka et al., 2006).

Considerando-se o exposto, foi objetivo do presente estudo avaliar o efeito da proteína bruta, carboidratos e sódio de alimentos extrusados sobre o balanço de água corporal de gatos, utilizando-se os métodos de balanço hídrico convencional e a técnica de diluição isotópica.

## REVISÃO DE LITERATURA

### Importância da água

A água é a substância mais abundante dos seres vivos, constituindo de 60 a 70% do peso da maioria dos animais adultos saudáveis e, também, é o nutriente mais importante do corpo, considerada um nutriente essencial à sobrevivência, pois os animais podem viver após perderem quase toda gordura e mais da metade da proteína do corpo, porém uma perda de somente 10% da água corporal resulta em morte (Reece, 2006; Wellman et al., 2007; Case et al., 2011; Nelson & Cox, 2014).

Vários tecidos no corpo são compostos de 70% a 90% por água, ela também é o principal componente dos fluidos corporais, sendo que o fluido intracelular é aproximadamente 40% a 45% do peso corporal e o fluido extracelular é 20% a 25% (Case et al., 2011). Assim, participa da maior parte dos fenômenos fisiológicos, como a manutenção do tamanho das células, excitabilidade das membranas celulares, excreção de produtos residuais pelos rins, geração do impulso nervoso, entre outros (Reece, 2006; Wellman et al., 2007). Contudo, ela não é apenas o solvente no qual as reações químicas das células ocorrem, mas também, é participante direta dessas reações (Nelson & Cox, 2014).

Esse nutriente também é imprescindível para que possa ocorrer a utilização do alimento pelo corpo. A água é inicialmente necessária para a mastigação e deglutição do alimento, bem como para a digestão, os quais requerem homogeneização e translocação do bolo alimentar e fluidos pelo trato gastrointestinal, sendo essencial para hidrólise (que transforma grandes moléculas em pequenas) e para a secreção das enzimas digestivas. Além dessas funcionalidades, as suas propriedades físicas, como o calor latente de vaporização e a condutividade térmica, tornam a água extremamente importante para a transferência de calor do corpo para o meio ambiente. Essas características tornam a água capaz de absorver o calor gerado pelas reações metabólicas com o mínimo de aumento na temperatura corporal. Em temperaturas ambientais baixas, a água corporal atua como isolante conservando o calor do corpo, devido à essa elevada capacidade da água corporal em absorver calor (Case et al., 2011; Silva, 2011).

Apesar de toda sua importância e essencialidade, seu papel nas exigências nutricionais é pouco discutido, sendo geralmente ignorada nas formulações dietéticas e ofertada para cães e gatos separadamente do alimento (NRC, 2006). Atualmente mais de 95% dos alimentos comerciais para gatos no Brasil são alimentos secos extrusados. Estes apresentam baixíssima umidade, usualmente inferior a 10% como forma de conservação e para que apresentem crocância adequada (NRC, 2006), e altas quantidades de carboidratos que auxiliam na viscosidade da massa, no funcionamento da extrusora e na formatação do alimento (de Oliveira et al., 2008), porém a grande quantidade desse nutriente e baixa quantidade de água são contrárias aos hábitos alimentares desses animais, que consumiam no ambiente natural alimentos compostos por proteínas, gorduras e água, com muito baixo carboidrato (presas de origem animal) (Zoran, 2002).

### **Balanço hídrico**

Ao contrário dos cães, que mantêm a ingestão de água total uniforme quando a água proveniente do alimento é diminuída, aumentando proporcionalmente o consumo de água no bebedouro; os gatos podem não aumentar essa ingestão em quantidade suficiente para manter o consumo de total de água quando se alimentam com dietas contendo baixo teor hídrico, sendo que o consumo total de água pode ser 29% a 63% menor em comparação com o consumo de alimentos úmidos (Anderson, 1982; Carciofi et al., 2005; Wellman et al., 2007; Buckley et al., 2011; Thomas, Post, & Bosch, 2017). Aparentemente esses animais, por descenderem de felinos desérticos, são menos sensíveis ao mecanismo da sede (Anderson, 1982; Zoran, 2002).

A ingestão de água em animais sadios em ambiente termoneutro depende, assim, da composição e quantidade da dieta consumida (Wellman et al., 2007), sendo regulada na região hipotalâmica do encéfalo, por meio do mecanismo da sede. As mudanças na osmolaridade detectadas no local provocam desidratação celular, sede e o comportamento de ingestão hídrica. O sódio é o principal cátion do líquido extracelular, esses íons são impedidos de acumularem dentro das células, fazendo

aumentar a pressão osmótica no líquido extracelular, que provoca a difusão da água das células, fazendo-as diminuírem de volume (Reece, 2006).

O déficit hídrico causa a redução do volume do líquido extracelular e conseqüentemente sua concentração aumenta. Inicialmente o volume sanguíneo é protegido através do líquido intersticial e intracelular, mas a queda geral do volume do líquido extracelular é refletida pela queda no volume e pressão sanguínea, que são detectados por dois mecanismos associados ao sistema vascular: receptores de estiramento nas grandes veias e átrios cardíacos e também pelas células justaglomerulares liberadoras de renina nos rins. A renina participa da conversão do angiotensinogênio plasmático em angiotensina I. Depois, ao passar pelos capilares pulmonares as enzimas conversoras de angiotensina (ECA) realizam a sua conversão em angiotensina II. Os efeitos da angiotensina II, que incluem a vasoconstrição e a reabsorção de água e sódio pelos rins, ajudam a restabelecer o volume dos fluidos corporais (Thrasher et al., 1980; Reece, 2006; Wellman et al., 2007). Segundo Houpt (2006) em vários animais a angiotensina II provoca aumento da ingestão hídrica por um estímulo dos centros de sede no hipotálamo. O aumento na concentração osmótica e de sódio causam aumento da osmolalidade e estimulam o comportamento da sede e a liberação de outro hormônio, a vasopressina. Esse atua, juntamente com a angiotensina II, aumentando a permeabilidade dos néfrons à água, causando sua reabsorção e diminuição do volume de água excretada. A água ingerida dilui o líquido extracelular e restaura a concentração de sódio ao nível normal, restaurando a osmolalidade a níveis normais (Thrasher et al., 1980; Reece, 2006; Wellman et al., 2007).

Esse mecanismo está relacionado à manutenção do equilíbrio zero, em que a excreção diária de água, nutrientes e minerais nos animais sadios em repouso e ambiente termoneutro, é controlada pela ingestão diária dessas substâncias ou de seus subprodutos metabólicos. Nessa condição, o ganho é igual à perda e o volume de água adicionado aos fluidos corporais pelo consumo de alimento e água e pelo metabolismo é igual ao volume de água perdido na urina e fezes (perdas de água perceptíveis), bem como pela saliva, evaporação do epitélio cutâneo e respiratória (perdas de água imperceptíveis) (Wellman et al., 2007).

A necessidade de água de manutenção pode ser, assim, definida como o volume de água necessário diariamente para manter o animal em equilíbrio zero, composto pelas perdas diárias perceptíveis e imperceptíveis. Estas perdas, no entanto, não são fixas e são influenciadas pela temperatura e umidade do ambiente, pela atividade física do animal, por doença e pela composição da dieta. Em cães e gatos, a maior parte do nitrogênio e minerais absorvidos do alimento e que não são necessários para manter o equilíbrio zero ou para propiciar o desenvolvimento ou reparo tecidual são excretados na urina. O volume de urina necessário para excreção destes solutos depende da quantidade de soluto e da osmolalidade da urina. A carga de soluto renal é oriunda, desta forma, de proteínas e minerais da dieta (O'Connor & Potts, 1969; Wellman et al., 2007).

A perda de água pelos rins pode ser dividida em perda de água obrigatória, que corresponde a água necessária para excretar a carga diária de soluto renal, e perda de água livre, que não é acompanhada por soluto. A perda de água obrigatória ocorre mesmo que o animal esteja em situação de déficit hídrico relativo, pois é necessário que o soluto seja retirado do corpo, podendo ocasionar desidratação (Wellman et al., 2007).

O controle da excreção de água livre pelos rins é realizado pela vasopressina (ADH), que é secretada em maiores quantidades quando é detectado um aumento da osmolalidade corporal, permitindo a reabsorção de água livre pelos néfrons, assim, diminuindo o volume urinário e, posteriormente, provocando a sede. Durante a privação, ou ingestão de quantias reduzidas de água, a quantidade desse hormônio aumenta, devido ao aumento da osmolalidade no fluido extracelular, causando a diminuição do volume urinário, o contrário acontece quando é ingerida água suficiente para diluir o soluto corporal, protegendo o animal de hidratação excessiva e hipotonicidade (Robertson, 1983; Reece, 2006; Wellman et al., 2012), assim a excreção urinária está diretamente relacionada ao mecanismo da sede. Em cães o aumento de 1 a 3% da osmolalidade sérica é suficiente para estimular a sede (O'Connor, 1975; Wellman et al., 2012), em humanos de 1% a 2% (Robertson et al., 1976; Robertson, 1983) e em gatos não foram encontrados dados.

Para eliminação do soluto das fezes ocorre uma perda de água fecal obrigatória, que pode ser maior conforme aumenta o soluto fecal, principalmente em dietas contendo elevadas quantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , pois são pouco absorvidos no trato gastrointestinal (Wellman et al., 2012). Algumas fibras podem de aumentar o conteúdo de água das fezes, porque apresentam alta capacidade de retenção, ligando-se às moléculas de água (Loureiro, 2016).

As perdas imperceptíveis, ou insensíveis, correspondem à saliva, evaporação cutânea e respiratória, as perdas cutâneas são geralmente pequenas em cães e gatos pelo fato de suas glândulas sudoríparas estarem concentradas nos coxins plantares e não participarem da termorregulação. Em ambientes quentes, os gatos apresentam o comportamento de se lamberem, com a finalidade de diminuir a temperatura corporal através da evaporação da saliva, nesse caso, ocorre um aumento da necessidade de água (Reece, 2006; Wellman et al., 2012). Nos gatos saudáveis em ambientes termoneutros as perdas evaporativas geralmente são menores que de cães, provavelmente isso ocorre devido ao fato desses animais raramente manifestarem respiração ofegante. Em ambientes com temperatura em torno de  $40^{\circ}\text{C}$  a frequência respiratória dos cães aumenta de 12 a 20 vezes, enquanto que dos gatos aumenta 4,5 vezes e a perda de água por meio da respiração é de 469 mL/dia nos cães e de 41 mL/dia nos felinos (Wellman et al., 2012).

As entradas de água nos animais ocorrem através da ingestão, seja via alimento ou voluntária, e pela produção de água metabólica, essa, contribui com cerca de 10 a 15% no volume de água total consumida por cães e gatos, dependendo da dieta (Anderson, 1982; Wellman et al., 2012). Os nutrientes diferem em relação à produção de água metabólica, as gorduras fornecem o máximo de água por grama, enquanto os carboidratos propiciam o máximo de água por caloria e por litro de oxigênio. Assim, dietas com alto teor de carboidratos podem diminuir a necessidade de água a ser ingerida, por gerarem maior volume de água metabólica por caloria, além de, juntamente com as gorduras, reduzirem a perda renal obrigatória de água, devido ao fato de não gerarem soluto renal (Anderson, 1982).

A baixa ingestão de água via alimento causa uma diminuição do volume urinário produzido (Anderson, 1982; Carciofi et al., 2005), que propicia aumento na

concentração de solutos e juntamente com a diminuição da frequência de micção pode ocorrer a formação de cristais e cálculos (Bartges, Osborne & Lulich, 2000; Bargets & Callens, 2015). Alguns modos para proporcionar o aumento da ingestão de água pelos gatos vêm sendo estudados, dentre eles destacam-se o fornecimento de dietas úmidas (Anderson, 1982; Gaskell, 1985), fontes de água (Grant, 2010), dietas com alto teor de sódio (Kirk et al., 2006; Xu et al., 2009) ou proteína (Hashimoto et al., 1995).

A excreção urinária de gatos aumenta significativamente quando alimentados com dietas com elevada umidade (Gaskel, 1985). Carciofi et al. (2005) avaliaram os efeitos de 4 tratamentos: ração úmida enlatada; seca super-premium; seca econômica e seca econômica acrescida de 50% de água; no total de água ingerida, na água consumida através da alimentação, na ingestão voluntária de água, e na excreção fecal e urinária de água em gatos. Os resultados demonstraram que o alimento úmido aumentou o consumo total de água 37% em relação à dieta econômica e 50% em relação à super-premium, apesar de apresentarem uma menor ingestão voluntária de água quando comparados com as dietas secas, esse fato fez com que os animais excretassem mais água via urina, diminuindo sua densidade. Esse estudo também foi mostrou que a adição de água em dietas secas pode não aumentar a quantidade total de água ingerida pelos animais, pois cada grama de matéria seca ingerida resultou na ingestão de 2,4 mL de água quando os gatos consumiram a dieta econômica seca e 2,6 mL quando eles consumiram a dieta econômica acrescida de água.

O uso de fontes de água vem sendo apontado como um possível método para aumentar a ingestão hídrica (Forrester & Roudebush, 2007; Grant, 2010). No estudo de Grant (2010) em que foram utilizadas fontes para gatos domiciliados, o autor relata que houve aumento de 37% no consumo de água em relação à bebedouros, e que alguns proprietários observaram os animais brincando com a fonte, o que seria outro ponto positivo por, possivelmente, haver relação do estresse e do sedentarismo na recorrência de cistite idiopática (Buffington et al., 2006).

A elevada ingestão de sódio causa aumento na sua excreção renal, isso devido ao seu excesso causar expansão do volume do fluido extracelular e do sangue, por efeito do aumento da pressão osmótica e da retenção hídrica, assim, pela ação do

hormônio natriurético atrial, sua excreção pelos rins aumenta na tentativa de reduzir o volume do fluido para o normal (Kirk et al., 2006; Reece, 2006; Chandler, 2008; Waldrop, 2008; Wellman et al., 2012). Alguns estudos demonstraram o aumento do volume urinário utilizando o sódio em alimentos secos extrusados para gatos (Anderson, 1982; Hawthorne & Markwell, 2004; Luckschander et al., 2004; Kirk et al., 2006; Paßlack et al., 2014). No estudo de Anderson (1982) foram avaliados três alimentos secos (7% de umidade e 1,3; 3,6 e 4,6% de NaCl na matéria seca) contendo diferentes níveis de sal, um alimento enlatado (84% de umidade e 1,6% de NaCl na matéria seca) e um alimento com umidade intermediária (30% de umidade e 3,7% de NaCl na matéria seca). Os animais que consumiram a dieta úmida obtiveram 91% da ingestão total de água proveniente dela. A dieta contendo teor de sal semelhante à enlatada (1,3%) proporcionou uma ingestão total de água de apenas 49% em relação à com maior umidade. A ingestão total média de água (247 ml/dia) para o nível mais alto de sal não foi significativamente diferente do total de alimentos enlatados (266 ml/dia), esses dados demonstram que a utilização do sódio em dietas secas pode ser explorado para aumentar a ingestão e conseqüentemente a excreção água através dos mecanismos já mencionados.

As proteínas são polímeros de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (Nelson & Cox, 2014). Essas moléculas desempenham diversas funções: estruturais, bioquímicas, imunológicas e endócrinas. Todas as enzimas que catalisam as reações metabólicas e são primordiais para os processos digestivos são proteínas, além de vários hormônios envolvidos na homeostasia de vários sistemas (Case et al., 2011). As proteínas ingeridas através do alimento são hidrolisadas liberando os aminoácidos (Nelson & Cox, 2014). A desaminação dessas moléculas ocorre principalmente no fígado, podendo o amônio resultante ser convertido em ureia e posteriormente ser eliminado pelos rins (Reece, 2006; Klein, 2014). Cerca de dois terços da quantidade de soluto renal são representados pela ureia, portanto o aumento do conteúdo de proteína da dieta eleva a carga de soluto renal (Burger, Anderson & Holme, 1980; Wellman et al., 2012). Essa elevação de soluto no fluido tubular causa aumento da osmolalidade e hipertonicidade, como consequência ocorre a diminuição da reabsorção de água pelos rins e sua maior eliminação, resultando, conseqüentemente em maior volume de urina produzido e, como compensação induz maior ingestão de

água (Hashimoto et al, 1995). Foram verificados aumentos de 50% a 73% no consumo de água em gatos alimentados com alto teor protéico em comparação a um alimento seco com baixa proteína (Hashimoto et al., 1995; Wellman, Dibartola e Kohn, 2012; Mendonça et al., 2018).

Poucos estudos avaliaram o metabolismo da água em gatos (NRC, 2006), talvez porque a medição convencional do balanço hídrico em animais apresente algumas dificuldades, apesar de proporcionar um estudo mais detalhado, uma vez que utilizando essa metodologia é possível aferir cada componente da ingestão e da excreção de água, além de possuir um custo baixo. Embora aparentemente a determinação da excreção de água pela urina e pelas fezes seja relativamente simples, este procedimento não está isento de erros e requer a restrição dos animais a gaiolas de metabolismo (Anderson, 1982), interferindo potencialmente no metabolismo energético, produção endógena de água e excreção e no comportamento da ingestão de água. As perdas de água insensíveis pelos pulmões (respiração), através da lambida durante a higiene e pela pele são estimadas apenas com base nas diferenças entre a ingestão total de água (água potável, água do alimento e água metabólica produzida) e as perdas pela urina e água fecal, um procedimento que também pode ter erros e limitações. Nesse sentido, o método de diluição isotópica é potencialmente mais preciso, pois além de se distribuir da mesma forma que a água corporal (Haupt, 2006), traz resultados mais realistas, já que não interfere no comportamento animal e no gasto de energia, uma vez que os gatos não necessitam ficar alojados individualmente durante a avaliação. Porém, utilizando essa metodologia não há informações sobre cada item da entrada e saída de água do organismo.

### **Método da água marcada com isótopo de deutério**

Os isótopos são átomos de um mesmo elemento químico que apresentam o mesmo número de prótons e diferentes números de nêutrons, ou seja, possuem números de massa diferentes, as mesmas características químicas e diferentes propriedades físicas (Dawson & Brooks, 2001). Todas as formas de um elemento existem naturalmente e são estáveis, com exceção dos radioativos, quanto maior o

número de nêutrons de um isótopo mais radioativo ele se apresenta. A estabilidade caracteriza o isótopo como inócuo ao ambiente e à saúde dos animais e humanos, diferentemente de um isótopo instável, que apresenta potencial radioativo nocivo. Além dessa vantagem, o emprego desses isótopos estáveis como traçadores metabólicos possuem alta acurácia e precisão, e são pouco invasivos, podendo ser utilizados em estudos metabólicos de animais de vida livre (Ferriolli et al., 2008; Guidotti, 2013).

O isótopo de hidrogênio e/ou oxigênio quando inoculado dilui-se na água corporal do animal. A relação entre a quantidade conhecida do isótopo (dose) inoculada e sua concentração nos fluidos orgânicos permite estabelecer o volume de água corporal total. Com o acompanhamento do decaimento da concentração do isótopo nos fluidos corporais é possível obter o *turnover* da água corporal, a composição corporal e a produção de CO<sub>2</sub> (Lifson & Mcclintock, 1966; Ballevre et al., 1994; Schierbeek et al., 2009).

A eliminação do hidrogênio ocorre através da excreção de água na urina, fezes, saliva, evaporação cutânea e respiratória, enquanto que o oxigênio é perdido através da água e do CO<sub>2</sub> (Lifson & Mcclintock, 1966; Bellisle, 2001; Park et al., 2014). O deutério é, portanto, o marcador a ser utilizado em estudos sobre *turnover* hídrico, porém esse isótopo em especial realiza trocas com proteínas e gorduras, portanto o espaço de diluição do oxigênio-18 no corpo torna-se mais próximo da realidade. Assim, para aferir a rotatividade da água corporal pode-se utilizar a água duplamente marcada, utilizando para o cálculo o decaimento do deutério e o pool de água corporal calculado através do oxigênio, ou somente o deutério através do uso de um fator de correção (Ferriolli et al., 2008).

O uso de isótopos com o objetivo de obter dados sobre o fluxo de água, gasto energético e composição corporal vem sendo estudado em diversas espécies (Seefeldt & Chapman, 1979; Schoeller et al., 1986; Ballevre et al., 1994; Hendriks et al., 1999; Ferrier et al., 2002; Speakman & Król, 2005; Ahlstrøm et al., 2006; Schierbeek et al., 2009; Nie et al., 2015), sendo uma alternativa para mensurar esses parâmetros em animais sem alterar o seu comportamento natural.

Assim, este estudo foi idealizado com as hipóteses de que os animais alimentados com dietas com maiores teores de proteína e sódio apresentariam maior *turnover* de água corporal, enquanto os animais alimentados com a dieta com alto teor de carboidratos diminuiriam a quantidade de água ingerida e iriam produzir maior volume de água metabólica; e que haveria concordância entre as duas metodologias para mensuração do fluxo de água corporal: o balanço convencional e a técnica de diluição isotópica.

## REFERÊNCIAS

ABINPET - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE ESTIMAÇÃO. Disponível em: < <http://abinpet.org.br/site/mercado/> > Acesso em 10 de dezembro de 2018.

Ahlstrøm Ø, Skrede A, Speakman J, Redman P, Vhile SG, Hove K (2006) Energy expenditure and water turnover in hunting dogs: a pilot study. **The Journal of Nutrition** 136: 2063S-2065S.

Allen TA, Kruger JM (2000) Feline lower urinary tract disease. In: Hand MS, Tatcher CD, Remillard RL and Roudebush P (4 ed) **Small Animal Clinical Nutrition**. Missouri: Mark Morris Institute, p. 689-724.

Anderson RS (1982) Water balance in the dog and cat. **Journal of Small Animal Practice** 23: 588-598.

Balleve O, Anantharaman-Barr G, Gicquello P, Piguet-Welsh C, Thielin AL, Fern E (1994) Use of the doubly-labeled water method to assess energy expenditure in free living cats and dogs. **The Journal of Nutrition** 124: 2594S-2600S. doi: 10.1093/jn/124.suppl\_12.2594S

Bartges JW, Callens AJ (2015) Urolithiasis. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice** 45: 747-768.

Bartges JW, Kirk CA (2012) Nutritional management of lower urinary tract disease. In: Fascetti AJ, Delaney SJ **Applied Veterinary Clinical Nutrition**. Davis, California, p. 269-288.

Bartges JW, Osborne CA, Lulich JP (2000) Prevalence of cystine and urate uroliths in bulldogs and urate uroliths in dalmatians. **Journal of the American Veterinary Medical Association** 204: 1914-1918

Bellisle F (2001) The doubly-labeled water method and food intake surveys: a confrontation. **Revisão Nutrição** 14: 125-133.

Buffington CT, Westropp JL, Chew DJ, Bolus RR (2006) Clinical evaluation of multimodal environmental modification (MEMO) in the management of cats with idiopathic cystitis. **Journal of Feline Medicine and Surgery** 8: 261-268.

Burger IH, Anderson RS, Holme DW (1980) Nutritional factors affecting water balance in the dog and cat. In: Anderson RS **Nutrition of the dog and cat**. Oxford: Pergamon Press, p. 145.

Carciofi AC, Bazolli RS, Zanni A, Kihara LRL, Prada F (2005) Influence of water content and the digestibility of pet foods on the water balance of cats. **Brazilian Journal Veterinary Research Animal Science** 42: 429-434.

Carciofi AC, Jeremias JT (2010) Progresso científico sobre nutrição de animais de companhia na primeira década do século XXI. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 39: 35-41.

Case LP, Daristotle L, Hayek MG, Raasch MF (2011) **Canine and Feline Nutrition: A Resource for Companion Animal Professionals** (3th ed). Missouri: Elsevier, 562 p.

Chandler ML (2008) Pet food safety: sodium in pet foods. **Topics in companion animal medicine** 23: 148-153.

Da Silva JFC (2011) Mecanismos reguladores de consumo. In: Berchielli TT, Pires AV, De Oliveira SG (2nd ed) **Nutrição de Ruminantes Jaboticabal**: Funep, p. 61-82.

Dawson TE, Brooks PD (2001) Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. In: **Stable isotope techniques in the study of biological processes and functioning of ecosystems** Dordrecht, Springer, p. 1-18.

De Oliveira LD, Carciofi AC, Oliveira MCC, Vasconcellos RS, Bazolli RS, Pereira GT, Prada F (2008) Effects of six carbohydrate sources on diet digestibility and postprandial glucose and insulin responses in cats. **Journal of Animal Science** 86: 2237-2246.

Ferrier L, Robert P, Dumon H, Martin L, Nguyen P (2002) Evaluation of body composition in dogs by isotopic dilution using a low-cost technique, Fourier-transform infrared spectroscopy. **The Journal of Nutrition** 132: 1725S-1727S.

Ferriolli E, Cruz BM, Pfrimer K (2008) Uso de Isótopos Leves em Ciências Nutricionais. In: Dutra De-Oliveira JE, Marchini JS (2nd ed) **Ciências Nutricionais: Aprendendo a Aprender** São Paulo: Sarver, p. 442-465.

Forrester SD, Roudebush P (2007) Evidence-based management of feline lower urinary tract disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 37: 533-558.

Gaskell CJ (1985) Nutrition in diseases of the urinary tract in the dog and cat. **Veterinary Annual** 25: 383-390.

Grant DC (2010) Effect of water source on intake and urine concentration in healthy cats. **Journal of Feline Medicine & Surgery** 12: 431-434.

Guidotti S, Meijer HAJ, Dijk GV (2013) Validity of the doubly labeled water method for estimating CO<sub>2</sub> production in mice under different nutritional conditions. **American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism** 305: E317-E324.

Hashimoto M, Funaba M, Abe M, Ohshima S (1995) Dietary protein levels affect water intake and urinary excretion of magnesium and phosphorus in laboratory cats. **Experimental Animals** 44: 29-35. doi: 10.1538/expanim.44.29

Hawthorne AJ, Markwell PJ (2004) Dietary sodium promotes increased water intake and urine volume in cats. **The Journal of Nutrition** 134: 2128S-2129S.

Hendriks WH, Wamberg SW, Tarttelin MF (1999) A metabolism cage for quantitative urine collection and accurate measurement of water balance in adult cats (*Felis catus*). **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition** 82: 94-105. doi: 10.1111/j.1439-0396.1999.00214.x

Haupt R (2006) Água e eletrólitos. In: Reece WO **Dukes: fisiologia dos animais domésticos** (12.ed) São Paulo, Guanabara, p. 11-23.

Jeremias JT (2013) **Balço de macromelementos da dieta e supersaturação relativa da urina para oxalato de cálcio, equilíbrio ácido-básico e metabolismo ósseo de gatos adultos**. 89 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Unesp, Jaboticabal.

Jeremias JT, Nogueira SP, Brunetto MA, Pereira GT, Loureiro BA, Ferreira CS, Gomes MOS, Carciofi AC (2013) Predictive formulas for food base excess and urine pH estimations of cats. **Animal Feed Science and Technology**. 182: 82-92. doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.04.003

Kienzle E, Wilms-Eilers SK (1994) Struvite diets in cats: effect of ammonium chloride and carbonates on acid base balance of cats. **American Institute of Nutrition** 22: 3166-3194.

Kirk CA, Jewell DE, Lowry SR (2006) Effects of sodium chloride on selected parameters in cats. **Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine** 7: 333-346.

Klein BG (2015) **Cunningham: Tratado de Fisiologia Veterinária**. (5th ed) Brasil, Elsevier, 624 p.

Lifson N, McClintock R (1966) Theory of use of the turnover rates of body water for measuring energy and material balance. **Journal of Theoretical Biology** 12: 46-74.

Loureiro BA (2016) **Fibra, metabolismo ácido-básico e balanço de macroelementos em gatos**. 83 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Unesp, Jaboticabal.

Luckschander N, Iben C, Hosgood G, Gabler C, Biourge (2004) Dietary NaCl does not affect blood pressure in healthy cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine** 18: 463-467.

Mendonça FS, Pedreira RS, Loureiro BA, Putarov TC, Monti M, Carciofi AC (2018) Hydroxyproline and starch consumption and urinary supersaturation with calcium oxalate in cats. **Animal Feed Science and Technology** 246: 72-81. doi: 10.1016/j.anifeedsci.2018.10.001

Markwell PJ, Buffington CT, Smith BHE (1998) The effect of diet on lower urinary tract diseases in cats. **Journal of Nutrition** 128: 2753s-2757s.

National Research Council – NRC. (2006). **Nutrient requirements of dogs and cats**. The National Academy Press, Washington, DC.

Nelson DL, Cox MM (2014). Oxidação de aminoácidos e produção de ureia. In: Nelson DL and Cox MM (6th ed) **Princípios de Bioquímica de Lehninger** Porto Alegre: Artmed, p. 695-730.

Nie Y, Speakman JR, Wu Q, Zhang C, Hu Y, Xia M, Yan L, Hambly C, Wang L, Wei W, Zhang J, Wei F (2015) Exceptionally low daily energy expenditure in the bamboo-eating giant panda. **Science** 349: 171-174.

O'Connor WJ, Potts DJ (1969) The external water exchanges of normal laboratory dogs. **Quarterly Journal of Experimental Physiology and Congnate Medical Sciences** 54: 244-265.

O'Connor WJ (1975) Drinking by dogs during and after running. **The Journal of physiology** 250: 247-259.

Park J, Kazuko IT, Kim E, Kim J, Yoon J (2014) Estimating free-living human energy expenditure: Practical aspects of the doubly labeled water method and its applications. **Nutrition Research and Practice** 8: 241-248.

Paßlack N, Burmeier H, Brenten T, Neumann K, Zentek J (2014) Short term effects of increasing dietary salt concentrations on urine composition in healthy cats. **The Veterinary Journal** 201: 401-405. doi:10.1016/j.tvjl.2014.04.015

Reece WO (2006) **Dukes: fisiologia dos animais domésticos** (12.ed) São Paulo, Guanabara, 954 p.

Robertson GL, Shelton RL, Athar S (1976) The osmoregulation of vasopressin. **Kidney international** 10: 25-37.

Robertson GL (1983) Thirst and vasopressin function in normal and disordered states of water balance. **The Journal of laboratory and clinical medicine** 101: 351-371.

Schierbeek H, Rieken R, Dorst KY, Penning C, Van Goudoever JB (2009) Validation of deuterium and oxygen-18 in urine and saliva samples from children using on-line continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry** 23: 3549-3554.

Schoeller DA, Ravussin E, Schutz Y, Acheson KJ, Baertschi P, Jequier E (1986) Energy expenditure by doubly labeled water: validation in humans and proposed calculation. **American Journal of Physiology** 250: R823-R830.

Seefeldt SL, Chapman TE (1979) Body water content and turnover in cats fed dry and canned rations. **American Journal of Veterinary Research** 40: 183-185.

Speakman JR, Król E (2005) Comparison of different approaches for the calculation of energy expenditure using doubly labeled water in a small mammal. **Physiological and Biochemical Zoology** 78: 650-667.

Stevenson A, Rutgers C (2006) Nutritional management of canine urolithiasis. In: Pibot P, Biourge V, Elliott D (Eds) **Encyclopedia of Canine Clinical Nutrition**. Aimargues: Aniwa SAS, p. 284-315.

Thomas DG, Post M, Bosch G (2017) The effect of changing the moisture levels of dry extruded and wet canned diets on physical activity in cats. **Journal of Nutrition Science** 6: 1-5. doi:10.1017/jns.2017.9

Thrasher TN, Brown CJ, Keil LC, Ramsay DJ (1980) Thirst and vasopressin release in the dog: an osmoreceptor or sodium receptor mechanism? **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology** 238: R333-R339.

Wagner E, Keisch CH, Iben CH (2006) Influence of the feed base excess on urine parameters in cats. **Journal Of Animal Physiology And Animal Nutrition** 90: 10-24.

Waldrop JE (2008) Urinary electrolytes, solutes, and osmolality. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice** 38: 503-512.

Wellman ML, DiBartola SP and Kohn CW (2012) Applied physiology of body fluids in dogs and cats. In: DiBartola, SP (4th ed.). **Fluid, electrolyte and acid-base disorders in small animal practice** Missouri: Elsevier Saunders, p. 2-23.

Wellman ML, DiBartola SP, Kohn CW (2007) Fisiologia Aplicada de Fluidos Corporais em Cães e Gatos. In: DiBartola SP (1 ed) **Anormalidades de Fluidos, Eletrólitos e Equilíbrio Ácido-Básico na Clínica de Pequenos Animais**. São Paulo: Roca, p. 3-25.

Xu H, Laflamme DP, Long GL (2009) Effects of dietary sodium chloride on health parameters in mature cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery** 11: 435-441.

Yamka RM, Friesen KG, Schakenraad H (2006) The prediction of urine pH using dietary cations and anions in cats fed dry and wet foods. **Journal Appl Research Veterinary Medicine** 44: 58-66.

Zentek J, Schulz A (2004) Urinary composition of cats is affected by the source of dietary protein. **The Journal of Nutrition** 134: 2162S-2165S.

Zoran DL (2002) The carnivore connection to nutrition in cats. **Journal American Veterinary Medicine Association** 221: 1559-1567.

**CAPÍTULO 2 - Crude protein and sodium intake effects on water turnover of cats fed extruded diets**

Artigo científico apresentado nas normas do **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**

1 **Crude protein to starch ratio and sodium intake effects on water turnover of cats fed**  
2 **extruded diets\***

3

4

5

6 Running head: Protein and sodium on water turnover in cats

7

8

9

10 C. A. Garcia, B. A. Loureiro, F. M. Peres, C. Goloni, L. G. Di Santo, F. S. Mendonça, A. C.

11 Carciofi

12

13

14 São Paulo State University (Unesp), School of Agricultural and Veterinarian Sciences,

15 Jaboticabal, SP, 14884-900, Brazil

16

17

18 \*Part of the results of this manuscript were presented at the 22<sup>st</sup> Congress of the European

19 Society of Veterinary and Comparative Nutrition, Munich, Germany, September 2018

20

21 **Correspondence** Dr. A. C. Carciofi, Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária,

22 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Via de Acesso Prof. Paulo

23 Donato Castellane, s/n, 14884-900, Jaboticabal, SP Brazil. Tel: +55 16 3209 2626; Fax: +55 16

24 3203 1226; E-mail: [aulus.carciofi@gmail.com](mailto:aulus.carciofi@gmail.com)

25

## 26 **Acknowledgements**

27       The authors would like to thank CNPq for the fellowship for the first author (C.A. Garcia),  
28 to FAPESP for the project funding (FAPESP project number 2013/20340-0), to Affnity PetCare  
29 (Campinas, Brazil) for the financial and technical support to Laboratory of Research in  
30 Nutrition and Nutritional Diseases of Dogs and Cats “Prof. Dr. Flávio Prada”, to Manzoni  
31 Industrial Ltda. (Campinas, Brazil) for the donation of the extruder used in the study, and to the  
32 Laboratory of Mass Spectrometry of the Faculty of Medicine of USP (Ribeirão Preto, Brazil).

33

## 34 **Summary**

35 Strategies to increase urine production may be important for the prevention of urolithiasis,  
36 especially in cats fed dry kibble diets. The effects of extruded diets intake with increasing  
37 amounts of crude protein (CP) and sodium (Na) were evaluated on the water turnover of cats,  
38 comparing the traditional water balance method and the deuterium dilution technique. The  
39 study followed a randomized block design, with three blocks of eight cats, two cats per food in  
40 each block, and six cats per food. Extruded diets with different amounts of CP and Na were  
41 evaluated: 28% CP and 0.58% Na; 39% CP and 0.64% Na; 52% CP and 0.76% Na; 64% CP  
42 and 0.87% Na. After adaptation, the cats were housed individually for 8 days to measure water  
43 balance (WB), urea excretion, and faeces and urine characteristics. Deuterium oxide was  
44 additionally used to evaluate water turnover, with cats housed in a collective cattery. Data were  
45 analysed by F test and means compared by polynomial contrasts ( $P<0.05$ ). The methods were  
46 compared by Pearson correlation, Bland and Altman analysis and Student’s t test. The increase  
47 on CP elevated linearly the renal excretion of urea ( $P<0.001$ ), and together with the higher Na  
48 intake elevated the renal solute load resulting in a linear increase on urine production ( $P<0.001$ ),  
49 with a compensatory linear increase on water intake ( $P=0.013$ ). The urine density, metabolic

50 water, and faecal and insensible water losses did not differ ( $P>0.05$ ). Urine pH increased  
51 linearly with the CP and Na increase ( $P=0.001$ ). The water flux increased linearly with the  
52 deuterium method ( $P<0.001$ ), obtaining higher values ( $20.85\pm 11.11$  mL/cat/day) than the  
53 verified for the WB method ( $P=0.001$ ). Higher CP and Na amounts on dry diets increased urine  
54 production and water consumption of cats, being a possible option to be explored to increase  
55 urination.

56 **Keywords** deuterium, stable isotope, urine production, water balance

57

## 58 **Introduction**

59 Due to the physiological peculiarities of cats on the water balance, the intake of dry diets  
60 might result in the production of low volume and concentrated urine, as cats do not fully  
61 compensate the low water intake by food drinking more water (Walker et al., 1977; Anderson,  
62 1982; Gaskell, 1985; Wellman, Dibartola, & Kohn, 2012). When fed dry diets the total water  
63 intake of cats might be 29% to 63% lower in comparison with the consumption of wet foods  
64 (cans and pouches), and the water balance is maintained by the reduction of the renal water  
65 excretion (Anderson, 1982; Carciofi et al., 2005; Buckley et al., 2011; Thomas, Post, & Bosch,  
66 2017). This condition has been imputed as possible risk factor for the development of clinical  
67 presentations of the lower urinary tract diseases in cats (Walker et al., 1977; Buffington et al.,  
68 1997). It is considered that a low urine volume result in an increased solute concentration to  
69 excrete minerals and metabolism end products, with a possible decrease on urination frequency,  
70 factors that together are incriminated to favor crystals and calculi formation (Bartges, & Kirk,  
71 2006; Bargets, & Callens, 2015). This relationship, however, is not fully established due the  
72 several causative factors suggested for this condition (Bartges et al, 1999; Bartges, & Callens,

73 2015), as many other dietary factors also influence urine volume, pH and chemical composition  
74 (Zentek, & Schulz, 2004; Stevenson, & Rutgers, 2006; Bartges, & Kirk, 2012; Jeremias et al.,  
75 2013; Paßlack, Brenten, Neumann & Zentek, 2014a; Mendonça et al., 2018; Paßlack, Kohn,  
76 Doherr & Zentek, 2018).

77 Thus, dietary interventions to increase urine production has long time been suggested as  
78 part of the strategies to prevent urolith formation, especially in cats fed dry diets (Markwell,  
79 Buffington, & Smith, 1998; Hawthorne, & Markwell, 2004; Bartges, 2016). An increase in  
80 renal water excretion may lead to a reduction in the concentration of calculogenic substances,  
81 decreasing urine saturation, besides may increase the frequency of urination, reducing the  
82 probability of formation, permanence, and growth of the crystal (Markwell et al., 1998). Several  
83 nutritional interventions have been proposed to promote water intake and urine production  
84 (Seefeldt And Chapman, 1979; Gaskell, 1985; Buckley et al., 2011). In an adult cat at  
85 maintenance, most of the absorbed protein end excreted by kidneys, mainly as urea. On the  
86 tubular fluid, urea increase osmolality and water retention, with higher urine volume  
87 (Hashimoto, Funaba, Abe & Ohshima, 1995; Funaba et al., 1996; Lekcharoensuk et al., 2001)  
88 compensated by higher water intake (Wellman et al., 2012). In a publication, increases from  
89 50% to 73% on water consumption were verified in cats fed high protein in comparison to a  
90 low protein dry food (Hashimoto et al., 1995; Wellman et al., 2012; Mendonça et al., 2018).

91 Increase on dietary sodium was also suggested (Anderson, 1982; Hawthorne & Markwell,  
92 2004), as sodium is known to increase water renal excretion and consumption (Luckshander et  
93 al., 2004; Paßlack, Burmeier, Brenten, Neumann & Zentek, 2014b). Although some concerns  
94 about the safety of high dietary sodium intake and the heart and kidney health, the scientific  
95 evidence of this is low with a relatively broad margin of safety to explore (Luckschander, Iben,  
96 Hosgood, Gabler & Biourge, 2004; Reynolds et al., 2013; Chetboul et al., 2014). According to

97 FEDIAF (2018) scientific data show that sodium levels up to 1.5 % DM (3.75 g/1000 kcal ME  
98 or 0.90 g/MJ ME) are safe for healthy cats.

99         Few studies evaluated the water metabolism of cats (NRC, 2006), maybe because the  
100 conventional measurement of the water balance in animals present some difficulties. Although  
101 apparently the determination of water excretion by urine and feces is relatively simple, this  
102 procedure is not free of errors, and requires the restriction of the animals to metabolism cages  
103 (Anderson, 1982), potentially interfering on energy metabolism, endogenous water production  
104 and excretion, and on the water intake behavior. The insensible water losses by lungs (breath),  
105 hair licking during hygiene, and skin are only estimated, based on the differences of urine and  
106 fecal water from the total water intake (drinking water, water intake by food, and metabolic  
107 water produced), a procedure that also may have errors and limitations. In this regard the isotope  
108 dilution method is potentially more accurate, bringing more realist results, as it does not  
109 interfere on animal behavior and energy expenditure as cats are note restricted during the  
110 evaluation (Roberts et al., 1986; Tiebout, & Nagy, 1991; Hendriks, Wamberg, & Tarttelin,  
111 1999). Considering this, in the present study the effects of crude protein, starch and sodium  
112 intake were evaluated on the water balance of cats fed extruded diets, comparing for this the  
113 conventional water balance method and the isotope dilution technique.

114

## 115 **Material and Methods**

116         All procedures with animals followed the ethical principles adopted by the Brazilian  
117 College of Animal Experimentation and were previously approved by the Ethics Committee on  
118 the Use of Animals (protocol nº 6.185/16) of the São Paulo State University (Unesp), School  
119 of Agricultural and Veterinarian Sciences, Jaboticabal, Brazil.

120

121 *Experimental design, animals and management*

122         The experiment was conducted on the Laboratory of Research in Nutrition and Nutritional  
123 Diseases of Dogs and Cats “Prof. Dr. Flávio Prada”, School of Agricultural and Veterinarian  
124 Sciences (UNESP), Jaboticabal, Brazil. The mean temperature on the experimental period was  
125  $22.1 \pm 2.6$  °C. Twenty-four neutered female cats, with  $3.6 \pm 0.9$  years and  $3.9 \pm 0.6$  kg of body  
126 weight were used. Prior to the experiment the health of the animals was verified by physical  
127 examination, blood and biochemical analysis, and urine analysis, and all were considered  
128 healthy. The study included 4 diets and followed a randomized block design, with three blocks  
129 of eight cats, two cats per food in each block, totalling six repetitions (cats) per treatment. The  
130 blocking factor was time, due to available research structure. Each block lasted 51 days: days  
131 1 to 15 for diet adaptation; 16 to 23 for faeces and urine collection; 24 to 39 for measurement  
132 of energy expenditure (data not shown); 40 to 51 for the isotope technique development.

133         During diet adaptation period and the application of the isotope technique, cats were  
134 individually kept for 16 hours (from 16:00 to 08:00) in 80 x 80 x 100 cm individual stainless  
135 steel cages. From 08:00 to 16:00, animals remained in a collective cattery for exercise and  
136 socialization. During the urine and faeces collection period, cats were restricted all day to their  
137 individual cages. Animals were fed when restricted to their cages, and water was available *ad*  
138 *libitum*. The amounts of offered food was initially established considering the records of energy  
139 intake to constant body weight of each cat utilized ( $60.01 \pm 1.3$  kcal/kg<sup>0.67</sup>/day), and the  
140 metabolizable energy content of each diet estimated by their chemical composition (NRC,  
141 2006). Cats were then weakly weighted, and the amount provided adjusted to animals achieve  
142 a constant body weight during the experiment.

143

144 *Formulation and production of the experimental diets*

145 Four complete diets were formulated with similar contents of energy, whose chemical  
146 compositions followed the nutritional recommendations for adult cats of the NRC (2006). The  
147 diets were formulated to present increasing amounts of crude protein and sodium (Table 1).  
148 Due to this only the combined effect of both nutrients was evaluated, been not possible to  
149 separate the crude protein and the sodium effects on water metabolism. The concurrent increase  
150 of crude protein and sodium is explained due the use of soy-isolated protein to increase dietary  
151 protein content, as this ingredient present high sodium content (around 1.2%) due to the use to  
152 sodium hydroxide during protein isolation.

153 Diets were produced at the Extrusion Laboratory of the School of Agricultural and  
154 Veterinarian Sciences (UNESP), Jaboticabal, Brazil. The ingredients were mixed and ground  
155 in a hammer mill (Sistema Tigre de Mistura e Moagem, Moinhos Tigre, São Paulo, Brazil)  
156 fitted with a sieve screen size of 0.8 mm, and then extruded in a single screw extruder (MEX  
157 250, Manzoni, Campinas, Brazil), with a production capacity of 250 kg/h. The extruder pre-  
158 conditioner temperature was maintained by direct steam injection above 90°C. Water, steam,  
159 and screw speed was adjusted according to each diet formulation. Raw material flow was kept  
160 constant. After system stability each 20 minutes was recorder the motor amperage, and the  
161 density (g/L) of the extrudates out extruder and dryer. After extrusion, the kibbles were dried  
162 in a two belt dryer with forced air, heated to 105°C and subsequently covered with fats and  
163 palatants. The analyzed chemical composition of the foods is presented on Table 2.

164

#### 165 *Water balance, nutrient digestibility, and urine characteristics*

166 The water balance by conventional methodology and the coefficients of total tract  
167 apparent digestibility (CTTAD) of nutrients was assessed by the total collection of faeces and  
168 urine method. Cats were individually housed during 8 days in metabolic cages with apparatus

169 to separate faeces and urine for collection. The offered amounts and the leftovers of food and  
170 water were daily weighted to calculate intake. A blank was used to estimate water loss by  
171 evaporation from the drinking bowl, the same volume of water was placed in a similar drinking  
172 bowl as the cats and exposed to the environment. The difference in weight at the start and end  
173 was considered the evaporated water, which was discounted to the water leftover of cats to  
174 calculate water intake. Faeces was quantitative collected at least twice a day, weighted and kept  
175 at -20°C until analysis. During collection faecal samples were scored according to the following  
176 system (Carciofi et al., 2008): 1 = watery – liquid that can be poured; 2 = soft, unformed – stool  
177 assumes shape of container; 3 = soft, formed, moist – softer stool that retains shape; 4 = hard,  
178 formed, dry stool – remains firm and soft; 5 = hard, dry pellets – small, hard mass. Urine was  
179 collected twice a day in plastic bottles with 100 mg of thymol as a preservative and kept under  
180 refrigeration (4 °C). Each 24 h-pooled urine sample of a cat was homogenized, and the volume,  
181 density, and pH determined. A composite sample of each cat urine was acidified (1 mL of 6 N  
182 HCl for each 50 mL of urine) and stored at -20°C for urea analysis.

183       The water balance calculations included the water intake via drinking bowl, the water  
184 intake via food, the calculated metabolic water generated, the total water intake (sum of the first  
185 three parameters), the water excretion via faeces, the water excretion via urine, the insensible  
186 water losses, and the total water excretion (sum of the three previous parameters). The  
187 metabolic water generated was calculated by multiplying the consumed amount of digestible  
188 starch by 0.566, digestible protein by 0.396, and digestible fat by 1.071 (Buffington and Chew,  
189 1998). The insensible water losses consisted of the sum of breath, cutaneous, salivary losses of  
190 water, calculated indirectly by the difference between the total water intake and the sum of  
191 faeces and urine water excretion (Carciofi et al., 2005).

192           The urine density was measured using a digital refractometer (T2-Ne Clinical; ATAGO  
193 CO., LTD.; Fujita Yorii-cho Osato gun, Saitama, Japan). Urine pH was measured whit a digital  
194 pH meter (Digimed DM20, Digicrom Analytical, São Paulo, Brazil). To evaluate the 24 h urea  
195 excretion, urine samples were thawed and homogenized, and urea analyzed using a commercial  
196 kit (Blood Urea Nitrogen Kit No. 535-B, Sigma, St. Louis, MO) in a spectrophotometer  
197 (Labquest, Labtest Diagnostica S.A, Lagoa Santa, MG, Brazil).

198           To analyze faecal water excretion and CTTAD of nutrients, faeces were thawed,  
199 homogenized, and pooled by cat, and dried in a forced-air oven (Fanem, São Paulo, Brazil) at  
200 55°C for 72 h. Faeces and diets were them ground (MOD 340; ART LAB, São Paulo, Brazil)  
201 and analyzed according to AOAC (2010) for dry matter (DM) by oven drying of the sample  
202 (934.01), crude protein (CP) using a LECO nitrogen/protein analyzer (FP-528, LECO  
203 Corporation, Saint Joseph, USA) (method 990.03), and total fat by the acid-hydrolyzed fat  
204 method (954.02). Starch was determined according to Hendrix (1993). In addition, food  
205 samples were analyzed for calcium, phosphorus and sodium. Extracts were prepared by wet  
206 digestion with nitro-perchloric solution, and Ca and Na analyzed with an atomic-absorption  
207 spectrophotometer (Model GBC-932 AA; Scientific Equipment PTY LTD, Melbourne,  
208 Australia). Phosphorus was determined in a spectrophotometer using the vanadate-molibdate  
209 method (model B442; Micronal, Brazil) (AOAC, 2010). All samples were analyzed in duplicate  
210 and repeated when the variation was greater than 5% between replicates.

211

#### 212 *Isotope dilution technique*

213           For 12 days (from days 40 to 51 of each block), cats were individually housed in cages  
214 for 16h and released on a collective cattery for 8h a day. On the first day an approximate dose  
215 of 0.12g of deuterium (H<sup>2</sup>) solution at 99.9 atm% (Sercon Limited, Unit 3B Crewe Trade Park,

216 Gateway, Crewe, Cheshire, UK) per kg of body water was injected on each cat (Ferriolli, Cruz,  
 217 & Pfrimer, 2008). The solution was subcutaneous applied between the scapula, after 12h fasting  
 218 and 4h without water. To increase the study precision, the empty syringe, the syringe with the  
 219 isotope solution, and the syringe after solution inoculation was weighted in a scale Ferriolli et  
 220 al., 2008). Blood samples were collected before H<sup>2</sup> inoculation, after 5h to study the enrichment,  
 221 and after 6, 9, and 12 days to evaluate the decay. Cats were physically restrained (all animals  
 222 were adapted for the procedure) and 3 mL of blood were draw by direct jugular puncture.  
 223 Samples were placed on vacutainers without anticoagulant (BD Vacutainer, New Jersey, EUA),  
 224 and centrifuged (Inbras, Jardinópolis, São Paulo, Brazil) to obtain serum. Serum was stored on  
 225 cryotubes with screw cap sealed with paraffin, at -20°C until analysis. The body mass of cats  
 226 to calculations and to control the body mass along the study was stablished at each seven days,  
 227 always at the same time. The scale precision was assessed using certified weights (INMETRO:  
 228 certified weights form 10 g to 1 kg OIML E1/2004). The H<sup>2</sup> concentration was analyzed at the  
 229 Mass Spectrometry Laboratory of the Ribeirão Preto Medical School, São Paulo, Brazil, by  
 230 isotope ratio mass spectrometry (ANCA 20-20, Europe Scientific, UK), following procedures  
 231 described by Ferriolli et al. (2008). Samples was processed in triplicate (100 µL per replicate)  
 232 with platinum in vacutainers, after 6h resting.

233 To calculate water turnover the equation proposed by Lifson & McClintock (1966) was  
 234 used:

$$235 \quad WTR = k_d \times N \times 18.02$$

236 Where: WTR = turnover rate of body water in ml per day; kd = deuterium elimination  
 237 rate; N = pool of body water (mols).

238

239 The pool of body water was calculated as (Schoeller, 2005):

240 
$$N \text{ (mols)} = \left( \frac{WA}{18.02a} \right) \times \frac{(\delta a - \delta t)}{(\delta s - \delta p)} f$$

241 Where: N = pool of body water (mols); W= amount of water used to dilute the dose; A=  
 242 administered dose; a= dose for analysis;  $\delta$ = dose enrichment (a), water enrichment (t), sample  
 243 enrichment (s) and (p) enrichment of the pre-dose sample; f = correction factor (adopted as 1.06  
 244 based on previous studies of the laboratory).

245

246 The deuterium elimination rate was calculated by the equation proposed by Schoeller et  
 247 al. (1986):

248 
$$k(d^{-1}) = \frac{\ln X(t1) - \ln X(t2)}{(t2 - t1)}$$

249 where: k = decay constant; ln = natural logarithm; X (t1) = collect point of isotope  
 250 enrichment; X (t2) = last point of collection; t1 = day 1; t2 = last day of collection.

251

252 The calculations were based on a two-point equation. As the decay was evaluated on  
 253 days 6, 9, and 12, the mean value was used for calculation.

254

### 255 *Statistical analysis*

256 After obtaining the means, the assumptions of homogeneity of variances and normality  
 257 of the errors were verified. Data was submitted to variance analysis, considering the effects of  
 258 diet, block and animals. The experimental unit was considered one cat, with six repetitions per  
 259 treatment. When differences were detected in the F test, means were compared by polynomial  
 260 contrasts as a function of the protein and Na content of the diets. The confidence intervals of  
 261 agreement were determined as the bias (mean difference)  $\pm$  1.96 SD of the water turnover  
 262 estimated by the conventional water balance method and the isotope dilution technique,

263 according to Bland and Altman (1986). The means value of each methodology were also  
264 compared using the paired Student's t test and the Pearson correlation. For all tests was  
265 considered a 5% of significance. The analysis was performed with SAS software (version 9.4,  
266 SAS Institute, Cary, NC, USA).

267

## 268 **Results**

269 Foods were appropriately accepted by cats during the experiment, without differences  
270 on DM intake (Table 3). The mean body weight and water of the cats did not differ between  
271 diet groups ( $P>0.05$ ). All animals remained healthy throughout the experimental period, with  
272 no episodes of gastrointestinal disturbances or altered behavior. All faeces produced were  
273 adequate, but a linear increase on faecal score (firmer faeces) and DM content, and a linear  
274 reduction on the amount of faeces produced were verified with the consumption of the diets  
275 with increased concentration of crude protein and sodium ( $P<0.05$ ).

276 According to diet composition, a linear increase on cats' crude protein and sodium  
277 intake was verified ( $P<0.001$ ). The intake of crude protein increased 2.3 times, and Na 1.6 times  
278 by the cats. The increased protein intake can explain the linear increase on urea renal excretion,  
279 that elevated 2.6 times comparing the diets with 28% and 64% of crude protein ( $P<0.001$ ).  
280 Urine density did not change, but urine pH increased linearly with the increase on crude protein  
281 and Na content of the diets ( $P<0.001$ ).

282 On water balance, the metabolic water, faecal water excretion and insensible water  
283 losses did not change, but all other parameters were altered by the experimental diets ( $P<0.05$ ).  
284 Water intake via drinking bowl increased linearly ( $P<0.001$ ), in approximately 1.4 times. Water  
285 intake via food presented a quadratic reduction, been lower for cats fed the 39% CP food  
286 ( $P<0.05$ ). This however only reflects the lower moisture content of this diet. As a result of the

287 higher drinking water, total water intake of cats increased linearly, been 1.3 times greater for  
288 cats fed 64% CP than the 28% CP diet ( $P=0.007$ ). Urine production increased linearly  
289 ( $P<0.001$ ), been 1.7 times greater with the increase on crude protein and Na content of the diets.

290 In addition to the water balance, a linear increase on the turnover rate of body water  
291 was also verified with the isotope dilution technique using deuterium ( $P=0.002$ ), with a water  
292 turnover 1.3 times greater comparing the cats fed the 28% CP and the 64% CP diets. The two  
293 methods of water flux study presented a low agreement (bias =  $20.85 \pm 11.11$  mL/cat/day;  
294 coefficient of agreement = 0.30; bias correlation = 0.45), the values obtained with the  
295 conventional water balance method was lower than the verified with the deuterium method  
296 ( $P<0.001$ ), as illustrated on Figure 1. The Pearson correlation between these two  
297 methodologies, however, was significant ( $r=0.73$ ;  $P<0.001$ ), what indicate that although the  
298 disagreement on the obtained values of water turnover, both methods correlate in the description  
299 of the biological response of the cats to diets composition.

300

### 301 **Discussion**

302 The study was conducted with the hypothesis that animals fed diets with increased  
303 contents of crude protein and sodium would present higher turnover rate of body water, while  
304 animals fed high carbohydrate diet, and with less sodium would show lower urine excretion  
305 and water intake. To these four extruded dry foods with less than 8% moisture, different crude  
306 protein to carbohydrate ratios, and sodium amounts were evaluated. All experimental diets  
307 presented adequate amounts of amino acids (data not shown) and protein, according to NRC  
308 (2006). The results confirmed the study hypothesis, as an increased water turnover rate was  
309 verified.

310           Considering the routes of water excretion, although faecal production and moisture  
311 content decreased, and faecal score increased for cats fed the diets with higher crude protein  
312 and sodium, the faecal excretion of water did not differ between foods. This is may be justified  
313 by the lower relative importance of faecal water, that only represented around 10% of the  
314 measured loss of water on the conventional balance method. This, of course, can be different in  
315 situations of soft and moist faeces production or even diarrhoea, when water excretion via  
316 faeces can be substantial. Insensible losses accounted for a large proportion of water loss, as  
317 approximately 38% of the water was excreted by this route on the present study (Carciofi et.  
318 al., 2005). Water loss by lungs during breathing, and the salivary water loss during hair licking  
319 for hygiene and body cooling were the main routs of these insensible losses (Anderson, 1982;  
320 Noel & Hu, 2018). Housing condition, diseases, stress and ambient temperature and humidity  
321 are probably the main factors that can change the insensible losses, as they can interfere on  
322 breath frequency, body temperature, and hair licking behaviour or intensity (Case, Daristotle,  
323 Hayek & Raasch, 2011; Wellman et al., 2012). During the present study, as animals was kept  
324 in a relatively stable condition and in a thermoneutral zone (around 22°C), no differences were  
325 verified between cats.

326           Urine production, so, accounted for most of the variation on water excretion of the cats.  
327 The increased amount of crude protein in the diets, and consequently on this nutrient intake,  
328 resulted in an increase on the urinary excretion of urea. On animals at maintenance, absorbed  
329 amino acids not used for protein synthesis are deaminated in the liver and the resulting  
330 ammonium converted to urea and eliminated in the kidneys (Klein, 2015; Nelson & Cox, 2014).  
331 In the glomerular filtrate, the excreted urea promotes an increase on osmolality, resulting in  
332 water retention, higher urine volume, and elevated water loss by the kidneys (Hashimoto et al,  
333 1995; Wellman et al., 2012). Protein consumption inducing osmotic diuresis has been

334 previously reported by cats in some studies (Funaba et al., 1996; Lekcharoensuk et al., 2001;  
335 Paßlack et al. 2014c; Mendonça et al., 2018). The volume of urine, in fact, largely depends on  
336 solute load and glomerular filtrate osmolality (O'Connor & Potts, 1969; Wellman et al., 2012).

337         In addition to protein consumption, the higher sodium intake of the cats may also explain  
338 the increase on urine volume. In parallel with the crude protein content, sodium concentration  
339 also increased on diets with less starch. The increase on sodium is explained by the protein  
340 source selected, the isolated soy protein, as sodium chloride inclusion was not altered on any  
341 formula. To produce isolated soy protein, after removal de hulls and the fat, the protein content  
342 is solubilized by sodium hydroxide and then concentrated by centrifugation (Wang, Johnson &  
343 Wang, 2004). The process results in a raw material with high crude protein concentration, but  
344 also with elevated sodium amount. Increased sodium intake results in higher sodium and water  
345 renal excretion, since the increase on this cation excretion by kidneys induces increase of the  
346 osmotic pressure, and water retention on tubular fluid. The extra fluid load and sodium are  
347 excreted by the kidneys, to reduce the extracellular fluid volume (Kirk, Jewell & Lowry, 2006;  
348 Chandler, 2008; Waldrop, 2008). Previous studies have shown the increase in urine volume  
349 after the consumption of dry diets with high sodium ammounts by cats (Anderson, 1982;  
350 Hawthorne, & Markwell, 2004; Luckschander et al., 2004; Kirk et al., 2006; Paßlack et al.,  
351 2014b).

352         The control of the thirst and water intake happens in the hypothalamic region. Sodium  
353 ions are prevented to accumulate on cells, been retained on extracellular fluid increasing  
354 osmotic pressure, promoting cell dehydration, and the consequent release of vasopressin and  
355 thirst behavior. Ingested water dilutes the extracellular fluid and restores normal sodium  
356 concentration but results on increase in the glomerular filtration rate and water and sodium  
357 excretion by the kidneys (Thrasher et al., 1980; McKinley et al., 2015). Although some

358 concerns about elevated sodium intake in cats, studies have shown that high amounts of sodium  
359 in the food, up to 1.1% in dry matter, did not alter the blood pressure of these animals  
360 (Buranakarl, Mathur, & Brown, 2004; Luckschander et al., 2004; Xu, Laflamme, & Long, 2009;  
361 Reynolds et al., 2013). In addition to sodium, high concentrations of protein in the food increase  
362 also increase water intake (Hashimoto et al., 1995; Funaba et al., 1996) in a compensatory way  
363 to compensate the greater water loss by urine to excrete urea (Waldrop, 2008).

364         The increase on urine pH of the animals may be explained by an increased cation load  
365 on the diets (Jeremias, et al., 2013). Along the increase in crude protein, the cation sodium also  
366 increased. This result illustrates that high intake of crude protein may not necessarily results in  
367 acid urine, as the urine pH is not controlled by protein itself, but by the cation-anion balance of  
368 the food (Kienzle, Schuknecht & Meyer, 1991; Markwell et al., 1998; Allen & Kruger, 2000;  
369 Mendonça et al, 2018). The lack of changes in urine density, as only urine volume was altered  
370 by the diets, may be explained by the increased urea excretion. It is considered that around two  
371 thirds of the renal solute load is represented by urea (Wellman et al., 2012). The higher urea  
372 excretion after increased crude protein intake may resulted on increased tonicity and water  
373 retention on tubular fluid, promoting an increasing in the elimination of water through the urine  
374 (Hashimoto et al., 1995; Lekcharoensuk et al., 2001), but in the production of urine with high  
375 specific gravity (Wellman et al., 2012).

376         The lack of diet effect on the estimation of the amount of metabolic water produced was  
377 not expected, since the nutrients differ regarding water production, with carbohydrates  
378 providing the maximum water per calorie and per liter of oxygen (Anderson, 1982). This lack  
379 of effect can be explained by the fact that the amount of crude protein increased 2.3 times, and  
380 the amount of starch decreased approximately 3.7 times, partially compensating the changes on  
381 nutrient composition. Additionally, the crude protein digestibility was lower than the starch

382 digestibility (mean values for all diets of 88.7% and 99.5%, respectively. Data not shown),  
383 interfering on the digestible nutrients' consumption and metabolic water generated.

384         The low agreement and elevated difference among the water balance and the isotope  
385 dilution technique on water turnover rate was not expected, since a previous study compared  
386 these two methodologies, using the tritium isotope, and observed that although the isotope  
387 technique resulted in higher values, this difference was not significant, with an accuracy of 98%  
388 between them (Hendriks et al., 1999). The difference observed on the present study may be  
389 explained by the fact that during the deuterium method animals were housed in a collective  
390 cattery, thus expressing their natural behavior of water intake and excretion, whereas to conduct  
391 the water balance cats remained restricted on metabolic cages to quantify the intake and the  
392 excretion of water. Some studies have shown that under stress cats may alter the ingestion and  
393 excretion behavior (Stella, Lord, & Buffington., 2011; Stella, Croney, & Buffington, 2013;  
394 Stella, Croney, & Buffington, 2014), possibly reducing urination and consequently water  
395 intake. The restriction to cages may also reduce energy expenditure of cats, due the limited  
396 possibility of exercise, and as water turnover is strongly influenced by energy expenditure  
397 (Wellman et al., 2012), this reduced energy expenditure may lower also water turnover. Due  
398 this, the isotope dilution technique, when cats maintain their normal life routine and are not  
399 restricted to cages probably reflects better the body water turnover rate of the cats, been  
400 preferable to study water requirements and metabolism. However, the isotope technique do not  
401 allow to understand the routes of water intake and excretion and this is a limitation to be  
402 considered. When urine production need to be quantified, only the use of the water balance  
403 method is possible, and may be the combination of both techniques should be considered.  
404 Another point is that a good correlation was verified for both methodologies, and both

405 techniques was able to capture the diet effect on water balance, however, with a substantial  
406 difference on the amount of estimated water turnover.

407         Limitations of the present study needs also to be considered. Only female cats were  
408 used, and specially the diet design have the limitation to present a parallel increase on two  
409 nutrients that are know to change urine production, the sodium and the crude protein. Due this  
410 all results are attributed to the combined increase of both nutrients, not been possible to  
411 understand the separate effect of each one, that would require another diet design. The study  
412 demonstrated a dietary effect on urine and water turnover, however it did not studied specific  
413 factors of the the lower urinary tract diseases in cats, and did not evaluate urine supersaturation  
414 to predict the possible impact of the outcomes on urolith formation.

415         In conclusion, the intake of diets with higher amounts of crude protein and sodium  
416 increased water turnover rate, by increasing urine production and water intake. This can be  
417 explored in the formulation of dry diets for cats with the aim to promotes higher urine  
418 production. The isotope dilution technique produce more reliable data on body water turnover  
419 rate than the conventional water balance method, however only conducting the conventional  
420 water balance is possible to separate the routes of water intake and excretion.

421

## 422 **References**

423         Allen TA and Kruger JM. (2000). Feline lower urinary tract disease. In: Hand MS, Tatcher  
424         CD, Remillard RL and Roudebush P. Small animal clinical nutrition. (4 ed) Missouri: Mark  
425         Morris Institute, 689-724.

426         Anderson RS. (1982). Water balance in the dog and cat. *Journal of Small Animal Practice*  
427         23(9), 588-598.

428         AOAC (2010). *Official Methods of Analysis* (18th ed)

429         Bartges JW and Callens AJ. (2015). Urolithiasis. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*.  
430         45, 747-768.

- 431 Bartges JW and Kirk CA. (2006). Nutrition and lower urinary tract disease in cats. *Veterinary*  
432 *Clinics: Small Animal Practice*. 36, 1361-1376. doi: 10.1016/j.cvsm.2006.08.006
- 433 Bartges JW and Kirk CA. (2012). Nutritional management of lower urinary tract disease. In:  
434 Fascetti AJ and Delaney SJ. *Applied Veterinary Clinical Nutrition*. Davis, California, 269-  
435 288.
- 436 Bartges JW, Osborne CA, Lulich JP, Kirk C, Allen TA and Brown C. (1999). Methods for  
437 evaluating treatments of uroliths. *Veterinary Clinics: Small Animal Practice*. 29, 45-57.
- 438 Bartges JW. (2016) Feline calcium oxalate urolithiasis: risk factors and rational treatment  
439 approaches. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 18, 712-722. doi:  
440 10.1177/1098612X16660442
- 441 Buckley CMF, Hawthorne A, Colyer A and Stevenson AE. (2011). Effect of dietary water  
442 intake on urinary output, specific gravity and relative supersaturation for calcium oxalate  
443 and struvite in the cat. *British Journal of Nutrition*. 106, S128-S130.  
444 doi:10.1017/S0007114511001875
- 445 Buffington C and Chew D. (1998). Effects of diet on cats with non-obstructive lower urinary  
446 tract diseases: a review. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 80, 120-127.
- 447 Buffington CA, Chew DJ, Kendall MS, Thompson SB, Blaisdell JL and Woodworth BE.  
448 (1997) Clinical evaluation of cats with nonobstructive urinary tract diseases. *Journal of the*  
449 *American Veterinary Medical Association* 210, 46-50.
- 450 Buranakarl C, Mathur S and Brown SA. (2004). Effects of dietary sodium chloride intake on  
451 renal function and blood pressure in cats with normal and reduced renal function. *American*  
452 *Journal of Veterinary Research*. 65, 620-627.
- 453 Carciofi AC, Bazolli RS, Zanni A, Kihara LRL and Prada F. (2005). Influence of water  
454 content and the digestibility of pet foods on the water balance of cats. *Brazilian Journal*  
455 *Veterinary Research Animal Science*. 42(6), 429-434.
- 456 Carciofi AC, Takakura FS, De-Oliveira LD, Teshima E, Jeremias JT, Brunetto MA and Prada  
457 F. (2008). Effects of six carbohydrate sources on dog diet digestibility and post-prandial  
458 glucose and insulin response. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 92, 326-  
459 336.
- 460 Case LP, Daristotle L, Hayek MG and Raasch MF. (2011). *Canine and feline nutrition: a*  
461 *resource for companion animal professionals*, (2nd ed), Elsevier: Missouri, 1-12.

- 462 Chandler, ML. (2008). Pet food safety: sodium in pet foods. Topics in companion animal  
463 medicine. 23, 148-153.
- 464 Chetboul V, Reynolds BS, Trehou-Sechi E, Nguyen P, Concordet D, Sampedrano CC,  
465 Testault I, Elliott J, Abadie J, Biourge V and Lefebvre HP. (2014). Cardiovascular effects  
466 of dietary salt intake in aged healthy cats: a 2-year prospective randomized, blinded, and  
467 controlled study. PloS One. 9, e97862.
- 468 FEDIAF - European Pet Food Industry Federation. (2018). Nutritional guidelines for complete  
469 and complementary pet food for cats and dogs.
- 470 Ferriolli, E, Cruz, BM and Pfrimer, K. (2008). Uso de Isótopos Leves em Ciências  
471 Nutricionais. In: Dutra De-Oliveira JE and Marchini JS. Ciências Nutricionais:  
472 Aprendendo a Aprender, (2nd ed), Sarver: São Paulo, 442-465.
- 473 Funaba M, Hashimoto M, Yamanaka C, Shimogori Y, Iriki T, Ohshima S and Abe M. (1996).  
474 Effects of a high-protein diet on mineral metabolism and struvite activity product in  
475 clinically normal cats. American Journal of Veterinary Research. 57, 1726-1732.
- 476 Gaskell CJ. (1985). Feline urological syndrome: a United Kingdom perspective. In: Feline  
477 Medicine: Seminar Eastern States Veterinary Conference, Orlando, 27-32.
- 478 Hashimoto M, Funaba M, Abe M and Ohshima S. (1995). Dietary protein levels affect water  
479 intake and urinary excretion of magnesium and phosphorus in laboratory cats.  
480 Experimental Animals. 44, 29-35. doi: 10.1538/expanim.44.29
- 481 Hawthorne AJ and Markwell PJ. (2004). Dietary sodium promotes increased water intake and  
482 urine volume in cats. The Journal of Nutrition. 134, 2128S-2129S.
- 483 Hendriks WH, Wamberg SW and Tarttelin MF. (1999). A metabolism cage for quantitative  
484 urine collection and accurate measurement of water balance in adult cats (*Felis catus*).  
485 Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 82, 94-105. doi: 10.1111/j.1439-  
486 0396.1999.00214.x
- 487 Hendrix DL. (1993). Rapid extraction and analysis of nonstructural carbohydrates in plant  
488 tissues. Crop Science. 25, 1306-1311.
- 489 Jeremias JT, Nogueira SP, Brunetto MA, Pereira GT, Loureiro BA, Ferreira CS, Gomes MOS  
490 and Carciofi AC. (2013). Predictive formulas for food base excess and urine pH estimations  
491 of cats. Animal Feed Science and Technology. 182, 82-92.  
492 doi:10.1016/j.anifeedsci.2013.04.003

- 493 Kienzle E, Schuknecht A and Meyer H. (1991). Influence of food composition on the urine  
494 pH in cats. *The Journal of Nutrition*. 121, S87-S88.
- 495 Kirk CA, Jewell DE and Lowry SR. (2006). Effects of sodium chloride on selected parameters  
496 in cats. *Veterinary Therapeutics: Research in Applied Veterinary Medicine*. 7, 333-346.
- 497 Klein BG. (2015). *Cunningham: Tratado de Fisiologia Veterinária*. (5<sup>th</sup> ed) Brasil, Elsevier,  
498 624.
- 499 Lekcharoensuk C, Osborne CA, Lulich JP, Pusoonthornthum R, Kirk CA, Ulrich LK, Koehler  
500 LA, Carpenter KA and Swanson LL. (2001). Association between dietary factors and  
501 calcium oxalate and magnesium ammonium phosphate urolithiasis in cats. *Journal of the*  
502 *American Veterinary Medical Association*. 219, 1228-1237.
- 503 Lifson N and McClintock R. (1966). Theory of use of the turnover rates of body water for  
504 measuring energy and material balance. *Journal of Theoretical Biology*. 12, 46-74.
- 505 Luckschander N, Iben C, Hosgood G, Gabler C and Biourge. (2004) Dietary NaCl does not  
506 affect blood pressure in healthy cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 18, 463-467.
- 507 Markwell PJ, Buffington CT and Smith BHE. (1998). The effect of diet on lower urinary tract  
508 diseases in cats. *The Journal of Nutrition*. 128, 2753S–2757S.
- 509 McKinley M, Yao ST, Uschakov A, McAllen RM, Rundgren M and Martelli D. (2015). The  
510 median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium,  
511 temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. *Acta Physiologica*. 214, 8-32.
- 512 Mendonça FS, Pedreira RS, Loureiro BA, Putarov TC, Monti M and Carciofi AC. (2018)  
513 Hydroxyproline and starch consumption and urinary supersaturation with calcium oxalate  
514 in cats. *Animal Feed Science and Technology*. 246, 72-81. doi:  
515 10.1016/j.anifeedsci.2018.10.001
- 516 National Research Council – NRC. (2006). Nutrient requirements of dogs and cats. The  
517 National Academy Press, Washington, DC.
- 518 Nelson DL and Cox MM. (2014). Oxidação de aminoácidos e produção de ureia. In: Nelson  
519 DL and Cox MM. *Princípios de Bioquímica de Lehninger* (6th ed.), Porto Alegre, Artmed,  
520 695-730.
- 521 Noel AC and Hu DL. (2018). Cats use hollow papillae to wick saliva into fur. *Proceedings of*  
522 *the National Academy of Sciences*. 115, 12377-12382. doi/10.1073/pnas.1809544115

- 523 O'Connor WJ and Potts DJ. (1969). The external water exchanges of normal laboratory dogs.  
524 Quartely Journal of Experimental Physiology and Congnate Medical Sciences. 54, 244-  
525 265.
- 526 Paßlack N, Brenten T, Neumann K and Zentek J. (2014a). Effects of potassium chloride and  
527 potassium bicarbonate in the diet on urinary pH and mineral excretion of adult cats. British  
528 Journal of Nutrition. 111, 785-797. doi:10.1017/S0007114513003279
- 529 Paßlack N, Burmeier H, Brenten T, Neumann K and Zentek J. (2014b). Short term effects of  
530 increasing dietary salt concentrations on urine composition in healthy cats. The Veterinary  
531 Journal. 201, 401-405. doi:10.1016/j.tvjl.2014.04.015
- 532 Paßlack N, Burmeier H, Brenten T, Neumann K and Zentek J. (2014c). Relevance of dietary  
533 protein concentration and quality as risk factors for the formation of calcium oxalate stones  
534 in cats. Journal of Nutritional Science. 3, 1-10. doi:10.1017/jns.2014.13
- 535 Paßlack N, Kohn B, Doherr MG and Zentek J. (2018) Influence of protein concentration and  
536 quality in a canned diet on urine composition, apparente nutrient digestibility and energy  
537 supply in adult cats. BMC Veterinary Research. 14, 225-237.
- 538 Reynolds BS, Chetboul V, Nguyen P, Testault I, Concordet DV, Carlos Sampedrano C, Elliot  
539 J, Trehou-Sechi E, Abadie J, Biourge V and Lefebvre HP. (2013) Effects of dietary salt  
540 intake on renal function: a 2-year study in healthy aged cats. Journal of Veterinary Internal  
541 Medicine. 27, 507-515.
- 542 Roberts SB, Coward WA, Schlingenseipen K-H, Nohria V and Lucas A. (1986) Comparison  
543 of the doubly labeled water ( $^2\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) method with indirect calorimetry and a nutrient-  
544 balance study for simultaneous determination of energy expenditure, water intake, and  
545 metabolizable energy intake in preterm infants. The American Journal of Clinical  
546 Nutrition. 44, 315-322.
- 547 Schoeller DA (2005). Hydrometry. In: Heymsfield SB, Lohman TG, Wang Z and Going SB  
548 (2<sup>nd</sup> ed.). Human Body Composition. Human Kinetics, 35-49.
- 549 Schoeller DA, Ravussin E, Schutz Y, Acheson KJ, Baertschi P and Jequier E. (1986) Energy  
550 expenditure by doubly labeled water: validation in humans and proposed calculation.  
551 American Journal of Physiology. 250, R823-R830.
- 552 Seefeldt SL and Chapman TE. (1979). Body water content and turnover in cats fed dry and  
553 canned rations. American Journal of Veterinary Research. 40, 183-185.

- 554 Stella J, Croney C and Buffington T. (2013). Effects of stressors on the behavior and  
555 physiology of domestic cats. *Applied animal behaviour science*. 143, 157-163.
- 556 Stella J, Croney C and Buffington T. (2014). Environmental factors that affect the behavior  
557 and welfare of domestic cats (*Felis silvestris catus*) housed in cages. *Applied Animal*  
558 *Behaviour Science*. 160, 94-105.
- 559 Stella JL, Lord LK and Buffington CT. (2011). Sickness behaviors in response to unusual  
560 external events in healthy cats and cats with feline interstitial cystitis. *Journal of the*  
561 *American Veterinary Medical Association*. 238, 67-73.
- 562 Stevenson A and Rutgers C. (2006). Nutritional management of canine urolithiasis. In: Pibot  
563 P, Biourge V and Elliott D. *Encyclopedia of Canine Clinical Nutrition*, 284-315.
- 564 Thomas DG, Post M and Bosch G. (2017). The effect of changing the moisture levels of dry  
565 extruded and wet canned diets on physical activity in cats. *Journal of Nutrition Science*. 6,  
566 1-5. doi:10.1017/jns.2017.9
- 567 Thrasher TN, Brown CJ, Keil LC and Ramsay DJ. (1980). Thirst and vasopressin release in  
568 the dog: an osmoreceptor or sodium receptor mechanism?. *American Journal of*  
569 *Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. 238, R333-R339.
- 570 Tiebout HM and Nagy KA. (1991) Validation of the doubly labeled water method ( $^3\text{HH}^{18}\text{O}$ )  
571 for measuring water flux and  $\text{CO}_2$  production in the tropical hummingbird *Amazilia*  
572 *saucerottei*. *Physiological Zoology*. 64, 362-374.
- 573 Waldrop JE. (2008). Urinary electrolytes, solutes, and osmolality. *Veterinary Clinics of North*  
574 *America: Small Animal Practice*. 38, 503-512.
- 575 Walker AD, Weaver AD, Anderson RS, Crighton GW, Fennell C, Gaskell CJ and Wilkinson  
576 GT. (1977). An epidemiological survey of the feline urological syndrome. *Journal of Small*  
577 *Animal Practice*. 18, 283-301. doi:10.1111/j.1748-5827.1977.tb05886.x
- 578 Wang H, Johnson LA and Wang T. (2004). Preparation of soy protein concentrate and isolate  
579 from extruded-expelled soybean meals. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 81,  
580 713-717.
- 581 Wellman ML, DiBartola SP and Kohn CW. (2012). Applied physiology of body fluids in dogs  
582 and cats. In: DiBartola, SP (4th ed.). *Fluid, electrolyte and acid-base disorders in small*  
583 *animal practice*. Elsevier Saunders, Missouri, 2-23.
- 584 Xu H, Laflamme DP and Long GL. (2009). Effects of dietary sodium chloride on health  
585 parameters in mature cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 11, 435-441.

- 586 Zentek J and Schulz A. (2004). Urinary Composition of Cats Is Affected by the Source of  
587 Dietary Protein. *The Journal of nutrition*. 134, 2162S-2165S.

588 **Table 1** Ingredient composition (%) of experimental foods for cats with different protein and  
 589 sodium amounts.

	Diets			
	28%	39%	52%	64%
Maize	51.77	37.98	23.58	9.18
Poultry by-product meal	23.00	23.00	23.00	23.00
Soy Isolated Protein	0.00	13.97	28.57	43.16
Poultry Fat	9.59	9.42	9.23	9.05
Swine Isolated Protein	5.00	5.00	5.00	5.00
Broken rice	5.00	5.00	5.00	5.00
Sugarcane Fibre	2.00	2.00	2.00	2.00
Palatant Enhacer†	1.00	1.00	1.00	1.00
Common Salt	0.60	0.60	0.60	0.60
Potassium chloride	0.53	0.58	0.63	0.68
Vitamin and mineral premix‡	0.50	0.50	0.50	0.50
Choline Chloride	0.40	0.40	0.40	0.40
Calcium carbonate	0.31	0.26	0.19	0.13
Taurine	0.12	0.12	0.12	0.12
Mould inhibitor§	0.10	0.10	0.10	0.10
Antioxidant¶	0.04	0.04	0.04	0.04
Fish Oil	0.04	0.04	0.04	0.04

590 † Liquid palatant SPF do Brasil. Descalvado. Brasil.

591 ‡ Added per kg of food: iron 100 mg; copper 10 mg; manganese 10 mg; zinc 150 mg; iodine 2  
 592 mg; selenium 0.3 mg; vitamin A 18000 UI; vitamin D 1200 UI; vitamin E 200 UI; thiamine 6  
 593 mg. riboflavin 10 mg. pantothenic acid 40 mg. niacin 60 mg. vitamin B6 mg. folic acid 0.30  
 594 mg. vitamin B12 0.1 mg.

595 § MoldZap: ammonium dipropionate, acetic acid, sorbic acid and benzoic acid (Alltech do  
 596 Brasil Agroindustrial, Curitiba, Brazil)

597 ¶ Banox: butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate and calcium  
 598 carbonate (Alltech do Brasil Agroindustrial)

599

600 **Table 2** Analyzed chemical composition of experimental foods for cats with different protein  
 601 and sodium amounts. Values expressed on a dry matter basis.

	Diets			
	28%	39%	52%	64%
Moisture (%)	6.36	4.77	5.29	5.25
Crude protein (%)	27.91	38.94	51.77	63.64
Acid-hydrolyzed fat (%)	14.72	14.25	13.66	13.76
Starch (%)	41.38	28.74	20.38	11.07
Crude fiber (%)	3.7	3.36	3.32	3.01
Ash (%)	5.35	5.41	5.63	5.49
Calcium (%)	0.90	0.81	0.84	0.75
Phosphorus (%)	0.82	0.83	0.93	1.00
Sodium (%)	0.58	0.64	0.76	0.87

602

603

604 **Table 3** Protein and sodium intake, urea excretion, feces and urine characteristics, and water balance of cats fed with extruded diets with  
 605 different protein and sodium amounts.

Item	Protein content				SEM†	p value	Contrast ‡	
	28%	39%	52%	64%			Linear	Quadratic
Body weight (kg)	3.86	4.15	3.80	4.05	0.132	0.794	-	-
Body water (mL)	1958.5	2113.9	1972.3	2015.5	39.2	0.068	-	-
Metabolizable energy (kcal/g)	3.42	3.62	3.66	3.79	0.03	<0.001	<0.001	0.433
Dry matter intake (g/cat/day)	38.6	37.3	38.5	38.8	1.35	0.984	-	-
Crude protein intake (g/cat/day)	10.8	14.5	19.9	24.7	1.29	<0.001	<0.001	0.840
Renal excretion of urea (g/cat/day)	2.46	3.83	5.22	6.28	0.34	<0.001	<0.001	0.529
Sodium intake (g/cat/day)	0.22	0.24	0.29	0.32	0.01	0.005	<0.001	0.854
Faeces (As-is, g/cat/day)	20.6	15.4	13.3	12.1	1.01	0.007	0.001	0.209
Faecal dry matter (%)	38.4	42.0	44.2	48.5	1.79	0.104	0.017	0.931
Faecal score	3.7	4.1	4.1	4.4	0.09	0.048	0.007	0.890
Urine pH	6.57	7.16	6.97	7.31	0.06	<0.001	<0.001	0.094
Urine density	1.054	1.051	1.056	1.059	0.003	0.821	-	-
<i>Water balance (mL/cat/day)</i>								
Water intake via drinking bowl	60.2	69.8	72.7	84.7	2.71	0.013	0.001	0.817
Water intake via food	2.6	1.87	2.1	2.3	0.09	0.027	0.356	0.015
Metabolic water §	18.6	16.9	17.3	18.2	0.61	0.781	-	-
Total water intake	81.5	88.6	92.2	105.2	3.06	0.049	0.007	0.620
Urine production	34.1	43.4	48.7	60.1	2.65	0.002	<0.001	0.841
Faecal excretion of water	12.8	10.0	7.5	9.0	0.81	0.130	-	-

Insensible water losses	34.6	35.3	36.0	36.0	1.39	0.980	-	-
<i>Water turnover by the deuterium method (mL/cat/day)</i>	98.2	109.8	113.8	129.1	3.15	0.002	<0.001	0.738

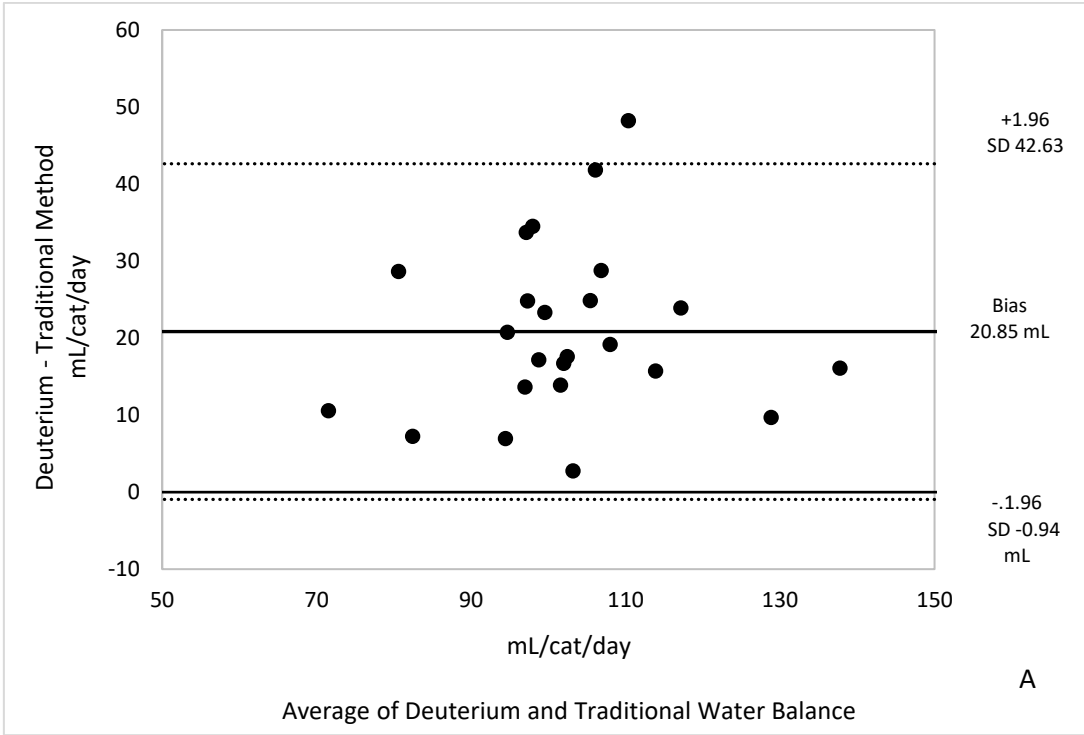
---

606 † SEM – Standard error of the mean (n=6 cat per food).

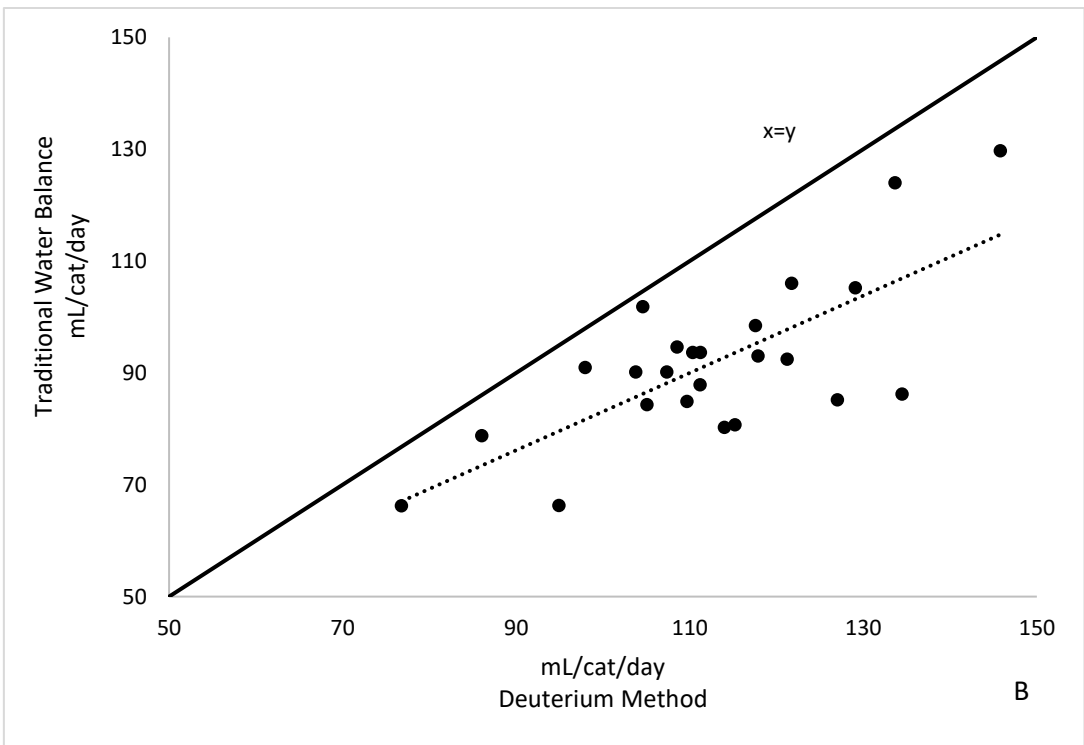
607 ‡ Linear or quadratic effects of increasing consumption of crude protein and sodium.

608 § Metabolic water was estimated by multiplying the mean daily intake of digestible protein, carbohydrates and fat by 0.366, 0.566 and 1.071,

609 respectively. Nutrients digestibility of all diets were determined by the total collection of feces method (data not shown).



610



611

612 **Figure 1.** Bland and Altman comparison (A) and Pearson's Correlation (B) of body water  
613 turnover of cats (mL/cat/day) obtained by the isotope dilution technique and the traditional  
614 water balance method ( $r=0.73$ ;  $P<0.001$ ).