

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/08/2019.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP**

**CAMPUS DE JABOTICABAL**

**DIFERENTES FLUIDOS CORPORAIS, INTERVALOS DE  
AMOSTRAGEM E EFEITO DO SEXO NA APLICAÇÃO DO  
MÉTODO DA ÁGUA DUPLAMENTE MARCADA EM GATOS**

**CAMILA GOLONI**

**Médica Veterinária**

**2018**

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

**DIFERENTES FLUIDOS CORPORAIS, INTERVALOS DE  
AMOSTRAGEM E EFEITO DO SEXO NA APLICAÇÃO DO  
MÉTODO DA ÁGUA DUPLAMENTE MARCADA EM GATOS**

**Camila Goloni**

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

**Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> 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 Medicina Veterinária (Clínica Médica  
Veterinária)**

**2018**



## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DIFERENTES FLUIDOS CORPORAIS, INTERVALOS DE AMOSTRAGEM E EFEITO DO SEXO NA APLICAÇÃO DO MÉTODO DA ÁGUA DUPLAMENTE MARCADA EM GATOS

AUTORA: CAMILA GOLONI

ORIENTADOR: AULUS CAVALIERI CARCIOFI

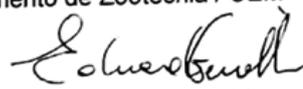
COORIENTADORA: BRUNA AGY LOUREIRO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: CLÍNICA MÉDICA VETERINÁRIA pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. AULUS CAVALIERI CARCIOFI  
Departamento de Clínica e Cirurgia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Prof. Dr. RICARDO SOUZA VASCONCELLOS Participação por Videoconferência  
Departamento de Zootecnia / UEM - Maringá/PR

Prof. Dr. EDUARDO FERRIOLI  
Departamento de Clínica Médica / FMRP/USP - Ribeirão Preto/SP

Jaboticabal, 16 de fevereiro de 2018

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

Camila Goloni nasceu em Camaçari – BA no ano de 1989. Iniciou os estudos no Colégio São Geraldo em Paraíso do Tocantins – TO, concluindo o ensino médio no ano de 2006. Em 2007 iniciou curso preparatório para vestibular no Colégio MEGA em Goiânia – GO. No ano seguinte ingressou no curso de Graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal do Tocantins (UFT). Durante a graduação foi aluna de projeto de extensão e de iniciação científica, monitora na disciplina de Bioquímica e Biofísica e, realizou intercâmbio acadêmico na Universidade de Aveiro em Portugal. Concluiu a graduação em fevereiro de 2014. Realizou Residência em Nutrição e Nutrição Clínica de Cães e Gatos pelo Programa de Residência Profissional em Medicina Veterinária na Universidade Estadual Paulista – UNESP Campus de Jaboticabal de 2014 a 2016. Atualmente é Mestranda no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária na área de Clínica Médica Veterinária com ênfase em Nutrição de Cães e Gatos e foi aprovada no processo seletivo para o Doutorado pelo mesmo programa.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me permitiu chegar até aqui.

À minha família (pai, mãe, irmã e irmão) meu porto seguro, minha confiança em seguir em frente, sem vocês caminhar não seria possível.

Ao meu namorado Igor Luiz Salardani Senhorello, por estar ao meu lado em todos os momentos, me dando forças quando o desânimo aparecia e me ajudando na execução deste projeto. Você é muito importante para mim.

Ao meu orientador Professor Aulus Cavalieri Carciofi, obrigado por toda orientação e confiança durante minha trajetória na nutrição de cães e gatos.

À minha co-orientadora Professora Bruna Agy Loureiro por me guiar durante o período deste projeto.

A todos os amigos que conquistei em Jaboticabal em especial aos meus colegas de residência por toda parceria e crescimento pessoal e profissional. Aos meus colegas do Laboratório de Pesquisas em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”, por toda ajuda e motivação durante toda este período do mestrado, principalmente à mestranda Francine Mendes Peres por ser uma grande parceira na execução deste trabalho e no entendimento e discussão de minhas dúvidas, meu muito obrigada.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas da Faculdade de Ribeirão Preto – USP, principalmente à Pós Doutoranda Karina Pfrimer por toda a paciência e disponibilidade em nos ajudar e ao Professor Doutor Eduardo Ferriolli pela colaboração, sem o apoio de vocês nada disso seria possível.

A Guabi PetCare pelo suporte financeiro ao Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof Dr. Flávio Prada”, local de condução da presente Dissertação.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Processo 2013/20340-0), pela concessão dos recursos financeiros indispensáveis à condução do estudo.

À UNESP – Jaboticabal pela oportunidade oferecida.

À CAPES pela bolsa concedida durante o período do mestrado.

## SUMÁRIO

Capítulo 1. Considerações Gerais.....	7
1.1 Introdução e Revisão de Literatura.....	7
1.2 Referências.....	10
Capítulo 2. Diferentes fluidos corporais, intervalos de amostragem e efeito do sexo na aplicação do método da água duplamente marcada em gatos.....	14
2.1 Resumo.....	15
2.2 Introdução.....	16
2.3 Material e Métodos.....	17
2.4 Resultados.....	24
2.5 Discussão.....	36
2.6 Conclusão.....	39
2.7 Referências.....	40

\*Capítulo 2 realizado nas normas da Revista British Journal of Nutrition

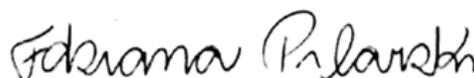
## CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Diferentes fluidos corporais e intervalos de amostragem na aplicação do método da água duplamente marcada para mensuração do gasto energético de gatos**", protocolo nº 007867/16, 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 julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), 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 08 de fevereiro de 2018.

Vigência do Projeto	15/09/2016 a 19/03/2018
Espécie / Linhagem	Felinos SRD
Nº de animais	14
Peso / Idade	5 Kg / 4 a 5 Anos
Sexo	Ambos os sexos
Origem	Animais do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos "Prof. Dr. Flávio Prada" – UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 08 de fevereiro de 2018.



**Profª Drª Fabiana Pilarski**  
Coordenadora – CEUA

1                   **DIFERENTES FLUIDOS CORPORAIS, INTERVALOS DE AMOSTRAGEM E**  
2                   **EFEITO DO SEXO NA APLICAÇÃO DO MÉTODO DA ÁGUA DUPLAMENTE**  
3                   **MARCADA EM GATOS**

4   **RESUMO** - O gasto energético diário (GED) de gatos tem sido estudado há algum tempo  
5 em gatos de laboratório, com ambiente, alimentação e massa corporal controlados. O  
6 metabolismo energético destes animais pode ser dividido em quatro compartimentos: taxa  
7 metabólica basal que soma o maior GED destes animais em torno de 60%, a atividade  
8 muscular voluntária contribuindo em torno de 30%, seguido do incremento calórico e  
9 termogênese adaptativa (10%). Nota-se que a atividade muscular voluntária contribui com  
10 porção considerável do GED destes animais, não devendo ser limitada, pois interfere  
11 diretamente no gasto energético. Estudos com animais em domicílio, com número  
12 representativo de grandes populações, que apresentam rotina de vida normal com  
13 protocolo prático e eficaz, de fácil aceitação pelos proprietários para mensurar GE,  
14 composição corporal (CC) e fluxo de água (FA) no estilo de vida habitual de gatos é  
15 importante para estudos nutricionais mais precisos. Método prático e eficaz para  
16 mensuração destes parâmetros, de fácil aplicação em domicílio e que não interfira no estilo  
17 de vida e atividade física dos animais é o método da água duplamente marcada que os  
18 mensura por meio do enriquecimento e decaimento de deutério ( $^2\text{H}$ ) e oxigênio 18 ( $^{18}\text{O}$ ) na  
19 água corporal. O objetivo do presente trabalho foi avaliar protocolo prático de tempos de  
20 coleta de enriquecimento (2, 4, 6, 7 e 8 horas) e decaimento (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e  
21 20 dias), bem como os fluidos corporais alternativos saliva e urina, em comparação com o  
22 fluido padrão sangue para avaliação da concentração dos isótopos em gatos machos e  
23 fêmeas. No estudo do protocolo de tempos de coleta, verificou-se que o ponto máximo de  
24 enriquecimento foi às 5h ( $P < 0,0001$ ;  $R^2 = 0,82$ ) e que o decaimento foi linear ( $R^2 = 0,99$ ;  
25  $P < 0,0001$ ), com resultados semelhantes para estimativa do GED em qualquer dia de  
26 coleta ( $P = 0,999$ ). Catorze gatos adultos, sete machos e sete fêmeas, castrados e  
27 saudáveis, tiveram sangue, saliva e urina coletados nos tempos basal, 5h, 7, 10 e 14 dias  
28 após aplicação de solução isotópica. O enriquecimento de  $^2\text{H}$  e  $^{18}\text{O}$  foi menor na urina  
29 ( $P < 0,05$ ), mas semelhante entre sangue e saliva. Já o decaimento não diferiu entre fluidos.  
30 Não houve efeito de fluido para as variáveis CC, GED e FA. O GED foi maior nos machos  
31 ( $78\text{kcal/kg}^{0,67}/\text{dia}$ ) do que nas fêmeas ( $63\text{kcal/kg}^{0,67}/\text{dia}$ ), sem diferenças entre sexos na  
32 composição corporal percentual. Na estatística Bland e Altman e Correlação de Pearson  
33 houve correlação entre o GED estimado com sangue e saliva (viés = 0,4;  $r = 0,86$ ;  $p < 0,001$ ),  
34 mas não entre sangue e urina (viés = -4,5;  $r = 0,27$ ;  $p = 0,441$ ). Concluiu-se que o fluido saliva

35 pode ser empregado em substituição ao fluido padrão sangue e, apesar de gatos machos  
36 e fêmeas terem apresentado composição corporal semelhantes, machos demonstraram  
37 maior gasto energético.

38 **PALAVRAS-CHAVE:** oxigênio 18, deutério, gasto energético, composição corporal, gatos

39

#### 40 **DIFFERENT BODY FLUIDS, SAMPLING INTERVALS AND THE EFFECT OF SEX** 41 **ON THE APPLICATION OF THE DOUBLE LABELED WATER METHOD IN CATS**

42 **ABSTRACT** – The energy expenditure (EE) of cats has been studied for some time in  
43 laboratory cats, with controlled environment, feeding and body mass. The energy  
44 metabolism of these animals can be divided into four compartments: basal metabolic rate  
45 that sums the highest EE of these animals around 60%, voluntary muscle activity  
46 contributing around 30%, followed by caloric increment and adaptive thermogenesis (10%).  
47 It is noted that voluntary muscle activity contributes a considerable portion of the EE of these  
48 animals, and should not be limited, as it directly interferes with energy expenditure. Studies  
49 with animals at home, with a representative number of large populations, that present normal  
50 life routine with a practical and efficient protocol, easily accepted by the owners to measure  
51 EE, body composition (BC) and water turnover (WT) in lifestyle of cats is important for more  
52 accurate nutritional studies. A practical and effective method for measuring these  
53 parameters, which is easy to apply at home and does not interfere with the animals' lifestyle  
54 and physical activity, is the double labeled water method that measures them through the  
55 enrichment and decay of deuterium ( $^2\text{H}$ ) and oxygen 18 ( $^{18}\text{O}$ ) in body water. The aim of the  
56 present study was to evaluate the practical protocol of enrichment collection times (2, 4, 6,  
57 7 and 8 hours) and decay (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 and 20 days ) as well as alternative  
58 body fluids saliva and urine compared to blood for assessing the concentration of isotopes  
59 in male and female cats. In the study of the collection time protocol, it was verified that the  
60 maximum point of enrichment was at 5h ( $P<0.0001$ ;  $R^2 = 0.82$ ) and that the decay was linear  
61 ( $R^2=0.99$ ;  $P<0.0001$ ), with similar results for EE estimation on any day of collection  
62 ( $P=0.999$ ). Fourteen adult cats, seven males and seven females, castrated and healthy, had  
63 blood, saliva and urine collected at baseline, 5h, 7, 10 and 14 days after application of  
64 isotope solution. The enrichment of  $^2\text{H}$  and  $^{18}\text{O}$  was lower in urine ( $P<0.05$ ), but similar  
65 between blood and saliva. The decay did not differ between fluids. There was no fluid effect  
66 for the BC, EE and WT variables. EE was higher in males ( $78 \text{ kcal/kg}^{0.67}/\text{day}$ ) than in females  
67 ( $63 \text{ kcal/kg}^{0.67}/\text{day}$ ), with no differences between sexes in the percentage body composition.  
68 In Bland and Altman and Pearson correlation, there was a correlation between estimated

69 EE with blood and saliva (bias=0.4,  $r=0.86$ ,  $P<0.001$ ), but not difference between blood and  
70 urine (bias=-4.5,  $r=0.27$ ,  $P=0.441$ ). It was concluded that saliva fluid can be used instead of  
71 standard blood fluid, and although male and female cats showed similar body composition,  
72 males showed different energy expenditure.

73 **KEY WORDS:** oxygen 18, deuterium, energy expenditure, body composition, cats

74

75

76

77

78

79

80

81

82

83

84

85

86

## 87 **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### 88 **Introdução e revisão de literatura**

89

90 A palavra isótopo vem do grego *ISO*, que significa mesmo ou igual e *TOPOS*  
91 caracterizando lugar, referindo-se à mesma posição na tabela periódica. Isótopos são  
92 átomos de um mesmo elemento químico que apresentam a mesma propriedade química,  
93 porém diferentes propriedades físicas (DUCATTI, 2011). Cada átomo é composto por um  
94 núcleo cercado por elétrons (e-) com carga negativa, e o núcleo apresenta prótons (Z) com  
95 carga positiva e nêutrons (N) que não tem carga. Os isótopos de um mesmo elemento  
96 químico diferem somente no número de nêutrons (DAWSON e BROOKS, 2001). Quanto  
97 maior o número de nêutrons de um isótopo mais radioativo ele se apresenta. A estabilidade  
98 de um isótopo o caracteriza como inócuo ao ambiente e não prejudicial à saúde,  
99 diferentemente de isótopo instável ou radioisotópico, que apresenta potencial radioativo  
100 nocivo (DUCATTI, 2007).

101 Os isótopos estáveis são utilizados em inúmeras áreas da ciência, inicialmente  
102 empregados na geologia e arqueologia, se difundiram para as áreas biológicas e ecológicas  
103 (DUCATTI, 2011). São considerados atualmente padrão ouro para a avaliação da taxa  
104 metabólica e composição corporal em seres humanos e animais. São empregados,  
105 também, em avaliações metabólicas de animais de vida livre, pela sua característica não  
106 invasiva (GUIDOTTI, 2013). Os isótopos de maior interesse nas áreas biológicas são o  
107 carbono, hidrogênio, oxigênio, nitrogênio e enxofre, átomos que fazem parte da estrutura  
108 de carboidratos, proteínas, aminoácidos, lipídios e ácidos nucleicos (DNA e RNA) corporais  
109 (DUCATTI, 2011).

110 O método da água duplamente marcada (DLW) foi alternativa proposta por Lifson  
111 em 1955. A base do método é acompanhar o declínio do enriquecimento dos isótopos  
112 estáveis não radioativos de oxigênio ( $^{18}\text{O}$ ) e hidrogênio (deutério,  $^2\text{H}$ ), no pool de água  
113 corporal. De início se quantifica a água corporal total, injetando-se quantidade conhecida  
114 dos isótopos e na sequência se acompanha seu declínio nos fluidos corporais. O princípio  
115 do método é que o  $^{18}\text{O}$  é perdido do corpo em forma de água e dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ),  
116 enquanto o  $^2\text{H}$  é perdido somente na forma de água (PARK et al., 2014; BELLISLE, 2001).  
117 De acordo com Ballevre et al., (1994), a diferença do desaparecimento de ambos reflete a  
118 produção de  $\text{CO}_2$  pelo organismo durante o período, resultado da oxidação de gorduras,  
119 carboidratos e proteínas. A partir dos dados de produção de  $\text{CO}_2$  pode-se conhecer o gasto  
120 energético do animal no período. Além disso, o método também mensura a entrada de água

121 (ingestão + síntese metabólica) e a composição corporal (água, massa magra e massa  
122 gorda) (SCHIERBEEK et al, 2009).

123 O método da água duplamente marcada já é consolidado em seres humanos e  
124 animais, tendo sido empregado em diversas fases do ciclo de vida, como neonatos,  
125 gestantes, lactantes, adultos e idosos e mesmo em situações de doenças (PFRIMER et al.,  
126 2014; RAVELLI et al., 2014; WONG et al., 2014; SCHIERBEEK et al., 2009; SPEAKMAN &  
127 KRÓL, 2005). O fluido corporal usual para este método é o sangue, porém saliva e urina,  
128 ou mesmo determinação dos isótopos nos gases expirados (CZIMADI et al, 2014;  
129 FERRIOLLI et al., 2010; SCHIERBEEK et al, 2009; SCHOELER & SANTEN, 1982) foram  
130 avaliados. Períodos de coleta de 2, 4, 8 e 10 horas; 2, 4, 6, 7, 10, 14 ou 20 dias e planos  
131 de amostragem com 2, 4 ou 5 pontos ao longo do período já foram adotados (GEMMING,  
132 2015; BUTTE, 2014; BERMINGHAM et al., 2013). Apesar destas variações em relação ao  
133 número e momentos de coleta, concentração dos isótopos na solução a ser inoculada e  
134 dose inoculada nos animais, este vem permitindo avanços importantes no estudo do  
135 metabolismo energético de cães e gatos. (CENTER et al, 2011; JEUSETTE et al, 2010;  
136 AHLSTROM et al, 2006; POUTEAU et al, 2002; MARTIN et al, 2001). Nos estudos de  
137 Schierbeek (2009), por exemplo, foram coletadas tanto amostras de urina como de saliva  
138 de crianças com paralisia cerebral grave com o intuito de validar o método da água  
139 duplamente marcada nessas amostras biológicas. Ambos mostraram declínio linear e boa  
140 correlação entre si.

141 O método da água duplamente marcada também já vem sendo utilizado em cães e  
142 gatos. O primeiro estudo que avaliou esta proposta foi o de Ballevre et al (1994). Embora  
143 ainda existam variações metodológicas em relação ao número e momentos de coleta,  
144 concentração dos isótopos na solução a ser inoculada e dose inoculada nos animais, este  
145 vem permitindo avanços importantes no estudo do metabolismo energético de cães e gatos  
146 (POUTEAU et al., 2002). Em alguns estudos publicados com animais, os isótopos naturais  
147 foram dosados em amostras de sangue venoso e urina (CENTER et al., 2011; JEUSETTE  
148 et al., 2010; AHLSTROM et al., 2006; MARTIN et al., 2001; BERMINGHAM et al., 2013).

149 Outros métodos clássicos de calorimetria indireta, como a respirometria, não  
150 estimam o gasto energético de animais de vida livre, pois requerem o confinamento em  
151 câmara respirométrica. Os gases expirados são medidos por equipamentos especializados,  
152 sendo menos prático. A restrição da atividade física é o maior inconveniente, pois o gasto  
153 com atividade muscular voluntária soma importante fração do gasto diário de energia dos

154 gatos (NRC, 2006). Segundo o NRC, 2006 o gasto energético é composto por quatro  
155 componentes:

156 1) Taxa metabólica basal: gasto energético referente ao metabolismo de repouso,  
157 representa 60% a 75% do gasto diário total. Inclui a energia gasta pelo organismo para  
158 manter suas funções vitais, entre elas o funcionamento dos sistemas cardiovascular,  
159 respiratório, gradientes elétricos de membranas em animais em jejum. É afetado pelo status  
160 hormonal, sistema nervoso autônomo, composição e superfície corporal, status nutricional  
161 e idade;

162 2) Atividade Muscular Voluntária: inclui 30% do gasto diário, varia com o peso e  
163 tamanho do animal, grau, duração e intensidade do exercício físico;

164 3) Incremento calórico ou termogênese induzida pelo alimento: representa  
165 aproximadamente 10% do gasto energético, correspondente ao efeito térmico dos  
166 alimentos, representando a energia perdida na digestão, absorção, transporte,  
167 transformação, assimilação e/ou armazenamento dos nutrientes. Esta varia de acordo com  
168 o substrato consumido (composição nutricional da ração);

169 4) Termogênese adaptativa: inclui perdas adicionais não obrigatórias decorrentes de  
170 mudanças ambientais, alteração no consumo de alimentos e decorrentes de stress, ou seja,  
171 ação dinâmica adaptativa.

172 A forma mais simples de se determinar a necessidade energética de manutenção de  
173 um animal é pela mensuração do consumo de um alimento (com base em energia  
174 biodisponível), em quantidade suficiente para manutenção do peso corporal estável. No  
175 entanto, esta é pouco precisa e não informa a participação dos diferentes substratos  
176 (proteína, gordura e carboidratos) no gasto energético do animal (LIGHTON et al, 2008).  
177 Dentre as alternativas disponíveis, avaliar o gasto energético por calorimetria indireta por  
178 respirometria é a forma mais tradicional e difundida (WEIR, 1949). Com o animal em uma  
179 câmara de respirometria mensura-se o volume consumido de oxigênio, volume produzido  
180 de gás carbônico e a eliminação de resíduos nitrogenados pela urina. Com estes fatores é  
181 possível se determinar o gasto energético e a oxidação relativa dos diferentes substratos  
182 (proteína, gordura e carboidratos). Os diferentes substratos energéticos, (carboidratos,  
183 proteínas e gorduras) consomem diferentes quantidades de oxigênio e produzem diferentes  
184 quantidades de gás carbônico no seu metabolismo. Contudo, a necessidade de  
185 equipamentos específicos e de controle da interferência de fatores externos, mantendo-se  
186 o animal confinado a uma câmara de respirometria, torna sua execução restrita. O método

187 da água duplamente marcada oferece vantagens em relação à respirometria, por não exige  
188 equipamentos específicos e o animal é mantido em sua condição usual de vida, permitindo  
189 se incluir a atividade muscular voluntária na estimativa do gasto energético, já que o animal  
190 é avaliado em condição de liberdade, em seu domicílio.

191 O aprimoramento do método da água duplamente marcada, principalmente  
192 com vistas ao desenvolvimento de alternativas utilizando amostras de diferentes fluidos  
193 biológicos, pode ampliar as possibilidades de estudos sobre o gasto energético,  
194 metabolismo da água e composição corporal de gatos domiciliados. Se viável o estudo em  
195 amostras de saliva e urina, com resultados com a mesma acurácia e precisão que a tomada  
196 de amostras de sangue, poderão se abrir outras possibilidades de pesquisa, em condições  
197 mais próximas a realidade de vida de um animal alojado na casa de seu proprietário. Os  
198 estudos poderão ser conduzidos em populações maiores, sem restrição das atividades  
199 diárias em domicílio, obterem mais facilmente a concordância dos proprietários pelas  
200 coletas apresentarem-se menos invasivas e, desta forma, aperfeiçoar-se ferramenta que  
201 venha a contribuir para a melhor compreensão do metabolismo e necessidades energéticas  
202 de gatos.

## 203 **Referências**

204

205 AHLSTROM, O.; SKREDE, A.; SPEAKMAN, J.; REDMAN, P.; VHILE, S. G.; HOVE, K. Energy  
206 Expenditure and Water Turnover in Hunting Dogs: A Pilot Study. American Society for Nutrition. J.  
207 Nutr. 136: 2063S–2065S, 2006.

208

209 BALLEVRE O., G. ANANTHARAMAN-BARR, P. GICQUELLO, C. PIQUET-WELSH, A.-L. THIELIH  
210 AND E. FERH. Use of the doubly-labeled water method to assess Energy Expenditure in free living  
211 cats and dogs. The Journal of Nutrition. 124: 2594S-2600S, 1994.

212

213 BELISLLE, F. The doubly-labeled water method and food intake suveys: a confrontation. Rev. Nutr.,  
214 Campinas, v. 14, p. 125 – 133, 2001.

215

216 BERMINGHAM, E. N.; WEIDGRAAF, K.; HEKMAN, M.; ROY, N. C.; TAVENDALE, M. H.; THOMAS,  
217 D. G. Seasonal and age effects on energy requirements in domestic short-hair cats (*Felis catus*) in  
218 a temperate environment. Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition. 2013. v. 97, p. 522–  
219 530.

- 220 BUTTE, N. F.; WONG, W.W.; WILSON, T. A.; ADOLPH A. L.; PUYAU, M. R.; ZAKERI, I. F.  
221 Revision of Dietary Reference Intakes for energy in preschool-age children. *Am J Clin Nutr* 2014.  
222 v.100:, p. 161–167.  
223
- 224 CENTER, S. A.; WARNER, K. L.; RANDOLPH, J. F.; WAKSHLAG, J. J.; SUNVOLD, G.D. Resting  
225 Energy Expenditure per Lean Body Mass Determined by Indirect Calorimetry and Bioelectrical  
226 Impedance Analysis in Cats. *Journal Veterinary Internal Medicine* v. 25, p. 134–1350, 2011.  
227
- 228 CSZIMADI, I; NEILSON, H. K.; KOPCIUK, K. A.; KHANDWALA, F.; LIU, A.; FRIENDREICH, C. M.;  
229 YASUI, Y.; RABASA-LHORET, R.; BRYANT, H. E.; LAU, D. C. W.; ROBSON, P. J. The Sedentary  
230 Time and Activity Reporting Questionnaire (STAR-Q): Reliability and Validity Against Doubly  
231 Labeled Water and 7-Day Activity Diaries. *Am J Epidemiol.* v. 180, p. 424 – 43, 2014.  
232
- 233 DAWSON, T. E.; BROOKS, P. D. Fundamentals of stable isotope chemistry and measurement. In:  
234 Unkovich M. et al. (Ed.). *Stable isotope techniques in the study of biological processes and*  
235 *functioning of ecosystems.* Dordrecht: Kluwer Academic Publisher, 2001. cap. I, p. 1-18.  
236
- 237 DUCATTI, C.; MARTINS, C. L.; ARRIGONI, M. B.; MARTINS, M. B.; VIEIRA, L. C.; DENADAI, J. C.  
238 Utilização de isótopos estáveis em ruminantes. *Revista Brasileira de Zootecnia.* v.40, p.68-75, 2011.  
239
- 240 DUCATTI, A. Aplicação dos isótopos estáveis em aquicultura. *Revista Brasileira de Zootecnia.* v.  
241 36, p. 1 – 10, 2007.  
242
- 243 FERRIOLLI, E., PFRIMER, K., MORIGUTI, J. C., LIMA, N. K., MORIGUTI, E. K., FORMIGHIERI, P.  
244 F., MARCHINI, J. S. Under-reporting of food intake is frequent among Brazilian free-living older  
245 persons: a doubly labelled water study. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 24(5), 506-  
246 510, 2010.  
247
- 248 GEMMING, L., RUSH, E.; MADDISON, R; DOHERTY, A.; GANT, N.; UTTER, J.; MHURCHU, C. N.;  
249 Wearable cameras can reduce dietary under-reporting: doubly labelled water validation of a camera-  
250 assisted 24 h recall. *British Journal of Nutrition*, 2015 v.113, p. 284–291  
251

- 252 GUIDOTTI, S.; MEIJER, H. A. J.; DIJK, G. V. Validity of the doubly labeled water method for  
253 estimating CO<sub>2</sub> production in mice under different nutritional conditions. *Am J Physiol Endocrinol*  
254 *Metab* v. 305, p.317 – 324, 2013.
- 255
- 256 JEUSETTE, I.; GRECO, D.; AQUINO, F.; DETILLEUX, J.; PETERSON, M.; ROMANO, V.; TORRE,  
257 C. Effect of breed on body composition and comparison between various methods to estimate body  
258 composition in dogs. *Research in Veterinary Science*. v. 88, p. 227–232, 2010.
- 259
- 260 LIFSON, N., GORDON, G.B., MCCLINTOCK, R. Measurement of total carbon dioxide production by  
261 means of D<sub>2</sub>O<sup>18</sup>. *J. Appl. Physiol.* 7, 704–710, 1955.
- 262
- 263 LIGHTON, J.R. B. *Measuring Metabolic Rates. Manual for scientists*. Ed. Oxford University Press,  
264 2008.
- 265
- 266 MARTIN, L.; SILIART, B.; DUMON, H.; BACKUS, R.; BIOURGE, V.; NGUYEN, P. Leptin, body fat  
267 content and energy expenditure in intact and gonadectomized adult cats: a preliminary study. *Journal*  
268 *Animal . Physiology and Animal. Nutrition*. v. 85, p. 195-199, 2001.
- 269
- 270 NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. *Nutrient requirements of dogs and cats*. Washington,  
271 D.C: National Academy Press, 2006.
- 272
- 273 PARK, J.; KAZUKO, I. T.; KIM, E.; KIM, J.; YOON, J. Estimating free-living human energy  
274 expenditure: Practical aspects of the doubly labeled water method and its applications. *Nutrition*  
275 *Research and Practice*. 8(3) p. 241-248, 2014.
- 276
- 277 POUTEAU, E. B., MARIOT, S. M., MARTIN, L. J., DUMON, H. J., MABON, F. J., KREMPF, M. A. &  
278 NGUYEN, P. G. Rate of carbon dioxide production and energy expenditure in fed and food-deprived  
279 adult dogs determined by indirect calorimetry and isotopic methods. *American journal of veterinary*  
280 *research*, 63(1), 111-118, 2002.
- 281
- 282 RAVELLI, M. N.; MOREIRA, M. Z.; BENDASSOLLI, J. A.; PFRIMER, K.; SILVA, E. T.; DUCATTI,  
283 C.; OLIVEIRA, M. R. M. Água duplamente marcada em ciências nutricionais. *Alim. Nutr. = Braz. J.*  
284 *Food Nutr*, 2014.

- 285 SCHIERBEEK, H.; RIEKEN, R.; DORST, K. Y.; PENNING, C.; GOUDOEVER, J. B. Validation of  
286 deuterium and oxygen18 in urine and saliva samples from children using on-line continuous-flow  
287 isotope ratio mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* v. 23, p. 3549 – 3554, 2009.
- 288
- 289 SCHOELLER, D. A.; SANTEN, E. V. Measurement of energy expenditure in humans by doubly  
290 labeled water method. American Physiological Society, 1982.
- 291
- 292 SPEAKMAN JR, KRÓL E. Comparison of Different Approaches for the Calculation of Energy  
293 Expenditure Using Doubly Labeled Water in a Small Mammal. *Physiological and Biochemical*  
294 *Zoology*, v. 78, n. 4, p. 650-667, 2005.
- 295
- 296 WEIR, J.B.D. New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein  
297 metabolism. *The Journal of Physiology* v. 109, p.1–9, 1949.
- 298
- 299 WONG, W. W.; ROBERTS, S. D.; DAS, S. K.; REDMAN, L. M.; ROCHON, J.; BHAPKAR, M. V.;  
300 CLARKE, L. L.; KRAUS, W. E. The Doubly Labeled Water Method Produces Highly Reproducible  
301 Longitudinal Results in Nutrition Studies. *The Journal of Nutrition* v. 144, p.777 – 783., 2014.

824 **Conclusão**

825 Todos os pontos de enriquecimento e decaimento estudados resultaram em  
826 estimativas semelhantes do gasto energético diário, podendo ser empregados no estudo do  
827 metabolismo de energia e água de gatos. O fluido saliva pode ser empregado em substituição ao  
828 fluido padrão sangue, tanto para se estabelecer o enriquecimento como o decaimento dos isótopos.  
829 O fluído urina não se mostrou confiável para o estabelecimento do enriquecimento isotópico,  
830 mas é alternativa para a determinação do decaimento. Apesar de gatos machos e fêmeas terem  
831 apresentado composição corporal semelhantes, machos demonstraram maior gasto energético,  
832 tanto em relação ao peso corporal como massa corporal magra.

833 **Agradecimentos:** Ao Laboratório de Espectrometria de Massa da Faculdade de Medicina de Ribeirão  
834 Preto, Universidade de São Paulo.

835 **Apoio Financeiro:** Guabi Pet Care e Fapesp 2013/20340-0.  
836

837 **Referências**

838 Ahlstrom O, Skrede A, Speakman JR et al. (2006) Energy Expenditure and Water Turnover in  
839 Hunting Dogs: A Pilot Study. *American Society for Nutrition. J. Nutr.* v. 136, p. 2063S–2065S.

840 Backus R & Wara A. (2016). Development of Obesity: Mechanisms and Physiology. *Veterinary*  
841 *Clinics: Small Animal Practice*, v. 46, n. 5, p. 773-784.

842

843

844

845

846

847

848

849

850

851

852

853

854

- 855 Backus RC, Ginzinger DG, Ashbourne KJE, et al (2001). Maternal expression of functional  
856 lipoprotein lipase and effects on body fat mass and body condition scores of mature cats with  
857 lipoprotein lipase deficiency. *American journal of veterinary research*, v. 62, n.2, p. 264-269.
- 858 Ballevre OG, Anantharaman-barr P, Gicquello C, et al. (1994) Use of the doubly labeled water  
859 method to assess Energy Expenditure in free living cats and dogs. *The Journal of Nutrition*. v.124, p.  
860 2594S-2600S.
- 861 Bermingham EN, Weidgraaf K, Hekman M et al. (2013) Seasonal and age effects on energy  
862 requirements in domestic short-hair cats (*Felis catus*) in a temperate environment. *Journal of Animal*  
863 *Physiology and Animal Nutrition* v. 97, p. 522–530.
- 864 Black AE, Prentice AM, Coward WA. (1986) Use of food quotients to predict respiratory quotients  
865 for the doubly labelled water method of measuring energy expenditure. *Human nutrition. Clinical*  
866 *nutrition*. v. 40(5), p. 381-391.
- 867 Bland JM, Altman DG. (1986) Statistical methods for assessing agreement between two methods of  
868 clinical measurement. *Lancet*. v. 1, p. 307-310.
- 869 Butte NF, Wong WW, Wilson TA et al. (2014) Revision of Dietary Reference Intakes for energy in  
870 preschool-age children. *Am J Clin Nutr*, v.100, p. 161–167.
- 871 Center SA, Warner KL, Randolph JF et al. (2011) Resting Energy Expenditure per Lean Body Mass  
872 Determined by Indirect Calorimetry and Bioelectrical Impedance Analysis in Cats. *Journal*  
873 *Veterinary Internal Medicine* v. 25, p. 134–135.
- 874 Crivellenti LZ e Borin-Crivellenti S. (2015) *Rotine Cases in Small Animal Veterinary Medicine*, 2nd  
875 ed., p. 341. MedVet Ltda. Publishing Company, São Paulo, Brazil.
- 876 Dibartola SP. (2012) *Fluid, Electrolyte and Acid-Base Disorders in Small Animal Practice*.  
877 Philadelphia: W.B. Saunders Company. p 720.
- 878 Elia M, Livesey G. (1992) Energy expenditure and fuel selection in biological systems: the theory  
879 and practice of calculations based on indirect calorimetry and tracer methods. *World Rev Nutr Diet*.  
880 v. 70, p. 68–131.
- 881 Fédération européenne de l'industrie des aliments pour animaux familiers FEDIAF. (2016) *Nutrition*  
882 *Guidelines, for complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs*. Publication in July.

- 883 Ferrioli E, Pfrimer K, Cruz BM. (2008) Uso de isótopos estáveis leves em ciências Nutricionais. In:  
884 Dutra JEO, Marchini JS. (Org) Ciências Nutricionais. 2 ed. São Paulo- SP: Sarvier (Almed). v.1, p.  
885 443-465.
- 886 Fettman MJ, Stanton CA, Banks LL et al. (1997) Effects of neutering on bodyweight, metabolic rate  
887 and glucose tolerance of domestic cats. *Research in veterinary science*. v. 62(2), p. 131-136.
- 888 Fischer MM, Kessler AM, Kieffer DA, et al (2017). Effects of obesity, energy restriction and  
889 neutering on the faecal microbiota of cats. *British Journal of Nutrition*, v.118, n.7, p. 513-524.
- 890 Gemming L, Rush E, Maddison R et al. (2015) Wearable cameras can reduce dietary under-reporting:  
891 doubly labelled water validation of a camera-assisted 24 h recall. *British Journal of Nutrition*, v.113,  
892 p. 284–291.
- 893 Grauer, G. F. (2005). Early detection of renal damage and disease in dogs and cats. *Veterinary Clinics:  
894 Small Animal Practice*, v. 35, n.3, p. 581-596.
- 895 Guidotti, S., Jansen, H. G., Aerts-Bijma, A. T, et al. (2013) Doubly Labelled Water analysis:  
896 preparation, memory correction, calibration and quality assurance for  $\delta^{2}\text{H}$  and  $\delta^{18}\text{O}$  measurements  
897 over four orders of magnitudes. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v. 27, n.9, p. 1055-  
898 1066.
- 899 Hendriks BW, Wamberg S and Tarttelin MF. (1999) A metabolism cage for quantitative urine  
900 collection and accurate measurement of water balance in adult cats (*Felis catus*). *Journal of Animal  
901 Physiology and Animal Nutrition*, v. 82, p. 94-105.
- 902 Jeusette I, Greco D, Aquino F et al. (2010) Effect of breed on body composition and comparison  
903 between various methods to estimate body composition in dogs. *Research in Veterinary Science*. v.  
904 88, p. 227–232.
- 905 Kanchuk, ML, Backus, RC, Calvert CC, et al. (2003). Weight gain in gonadectomized normal and  
906 lipoprotein lipase–deficient male domestic cats results from increased food intake and not decreased  
907 energy expenditure. *The Journal of nutrition*, v.133, n.6, 1866-1874.
- 908 Kustritz MVR. (2014). Pros, cons, and techniques of pediatric neutering. *Vet Clin N Am Small Anim  
909 Pract*, v. 44, n.2, p. 221-33.
- 910 Laflamme, DP. (1997) Development and validation of a body condition score system for dogs: a  
911 clinical tool. *Canine Practice, Santa Barbara*, v. 22, n. 3, p. 10- 15.

- 912 Larsen JA (2017). Risk of obesity in the neutered cat. *Journal of feline medicine and surgery*, v. 19,  
913 n.8, p. 779-783.
- 914 Lighton JRB. (2008) *Measuring Metabolic Rates. Manual for scientists*. Ed. Oxford University Press.
- 915 Martin L, Siliart B, Dumon H et al. (2001) Leptin, body fat content and energy expenditure in intact  
916 and gonadectomized adult cats: a preliminary study. *Journal Animal Physiology and Animal*  
917 *Nutrition*. v. 85, p. 195-199.
- 918 Nagy KA and Costa DP (1980). CO<sub>2</sub> production in animals: analysis of potential errors in the doubly  
919 labeled water method. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative*  
920 *Physiology*, v. 238, n.5, p. R466-R473.
- 921 Nguyen P, Dumon H, Martin L et al. (2002) Weight Loss Does Not Influence Energy Expenditure or  
922 Leucine Metabolism in Obese Cats. *Journal of Nutrition*. v. 132, p. 1649S–1651S.
- 923 *Nutrient Requirements of Dogs and Cats*. (2006) National Research Council. The National Academy  
924 Press: Washington, D.C. p. 39-45.
- 925 Pace N, Rathbun, EN. (1945) Studies on body composition 3. The body water and chemically  
926 combined nitrogen content in relation to fat content. *Journal of Biological Chemistry*, v. 158, p. 685-  
927 691.
- 928 Pfrimer K, Vilela M, Resende CM et al. (2014) Under-reporting of food intake and body fatness in  
929 independent older people: a doubly labelled water study. *Age and ageing*, v.44, p. 103-108.
- 930 Pouteau EB, Mariot SM, Martin LJ et al. (2002) Rate of carbon dioxide production and energy  
931 expenditure in fed and food-deprived adult dogs determined by indirect calorimetry and isotopic  
932 methods. *American Journal of Veterinary Research*, v. 63(1), p. 111-118.
- 933 Raman A, Schoeller DA, Subar AF, et al (2004). Water turnover in 458 American adults 40-79 yr of age.  
934 *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, v. 286, n. 2, p. F394-F401.
- 935 Ravelli MN, Moreira MZ, Bendassolli JA et al. (2014) Água duplamente marcada em ciências  
936 nutricionais. *Alim. Nutr. Braz. J. Food Nutr.*
- 937 Rush EC, Chhichhia P, Kilding AE, et al (2010). Water turnover in children and young adults. *European*  
938 *journal of applied physiology*, v. 110, n.6, p. 1209-1214.
- 939 Sagayama H, Yamada Y, Racine NM et al. (2016) Dilution space ratio of <sup>2</sup>H and <sup>18</sup>O of doubly labeled  
940 water method in humans. *Journal of Applied Physiology*. v. 120(11), p. 1349-1354.

- 941 Schoeller DA. (1996) Hydrometry. Human Body Composition, v. 2, p. 35-49.
- 942 Schoeller DA. (1986) Energy expenditure by doubly labeled water: validation in humans and  
943 proposed calculation. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative  
944 Physiology. v. 250, n. 5, p. R823-R830.
- 945 Schoeller DA, Santen EV (1982) Measurement of energy expenditure in humans by doubly labeled  
946 water method. American Physiological Society.
- 947 Schierbeek H, Rieken R, Dorst KY, et al. (2009) Validation of deuterium and oxygen18 in urine and  
948 saliva samples from children using on-line continuous-flow isotope ratio mass spectrometry. Rapid  
949 Commun Mass Spectrom v. 23, p. 3549 – 3554.
- 950 Speakman JR, Król E (2005) Comparison of Different Approaches for the Calculation of Energy  
951 Expenditure Using Doubly Labeled Water in a Schoeller DA, Santen EV (1982) Measurement of  
952 energy expenditure in humans by doubly labeled water method. American Physiological Society.
- 953 Speakman JR, Perez-Camargo G, McCappin T, et al (2001). Validation of the doubly-labelled water technique  
954 in the domestic dog (*Canis familiaris*). British Journal of Nutrition, v. 85, n.1, p. 75-87.
- 955 Speakman JR (1997). Doubly-labelled Water: Theory and Practice. London: Chapman & Hall.
- 956 Toll PW, Yamka RM, Schoenherr WD, et al. (2010) Obesity. In: Hand M, Thatcher C, Remillard R, et al, eds.  
957 Small animal clinical nutrition. 5th ed. Topeka, Kan: Mark Morris Institute, p. 501–542.
- 958 Weir JBD (1949). New methods for calculating metabolic rate with special reference to protein metabolism.  
959 The Journal of Physiology v. 109, p.1–9.
- 960 WELLMAN, M. L.; DIBARTOLA, S. P.; KOHN, C. W. Fisiologia Aplicada de Fluidos Corporais em Cães e  
961 Gatos. In: DIBARTOLA, S.P. Anormalidades de Fluidos, Eletrólitos e Equilíbrio Ácido-Básico na Clínica de  
962 Pequenos Animais. 1. ed. São Paulo: Roca, 2007. Cap 1, p. 3-25.
- 963 Wong, WW, Roberts SD, Das SK et al. (2014). The Doubly Labeled Water Method Produces Highly  
964 Reproducible Longitudinal Results in Nutrition Studies. The Journal of Nutrition v. 144, p.777 – 783.
- 965 Zanghi BM, Cupp CJ, Pan Y, et al (2013). Noninvasive measurements of body composition and body water  
966 via quantitative magnetic resonance, deuterium water, and dual-energy x-ray absorptiometry in cats. American  
967 journal of veterinary research, v. 74, n.5, p. 721-732.
- 968 Zoran DL. (2010) Obesity in dogs and cats: a metabolic and endocrine disorder. Veterinary Clinics of North  
969 America: small animal practice. v. 40(2), p. 221-239.