

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^a. Dr^a 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

Goloni, Camila
G627d Diferentes fluidos corporais, intervalos de amostragem e efeito do
 sexo na aplicação do método da água duplamente marcada em gatos
 / Camila Goloni. – – Jaboticabal, 2018
 x, 47 p. : il. ; 29 cm

 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
 Orientador: Aulus Cavalieri Carciofi
 Banca examinadora: Eduardo Ferrioli, Ricardo Souza
 Vasconcellos
 Bibliografia

 1. Água duplamente marcada. 2. Oxigênio 18. 3. Deutério. I.
 Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

 CDU 619:612.39:636.8

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação
– Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

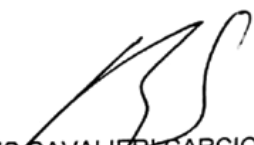
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DIFERENTES FLUIDOS CORPORAIS, INTERVALOS DE AMOSTRAGEM E EFEITO DO SEXO NA APLICAÇÃO DO MÉTODO DA ÁGUA DUPLAMENTE MARCADA EM GATOS

AUTORA: CAMILA GOLONI

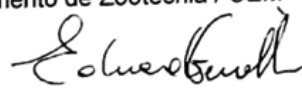
ORIENTADOR: AULUS CAVALIERI CARCIOFI

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 FERRIOLLI
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 mestrandia 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

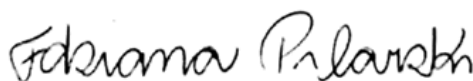
CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

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

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

RESUMO - O gasto energético diário (GED) de gatos tem sido estudado há algum tempo em gatos de laboratório, com ambiente, alimentação e massa corporal controlados. O metabolismo energético destes animais pode ser dividido em quatro compartimentos: taxa metabólica basal que soma o maior GED destes animais em torno de 60%, a atividade muscular voluntária contribuindo em torno de 30%, seguido do incremento calórico e termogênese adaptativa (10%). Nota-se que a atividade muscular voluntária contribui com porção considerável do GED destes animais, não devendo ser limitada, pois interfere diretamente no gasto energético. Estudos com animais em domicílio, com número representativo de grandes populações, que apresentam rotina de vida normal com protocolo prático e eficaz, de fácil aceitação pelos proprietários para mensurar GE, composição corporal (CC) e fluxo de água (FA) no estilo de vida habitual de gatos é importante para estudos nutricionais mais precisos. Método prático e eficaz para mensuração destes parâmetros, de fácil aplicação em domicílio e que não interfira no estilo de vida e atividade física dos animais é o método da água duplamente marcada que os mensura por meio do enriquecimento e decaimento de deutério (^2H) e oxigênio 18 (^{18}O) na água corporal. O objetivo do presente trabalho foi avaliar protocolo prático de tempos de coleta de enriquecimento (2, 4, 6, 7 e 8 horas) e decaimento (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 dias), bem como os fluidos corporais alternativos saliva e urina, em comparação com o fluido padrão sangue para avaliação da concentração dos isótopos em gatos machos e fêmeas. No estudo do protocolo de tempos de coleta, verificou-se que o ponto máximo de enriquecimento foi às 5h ($P<0,0001$; $R^2=0,82$) e que o decaimento foi linear ($R^2=0,99$; $P<0,0001$), com resultados semelhantes para estimativa do GED em qualquer dia de coleta ($P=0,999$). Catorze gatos adultos, sete machos e sete fêmeas, castrados e saudáveis, tiveram sangue, saliva e urina coletados nos tempos basal, 5h, 7, 10 e 14 dias após aplicação de solução isotópica. O enriquecimento de ^2H e ^{18}O foi menor na urina ($P<0,05$), mas semelhante entre sangue e saliva. Já o decaimento não diferiu entre fluidos. Não houve efeito de fluido para as variáveis CC, GED e FA. O GED foi maior nos machos ($78\text{kcal/kg}^{0,67}/\text{dia}$) do que nas fêmeas ($63\text{kcal/kg}^{0,67}/\text{dia}$), sem diferenças entre sexos na composição corporal percentual. Na estatística Bland e Altman e Correlação de Pearson houve correlação entre o GED estimado com sangue e saliva (viés= 0,4; $r=0,86$; $p<0,001$), 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 (^2H) and oxygen 18 (^{18}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 ^2H and ^{18}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}O) e hidrogênio (deutério, ^2H), 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}O é perdido do corpo em forma de água e dióxido de carbono (CO_2),
116 enquanto o ^2H 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 CO_2 pelo organismo durante o período, resultado da oxidação de gorduras,
119 carboidratos e proteínas. A partir dos dados de produção de 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**

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.

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.

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

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 CO₂ production in mice under different nutritional conditions. *Am J Physiol Endocrinol*
254 *Metab* v. 305, p.317 – 324, 2013.
- 255
- 256 JEUNETTE, 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 D₂O¹⁸. *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.; GOUDOEVEER, 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.

302 **CAPÍTULO 2 - Diferentes fluidos corporais, intervalos de amostragem e efeito do sexo na**
303 **aplicação do método da água duplamente marcada em gatos**
304

305 **Carta de Apresentação**

306 Este estudo explorou métodos que possibilitem mensurar o gasto energético de gatos em seu
307 próprio domicílio, não havendo restrição de atividade física ou alterações do estilo de vida. Sendo o
308 método da água duplamente marcada prático, inócuo ao animal, acurado e preciso, seu emprego em
309 estudos com populações maiores de animais, avaliando a taxa metabólica, composição corporal e
310 fluxo de água serão de grande importância por se obter resultados mais próximos da realidade de um
311 gato domiciliado. As alternativas de fluidos corporais propostos, saliva e urina, são mais facilmente
312 coletados em alguns gatos em comparação com a coleta de sangue, evitando estresse para estes
313 animais e facilitando o possível consentimento dos proprietários para a condução do estudo. A
314 avaliação da acurácia e precisão dos diferentes tempos de coleta propostos, tanto para o conhecimento
315 do enriquecimento como para o decaimento dos isótopos, são importantes para melhor conhecimento
316 e fundamentação da possível flexibilidade deste método de acordo com o comportamento dos gatos
317 ou do interesse de delineamentos específicos.

318 **Diferentes fluidos corporais na aplicação do método da água duplamente marcada para efeito**
 319 **da composição corporal, gasto energético e fluxo de água em gatos machos e fêmeas**

320 Camila Goloni¹, Francine M. Peres¹, Igor L. S. Senhorello¹, Ludmilla G. Di Santo¹, Fernanda S.
 321 Mendonça¹, Bruna A. Loureiro¹, Karina Pfrimer², Eduardo Ferriolli², Gener T. Pereira¹, Aulus C.
 322 Carciofi^{1*}

323 ¹ Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal,
 324 SP, 14884-900, Brasil

325 ² Universidade de São Paulo, Escola de Medicina de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo 14049-
 326 900, Brasil.

327 * Correspondência do autor: aulus.carciofi@gmail.com. Número de telefone + 55 16 3209-2626; fax
 328 número +55 16 3203-1226. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Univ Estadual
 329 Paulista, Via de acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900, Jaboticabal-São Paulo, Brasil.

330

331 **Título breve:** Amostragem alternativa no método da água duplamente marcada

332 **Resumo:** O método da água duplamente marcada mensura a composição corporal (CC), gasto
 333 energético (GED) e fluxo de água (FA) por meio do enriquecimento e decaimento de deutério (²H) e
 334 oxigênio 18 (¹⁸O) na água corporal. O objetivo do presente trabalho foi avaliar protocolo prático de
 335 tempos de coleta de enriquecimento (2, 4, 6, 7 e 8 horas) e decaimento (2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18
 336 e 20 dias), bem como os fluidos corporais alternativos saliva e urina, em comparação com o sangue
 337 para avaliação da concentração dos isótopos em gatos machos e fêmeas. No estudo do protocolo de
 338 tempos de coleta, verificou-se que o ponto máximo de enriquecimento foi às 5h (P<0,0001; R²=0,82)
 339 e que o decaimento foi linear (R²=0,99; P<0,0001), com resultados semelhantes para estimativa do
 340 GED em qualquer dia de coleta (P=0,999). Catorze gatos adultos, sete machos e sete fêmeas, castrados
 341 e saudáveis, tiveram sangue, saliva e urina coletados nos tempos basal, 5h, 7, 10 e 14 dias após
 342 aplicação de solução isotópica. O enriquecimento de ²H e ¹⁸O foi menor na urina (P<0,05), mas
 343 semelhante entre sangue e saliva. Já o decaimento não diferiu entre fluidos. Não houve efeito de
 344 fluido para as variáveis CC, GED e FA. O GED foi maior nos machos (78kcal/kg^{0,67}/dia) do que nas
 345 fêmeas (63kcal/kg^{0,67}/dia), sem diferenças entre sexos na composição corporal percentual. Na
 346 estatística Bland e Altman e Correlação de Pearson houve correlação entre o GED estimado com
 347 sangue e saliva (viés= 0,4; r=0,86; p<0,001), mas não entre sangue e urina (viés=-4,5; r=0,27;
 348 p=0,441). Concluiu-se que o fluido saliva pode ser empregado em substituição ao fluido padrão

349 sangue e, apesar de gatos machos e fêmeas terem apresentado composição corporal semelhantes,
350 machos demonstraram maior gasto energético.

351 **Palavras-chaves:** oxigênio 18; deutério; gasto energético; composição corporal; água; gatos

352 **Introdução**

353 O Nutrient Requirement of Dogs and Cats (2006) indica duas equações para se calcular a
354 necessidade energética diária (GED) de gatos para manutenção de sua massa corporal, em função da
355 composição corporal recomenda uma para gatos obesos e outra para gatos com escore de condição
356 corporal (ECC) até 5, considerado normal em escala de 1 a 9 (LAFLAMME, 1997). Porém outras
357 interferências no GED podem ocorrer além da diferença de composição corporal nos indivíduos. Em
358 relação ao sexo, diferenças presentes também no metabolismo energético de gatos machos e fêmeas,
359 tanto inteiros como castrados, vem sendo estudados ao longo dos anos (KUSTRITZ, 2014;
360 KANCHUK et al., 2003; FETTMAN et al., 1997). Gatos machos tendem a ser mais pesados, com
361 menor gordura corporal e maior massa muscular comparado com fêmeas da mesma espécie
362 (MARTIN et al., 2001; FETTMAN et al., 1997). Fêmeas por apresentarem deposição de gordura
363 maior que machos tendem a apresentar GED menor, pois o tecido adiposo é metabolicamente menos
364 ativo que o tecido muscular (ZORAN, 2010). Outras variações como dieta, estado reprodutivo, raça,
365 ambiente, socialização e fase de vida, interferem na taxa metabólica basal (TMB) e na atividade física,
366 diferindo-se consideravelmente entre os indivíduos ocasionando inconstância no GED (BACKUS e
367 WARA, 2016). O valor do GED de gatos nos estudos disponíveis não representam grandes
368 populações, com número pequenos de animais, sendo estes de laboratório, apresentando
369 características diferentes e metodologias distintas. Faltam estudos com animais domiciliados e com
370 rotina de vida normal, que utilizem método prático e eficaz para mensuração da composição corporal,
371 gasto energético e fluxo de água, de fácil aplicação em domicílio e que não interfira no estilo de vida
372 e atividade física dos animais. Estudar protocolo prático e eficaz, de fácil aceitação pelos proprietários
373 para mensurar estes parâmetros no estilo de vida habitual de gatos expandindo para diversas
374 populações é importante para estudos nutricionais mais precisos.

375 A forma mais simples de se estimar a necessidade energética de manutenção de um animal é
376 pela quantificação da ingestão de um alimento (com base em energia biodisponível), em quantidade
377 suficiente para manutenção da massa corporal estável. Este método, no entanto, é pouco preciso
378 (LIGHTON et al., 2008), porém o mais realizado. Dentre as alternativas disponíveis, avaliar o gasto
379 energético por calorimetria indireta por respirometria é a forma mais tradicional e difundida (WEIR,
380 1949). Contudo, a necessidade de equipamentos específicos e de controle da interferência de fatores
381 externos, mantendo-se o animal confinado a uma câmara de respirometria torna sua execução restrita.

O método da água duplamente marcada (DLW), por meio da diferença de dois isótopos estáveis, deutério (^2H) e oxigênio 18 (^{18}O) na água corporal, mensura-se a produção de dióxido de carbono (CO_2) permitindo incluir a atividade muscular voluntária na estimativa do GED no período, já que o animal é avaliado em condição de liberdade.

O método da água duplamente marcada já é consolidado em seres humanos e animais, tendo sido empregado em diversas fases do ciclo de vida, como neonatos, gestantes, lactantes, adultos e idosos e mesmo em situações de doenças (PFRIMER et al., 2014; RAVELLI et al., 2014; WONG et al., 2014; SCHIERBEEK et al., 2009; SPEAKMAN & KRÓL, 2005). O fluido corporal usual para este método é o sangue, principalmente em animais, porém saliva e urina, ou mesmo determinação dos isótopos nos gases expirados (CZIMADI et al, 2014; FERRIOLLI et al., 2010; SCHIERBEEK et al, 2009; SCHOELER & SANTEN, 1982) foram avaliados. Períodos de coleta de 1, 3, 6, 8 e 10 horas e, 2, 3, 7, 10, 12 e 18 dias com planos de amostragem de 3, 5 ou 8 pontos ao longo do período já foram adotados (GEMMING, 2015; BUTTE, 2014; BERMINGHAM et al., 2013). Apesar de variações em relação ao número e momentos de coleta, concentração dos isótopos na solução a ser inoculada e dose inoculada nos animais, este vem permitindo avanços importantes no estudo do metabolismo energético de cães e gatos. (CENTER et al, 2011; JEUSETTE et al, 2010; AHLSTROM et al, 2006; POUTEAU et al, 2002; MARTIN et al, 2001).

Considerando-se o aprimoramento do método DLW a fim de torná-lo mais prático e menos invasivo, dois objetivos foram propostos para este estudo. O primeiro objetivo foi avaliar protocolo prático de tempos de coleta de enriquecimento e decaimento dos isótopos no sangue para se verificar momentos mais acurados deste método. De acordo com estes resultados, o segundo objetivo deste estudo foi mensurar ^2H e ^{18}O na saliva e urina, em comparação com o sangue na determinação da composição corporal, gasto energético e fluxo de água de gatos adultos machos e fêmeas. Como hipótese do primeiro objetivo espera-se que os isótopos analisados sejam semelhantes em todos os tempos de enriquecimento e de decaimento e, no segundo, que o comportamento dos mesmos no sangue, saliva e urina também sejam semelhantes.

408

409 **Material e Métodos**

410 *Animais e delineamento experimental*

Foram utilizados 14 gatos adultos, sete machos (4,14±3,9 anos; 4,57±0,45 kg; ECC 5,85±0,83 e sete fêmeas (5,57±5,12 anos; 3,74±0,29 kg; ECC 5,42±0,49), castrados, considerados saudáveis mediante exame físico e análises complementares incluindo hemograma, exame de urina e

414 bioquímica sérica (alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina,
415 albumina, ureia e creatinina). Estes permaneceram em ambiente com ciclo de 12 horas de luz /12 sem
416 luz, com temperatura controlada de $26,16 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$, aferidos com Termo-Higrômetro digital (Incoterm®
417 Indústria de Termômetros, São Paulo, Brasil). Durante 14 horas, das 18h às 8h foram alojados
418 individualmente em gaiolas de inox, medindo $0,8\text{m} \times 0,8\text{m} \times 1,0\text{m}$, quando receberam alimento em
419 quantidade controlada. Durante 10 horas, das 8hs às 18hs os gatos permaneceram livres em gatil
420 coletivo, para exercício e socialização, período em que não receberam alimento. Água foi fornecida
421 *ad libitum*. Dois experimentos distintos foram realizados. O primeiro sobre o tempo de enriquecimento
422 e decaimento dos isótopos no compartimento sanguíneo para averiguar as tomadas de tempo mais
423 precisas e acuradas tanto do enriquecimento como do decaimento dos isótopos com período
424 experimental de 20 dias. O segundo experimento, sobre o comportamento dos isótopos nos fluídos
425 alternativos saliva e urina para tornar o protocolo de coletas do método DLW mais prático com
426 período experimental de 14 dias. Nos dois experimentos o período de adaptação dos animais foi de
427 10 dias. Todos os procedimentos foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de
428 Animais (CEUA – FCAV/Unesp, campus de Jaboticabal – SP, Brasil) sob protocolo de nº 7867/16.

429 No primeiro experimento sobre o enriquecimento e decaimento dos isótopos, quatro animais
430 ($4,3 \pm 0,2$ kg; 27 ± 11 meses), dois machos e duas fêmeas foram sedados com acepromazina (Acepran,
431 Vetnil®, São Paulo, Brasil) e hidroclorato de zolazepan (Zoletil, Virbac do Brasil Indústria e
432 Comércio Ltda, São Paulo, Brasil), administrados via intramuscular nas doses de 0,5 e 2,5 mg/kg de
433 peso corporal, respectivamente, para colocação de cateter venoso central na veia jugular (Intracath,
434 30,5cm, 17GA, 1,1mm; Becton Dickison Vascular Access, Sandy, UT). Para se manter a patência os
435 cateteres foram lavados 3 vezes por dia de permanência com solução salina heparinizada diluída
436 (5UI/mL). Após recuperação de 48h, amostras de sangue basal foram coletadas e a solução isotópica
437 aplicada. Amostras de sangue foram tomadas pelo cateter às 2, 4, 6, 7 e 8 horas pós inoculação, sendo
438 então o cateter removido. Nos dias 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 e 20 amostras de sangue foram tomadas
439 por punção da veia jugular, em horário próximo à aplicação da solução de isótopos no dia zero. A
440 cada coleta 3mL de sangue foram recolhidos, sendo este depositado em tubo vacutainer sem
441 anticoagulante (BD Vacutainer® New Jersey, EUA), centrifugado em centrífuga sorológica (ALB
442 32/153.5, Inbras® Equipamentos para Saúde, Jardinópolis, São Paulo, Brasil), sendo soro separado.

443 Para o segundo experimento, sobre o estudo do comportamento dos isótopos na saliva e urina,
444 foram empregados todos os 14 gatos. Considerando os resultados obtidos no primeiro experimento,
445 amostras de fluídos corporais (sangue, saliva e urina) foram tomadas nos tempos basal (antes da
446 aplicação dos isótopos) e subsequentemente às 5 horas (período de enriquecimento dos isótopos), 7,
447 10 e 14 dias (períodos de decaimento dos isótopos) após aplicação dos isótopos. As amostras de

448 sangue foram colhidas por venopunção na veia jugular, conforme procedimento descrito
449 anteriormente. As amostras de saliva foram colhidas com auxílio de algodão hidrofílico. A indução
450 de salivação nos gatos foi realizada administrando-se uma gota de dipirona sódica (500 mg/mL,
451 Novalgina[®], EMS, São Bernardo do Campo, Brasil) diretamente na cavidade oral, equivalente a 25
452 mg de dipirona sódica/gato. Considerando-se que a dose usual desta medicação é de 25mg/kg/dia
453 (CRIVELLENTI & BORIN-CRIVELLENTI, 2015), apenas ¼ do recomendado foi aplicado, de
454 modo que o procedimento pode ser considerado seguro. Não houve efeito nocivo da medicação nestes
455 animais. Após administração do medicamento, um primeiro algodão era depositado na parte externa
456 da cavidade oral, rente à boca, aguardando ser embebido com saliva sendo, posteriormente,
457 descartado. O segundo algodão era então depositado da mesma forma que o primeiro, aguardando-se
458 até 5 minutos sendo posteriormente removido, depositado em seringa descartável de 20 mL e, por
459 compressão manual coletado no mínimo 1,5 mL de saliva de cada gato. Para as coletas de urina os
460 animais permaneceram em gaiolas metabólicas até o período em que urinaram espontaneamente, não
461 excedendo 24 horas. Quando nas gaiolas estes foram continuamente monitorados, a urina recolhida
462 imediatamente após micção espontânea, em garrafas coletoras sem nenhum tipo de conservante,
463 depositadas sob o funil coletor das gaiolas.

464 No dia anterior à aplicação dos isótopos, a urina basal foi recolhida para garantir que as
465 amostras basais de urina fossem coletadas de todos os gatos. Todos os gatos urinaram
466 espontaneamente em período de 12 horas antes da aplicação dos isótopos. A primeira urina recolhida
467 após a aplicação da solução de isótopos foi empregada para a determinação do enriquecimento
468 corporal, este período ocorreu entre 5 a 24 horas após a inoculação. O total de urina coletada por
469 amostra foi de 2 mL. Todas as amostras de soro sanguíneo, saliva e urina foram armazenadas em
470 criotubo com tampa rosqueável, envolto com parafina plástica, congelado a -20°C até o
471 processamento da análise. Os momentos exatos em que as amostras de sangue, saliva e urina foram
472 coletadas eram anotados para posterior cálculo da constante de decaimento.

473 Os gatos foram alimentados com dieta formulada para gatos adultos com baixo gasto
474 energético, de acordo com FEDIAF (2016). Esta foi produzida no Laboratório de Extrusão da
475 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária da Unesp, câmpus de Jaboticabal, São Paulo, Brasil. A
476 formulação e composição analisada da ração encontra-se na Tabela 1. Previamente ao estudo, os
477 coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e a energia metabolizável do alimento foram
478 determinados *in vivo* com seis gatos, pelo método de coleta total de fezes e urina empregando-se
479 período de adaptação ao alimento de 10 dias e período de coleta total de fezes e urina de 7 dias,
480 seguindo-se recomendações de execução da FEDIAF (2016). Para o cálculo, a energia bruta das fezes
481 e urina foi determinada em bomba calorimétrica adiabática (IKA calorimeter, C200; IKA-Werke
482 GmbH & Co.KG, Staufen, Germany).

Durante os experimentos, o alimento fornecido era pesado, bem como as sobras, registrando-se o consumo diário de cada animal. A quantidade de alimento fornecido foi inicialmente estabelecida de acordo com o histórico de consumo de cada animal. Os gatos foram então pesados semanalmente no mesmo período do dia, sendo a quantidade oferecida ajustada de modo aos animais manterem massa corporal constante. Para fins de comparação de métodos, o consumo de calorias de cada gato também foi registrado pela oferta de alimento em período de 14 dias. Foi mensurado a partir da quantidade em gramas consumida multiplicado pela energia metabolizável *in vivo* do alimento consumido.

Tabela 1. Composição química analisada, energia metabolizável e coeficiente energético do alimento utilizado no estudo. Valores expressos na matéria seca.

Item	
Umidade (%)	4.8
Proteína bruta (%)	38.9
Extrato etéreo hidrólise ácida (%)	14.2
Amido (%)	28.7
Fibra bruta (%)	3.4
Matéria mineral (%)	5.4
Cálcio (%)	0.8
Fósforo (%)	0.8
Energia Metabolizável (kcal/g) *	3.6
Coeficiente do alimento †	0.817

Composição de ingredientes: milho grão 38.0%; farinha de vísceras de frango 23.0%; proteína isolada de soja 13.9%; gordura de aves 9.4%; proteína isolada de suíno 5.0%; arroz quíntera 5.0%; fibra de cana 2.0% (Vit2be Fiber, SPF do Brazil, Descalvado, Brazil); palatabilizante líquido 1.0% (SPF Brasil, Descalvado, SP, Brazil); sal comum 0.6%; cloreto de potássio 0.58%; premix mineral e vitamínico 0.5%; cloreto de colina 0.4%; calcário 0.3%; taurina 0.12%, antifúngico 0.1% (Mold Zap Citrus: Ammonium dipropionate, acetic acid, sorbic acid and benzoic acid. Alltech do Brazil Agroindustrial Ltda); antioxidante 0.04% (Banox: Butylated hydroxyanisole, butylated hydroxytoluene, propyl gallate and calcium carbonate. Alltech do Brazil Agroindustrial Ltda); óleo de salmão 0.08%.

* Determinada com seis gatos, pelo método de coleta total de fezes e urina.

† De acordo com os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta de 88,7%, do extrato etéreo de 88,6% e do amido de 99,9%, determinados com seis gatos, pelo método de coleta total de fezes (FEDIAF, 2016).

Aplicação e análise dos isótopos

507 A solução de isótopos foi administrada na dose aproximada de 0,12g/kg de água corporal de
 508 ^2H a 99,9 atm% e 2g/kg de água corporal de ^{18}O a 10 atm% (Sercon Limited, Unit 3B Crewe Trade
 509 Park, Gateway, Crewe, Cheshire, UK). Para isto foi preparada solução 6:100 (p/p) de ^2H a 99,9 atm%
 510 e ^{18}O a 10 atm%, sendo esta inoculada na dose fixa de 8g por gato. Esta foi aplicada por via
 511 subcutânea, entre as escápulas, após período de jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 4 horas. Ao
 512 aplicar esta solução nos gatos do primeiro estudo, estes manifestaram dor no local. Com isso, para o
 513 segundo estudo, 0.3 mL de NaCl 20% (Eurofarma Laboratórios LTDA., São Paulo, Brasil) foi
 514 aplicada juntamente com a solução de isótopos, de modo a aproximar a osmolalidade da solução da
 515 osmolalidade do interstício, não havendo posteriormente a isto demonstração de dor na aplicação.
 516 Visando-se acurácia na aplicação e precisão no conhecimento da dose administrada, foram pesadas
 517 em balança de precisão a seringa antes de ser preenchida, a seringa mais a solução de NaCl 20% (para
 518 o segundo experimento), a seringa mais a solução de isótopos e, por fim, a seringa imediatamente
 519 após inoculação dos isótopos nos animais, de acordo com recomendações de Ferriolli et al., (2008).
 520 A massa corporal dos gatos para fins dos cálculos foi estabelecido a cada 7 dias no mesmo horário
 521 do dia, sendo a precisão das balanças aferida a cada dia de procedimento com pesos padrões
 522 certificados (INMETRO: peso-padrão de 10 g até 1 kg - Classe de Exatidão OIML E1; Incerteza: 1/3
 523 do erro máximo admissível para a classe de exatidão OIML E1/2004).

524 As concentrações de isótopos nas amostras biológicas foram analisadas no Laboratório de
 525 Espectrometria de Massa da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP. Os isótopos foram
 526 analisados por espectrometria de massa por determinação da razão isotópica (IRMS) em equipamento
 527 Sistema Hydra (ANCA 20-20, Europa Scientific, Cheshire, UK), de acordo com procedimentos
 528 descritos por Ferriolli et al., (2008). As amostras para ^2H foram processadas em triplicata (100 μL
 529 por replicação) com platina em vacutainers, seguindo-se de seis horas em repouso. As amostras de
 530 O^{18} foram processadas em triplicata (100 μL por replicação), preenchidas com CO_2 e deixadas em
 531 repouso por 24 horas, posteriormente se isolando e purificando o composto.

532

533 *Procedimentos de cálculo*

534 Para estimativa do contingente de água corporal, utilizou-se equação proposta por Schoeller
 535 et al., (1996):

$$536 \quad N \text{ (moles)} = \left(\frac{WA}{18,02a} \right) \times \frac{(\delta a - \delta t)}{(\delta s - \delta p)} f$$

537 Onde: N = água corpórea; W= unidade ou cte A= dose administrada; a= dose diluída para análise;
 538 δa = enriquecimento da dose; δt = enriquecimento da água; δs = enriquecimento da amostra; δp =

539 enriquecimento da amostra pré-dose; f= fator de correção para o isótopo deutério de acordo com a
 540 relação Nd/No de cada fluido avaliado. Nd (contingente de água corporal com deutério) e No
 541 (contingente de água corporal com oxigênio).

542 A determinação da massa magra baseou-se no princípio de sua constante de hidratação, de
 543 73,2% para mamíferos, pela seguinte equação: massa magra (MM, kg) = (água corpórea, kg/0,732) x
 544 100. Por diferença entre a massa magra em kg e a massa corporal do gato, estimou-se a massa gorda
 545 do animal, em kg (RATHBUN; PACE,1945).

546 O enriquecimento da água corporal com ^2H e ^{18}O foi estabelecido pela amostra tomada no
 547 momento de concentração máxima dos isótopos. A curva de decaimento foi estabelecida com as
 548 amostras tomadas nos diferentes dias pós-inoculação. No segundo experimento estas foram realizadas
 549 considerando os três fluídos corporais estudados (sangue, saliva e urina). Para cálculo da taxa de
 550 eliminação de ^2H e ^{18}O foi utilizada equação do método de dois pontos (SCHOELLER et al., 1986),
 551 obtendo-se uma constante para cada isótopo:

552
$$K = \frac{\text{LN}[X(t2) - X(t1)]}{t2 - t1}$$

553 Onde: K = constante de decaimento; LN = logaritmo natural; X(t2) = último ponto de decaimento
 554 coleta; X(t1)= ponto de coleta do enriquecimento do isótopo; t1 = dia de coleta do enriquecimento;
 555 t2 = último dia de coleta.

556 O cálculo da quantidade de CO_2 produzido foi estabelecido segundo equação de Ballevre et
 557 al., (1994):

558
$$\text{rCO}_2 \text{ (mol/d)} = (1/2.08) * (\text{No.Ko}) - (\text{Nd.Kd}) - 0,0258 * (\text{No.Ko}) - (\text{Nd.Kd})$$

559 Onde: rCO_2 = produção de CO_2 ; No = contingente de água corporal estimado com ^{18}O ; Ko = constante
 560 de decaimento do ^{18}O ; Nd = contingente de água corporal estimado com ^2H ; Kd = constante de
 561 decaimento da água com ^2H .

562 Por fim, para determinação do gasto energético diário (GED) dos gatos foi empregada equação
 563 descrita por Elia (1990):

564
$$\text{GED} \left(\frac{\text{kJ}}{\text{dia}} \right) = \text{rCO}_2 * 22,4 \left(\frac{3,7}{\text{FQ}} + 1,326 \right) * 4,18$$

565 Onde: GED = gasto energético diário; rCO_2 = produção de CO_2 ; FQ = coeficiente do alimento

O coeficiente do alimento (FQ) foi calculado a partir de sua composição de nutrientes digestíveis, de acordo com os coeficientes de digestibilidade aparente da proteína bruta (88.7%), extrato etéreo (88.6%) e amido (99.9%) determinados em ensaio de digestibilidade *in vivo* com 6 gatos, pelo método de coleta total de fezes e urina (FEDIAF, 2016). O FQ foi calculado segundo Black et al., (1986):

$$FQ = \frac{(P * 0,781) + (G * 1,427) + (A * 0,746)}{(P * 0,996) + (G * 2,019) + (A * 0,746)}$$

Onde: FQ = coeficiente do alimento; P = proteína digestível; G = extrato etéreo digestível; A = amido digestível. Numerador é a produção de CO₂, denominador e oxidação destes substratos. Sempre será menor que 1, pois a oxidação nunca supera a produção de CO₂.

O cálculo do fluxo de água seguiu recomendações de Hendriks et al., (1999):

$$TH \text{ (mL/dia)} = Nd * Kd * 18,02$$

Onde: TH = water turnover; Nd = deuterium body water; K = deuterium decay constant.

Análise Estatística

Este estudo considerou como unidade experimental o gato. No primeiro experimento, apenas 4 repetições foram utilizados devido ao protocolo experimental ser invasivo aos animais conforme descrito anteriormente. O número amostral do experimento dois foi baseado nas informações deste primeiro experimento. Após estabelecido poder do teste de 0,8, α de 0,05, com desvio padrão médio de 18,5 e erro de aproximadamente 25, utilizando pacote SampleSize do software R, o tamanho da amostra foi igual a 7. O poder do teste foi calculado pelo pacote Opdoe do software R.

A cinética de enriquecimento e decaimento dos isótopos ²H e ¹⁸O foi descrita por análise estatística descritiva e regressões polinomiais em delineamento inteiramente casualizado. O segundo experimento seguiu arranjo fatorial. Para as variáveis razão Nd/No, CO₂, GED e fluxo de água, o arranjo fatorial seguiu modelo 3 x 2, composto por 3 fluídos corporais (sangue, saliva e urina) e dois sexos (machos e fêmeas), totalizando seis tratamentos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, considerando-se os efeitos de tipo de fluído corporal, sexo e interação fluído * sexo. Para as variáveis coeficiente angular do decaimento dos isótopos, massa magra e massa gorda foi estabelecido arranjo fatorial 3 x 2 x 2, composto por 3 fluídos corporais (sangue, saliva e urina), dois isótopos (²H e ¹⁸O) e dois sexos (machos e fêmeas), totalizando doze tratamentos. Os dados obtidos

foram submetidos à análise de variância, considerando-se os efeitos de tipo de fluido corporal, sexo, isótopo e interações fluido * sexo, fluido * isótopo, sexo * isótopo e fluido * sexo * isótopo. Nas duas situações, quando diferenças foram detectadas no teste F, médias entre os três fluidos corporais foram comparadas pelo teste de Tukey. O efeito de tempo no decaimento dos isótopos, dentro de cada fluido corporal foi avaliado por contrastes polinomiais, considerando no eixo x o tempo e no eixo y os isótopos. Os limites de concordância entre as estimativas do gasto energético nos três fluidos corporais e no método do consumo de alimento foram estabelecidos de acordo com Bland e Altman (1986) e Correlação de Pearson. O viés médio foi avaliado pela diferença entre os métodos utilizados e suas médias. O erro absoluto médio (1) e o erro quadrático médio (2), foram calculados para cada fórmula usando as equações abaixo:

$$(1) \text{ Mean Absolute Error (MAE)} = \frac{\sum_{I=1}^n |P_I - O_I|}{N};$$

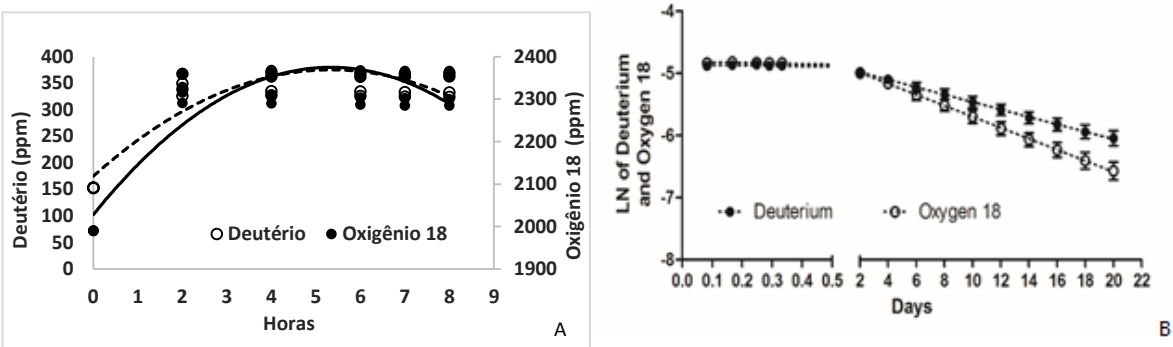
$$(2) \text{ Root Mean Square Errors (RMSE)} = \sqrt{\frac{\sum_{I=1}^n (P_I - O_I)^2}{N}}.$$

Valores de $P < 0.05$ foram considerados significativos. Foi verificado que todos os dados se ajustaram aos pressupostos da análise de variância. As análises de Bland e Altman e Correlação de Pearson foram realizadas com o software estatístico Sigma Plot versão 14.0 (Systat Software, USA, 2017). As demais análises estatísticas foram realizadas com software SAS versão 9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA, 2003).

613

614 Resultados

No experimento um, foi verificado que o enriquecimento dos isótopos de ^2H e ^{18}O ocorreu logo na primeira amostragem, após 2h da aplicação. Os valores de enriquecimento medidos no compartimento sanguíneo não diferiram entre os tempos 2h, 4h, 6h, 7h e 8h ($P = 0.943$). Todavia, em função da concentração basal dos isótopos ser baixa, o enriquecimento foi descrito por equação polinomial de segundo grau, cuja derivada resultou em enriquecimento máximo às 5h e 20min, para os dois isótopos ($R^2 = 0.82$; $P < 0.0001$) observado na Figura 1. Já o decaimento de ^2H e ^{18}O foi linear ($R^2 = 0.99$; $P < 0.0001$), o que resultou em estimativas similares da produção de CO_2 , independente do dia de decaimento ($P = 0.999$) e mesmo do horário de enriquecimento considerados para o cálculo, como pode ser observado na Figura 1.



624

625 Figura 1. Curva de enriquecimento A ($P=0.943$) e decaimento B ($P=0.999$) de ^2H e ^{18}O no
626 contingente sanguíneo de gatos durante o experimento um ($n=4$).

627 Durante o experimento dois, o peso corporal dos gatos não se alterou ao longo da avaliação
628 da cinética dos isótopos (Tabela 2). Em todo o período experimental as fêmeas foram menos pesadas
629 do que machos ($P<0.0001$). Em relação ao consumo do alimento (Tabela 2), machos apresentaram
630 consumo maior que fêmeas ($P=0.0009$).

631 Tabela 2. Massa corporal dos gatos ao início e final da avaliação da cinética dos isótopos e consumo
632 de gatos machos e fêmeas durante o experimento dois.

	Massa corporal (kg)		Média	P-valor	Ingestão de Alimento (g de MS)	Desvio Padrão
	Início	Final				
Machos	4.57	4.62	4.60	0.1341	69.1	6.27
Fêmeas	3.74	3.84	3.79	0.1379	57.0	7.76

633

634 As concentrações basais de ^{18}O não variaram entre os fluídos corporais analisados e sexo dos
635 gatos ($P>0.05$; Tabela 3). Não foi verificada interação fluído*sexo para nenhuma medida ($P>0.05$).
636 Houve, no entanto, efeito de tipo de fluído na avaliação do enriquecimento de ^{18}O , com resultados
637 semelhantes entre sangue e saliva, mas menores na urina dos gatos ($P<0.05$). As avaliações do
638 decaimento, por outro lado, demonstraram resultados semelhantes de ^{18}O para os três fluídos
639 corporais estudados ($P>0.788$). Efeito de sexo foi verificado para o enriquecimento e todas as
640 avaliações de decaimento, com maior concentração de ^{18}O para as fêmeas em relação aos machos
641 ($P<0.01$).

642 Tabela 3. Concentração de ^{18}O (ppm) nos diferentes fluidos corporais e momentos de análise de gatos
643 machos e fêmeas, durante o experimento dois.

Momento	Fluido corporal			Média	EPM ¹	P-valor		
	Sangue	Saliva	Urina			Fluido	Sexo	Fluido*Sexo
Macho basal	1994	1995	1986	1992	1.9			
Fêmea basal	1990	1991	1988	1990	1.1			
<i>Média</i>	1992	1993	1987			0•154	0•348	0•446
Macho 5h	2278	2271	2243	2265	6.9			
Fêmea 5h	2356	2345	2311	2342	9.5			
<i>Média</i> ²	2317 ^a	2308 ^{ab}	2286 ^b			0•044	<0•0001	0•979
Macho 7d	2142	2140	2144	2142	2.9			
Fêmea 7d	2180	2178	2180	2179	4.7			
<i>Média</i>	2161	2159	2162			0•788	<0•0001	0•956
Macho 10d	2107	2105	2103	2105	2.7			
Fêmea 10d	2134	2131	2133	2133	4.5			
<i>Média</i>	2120	2118	2118			0•807	<0•0001	0•849
Macho 14d	2073	2071	2073	2072	3.8			
Fêmea 14d	2090	2088	2080	2087	3.9			
<i>Média</i>	2081	2080	2076			0•819	0•018	0•714

644 ¹ EPM = erro padrão da média (n= 7 gatos por sexo)

645 ² Médias nas linhas sem uma letra em comum são diferentes pelo teste de Tukey (P<0•05)

646

647 As concentrações basais de ²H foram menores na urina em relação à saliva (P<0•05), embora
648 os fluídos saliva e urina tenham sido semelhantes ao sangue (P>0•05; Tabela 4). Não foi verificada
649 interação fluido*sexo para nenhuma medida (P<0•05). Houve efeito de tipo de fluido na avaliação do
650 enriquecimento de ²H, com resultados semelhantes entre sangue e saliva, mas menores na urina dos
651 gatos (P<0•05). As avaliações do decaimento demonstraram resultados semelhantes de ²H para os
652 três fluídos corporais estudados (P=0•562). Efeito de sexo também foi verificado para o
653 enriquecimento e decaimento de ²H, com maior concentração do isótopo para as fêmeas em relação
654 aos machos (P<0•01).

655 Tabela 4. Concentração de ²H (ppm) nos diferentes fluidos corporais e momentos de análise de gatos
656 machos e fêmeas, durante o experimento dois.

Momento	Fluido corporal			Média	EPM ¹	P-valor		
	Sangue	Saliva	Urina			Fluido	Sexo	Fluido*Sexo
Macho basal	151.0	151.4	150.6	151.0	0.2			
Femea basal	150.9	151.1	150.0	150.6	0.2			
<i>Média</i> ²	150.9 ^{ab}	151.2 ^a	150.0 ^b			0•003	0•422	0•797
Macho 5h	313.5	307.5	290.6	303.9	4.1			
Femea 5h	352.9	344.4	333.9	344.9	3.7			
<i>Média</i> ²	333.2 ^a	325.9 ^{ab}	308.0 ^b			0•002	<0•0001	0•732
Macho 7d	255.2	251.9	255.5	254.2	2.4			
Femea 7d	281.1	277.2	280.8	279.7	3.4			
<i>Média</i>	268.2	264.5	268.2			0•567	<0•0001	0•988

Macho 10d	238.2	234.9	235.4	236.2	2.2			
Femea 10d	259.5	255.7	259.5	258.2	3.4			
Média	248.8	245.3	247.5			0.618	<0.0001	0.888
Macho 14d	218.8	216.4	217.8	217.7	1.9			
Femea 14d	236.4	233.9	230.7	234.0	3.1			
Média	227.6	225.2	222.9			0.562	<0.0001	0.908

657 ¹ EPM = erro padrão da média (n= 7 gatos por sexo)

658 ² Médias nas linhas sem uma letra em comum são diferentes pelo teste de Tukey (P<0.05)

659

660 O decaimento de ²H e de ¹⁸O foi linear (P<0.001) nos três fluídos corporais estudados, como

661 está apresentado na Figura 2. O coeficiente angular dos decaimentos de ²H e ¹⁸O foram semelhantes

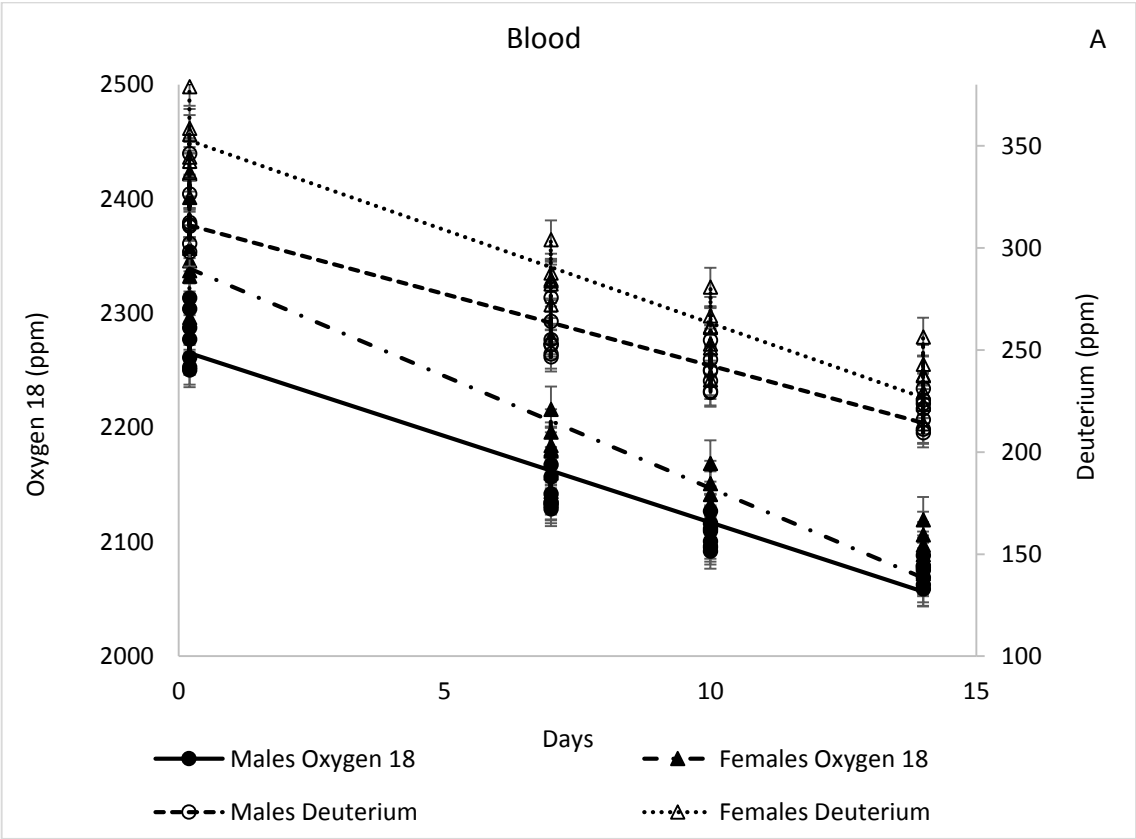
662 entre os fluidos sangue e saliva (P=0.7457) e diferentes entre sangue e urina (P=0.0002) e saliva e

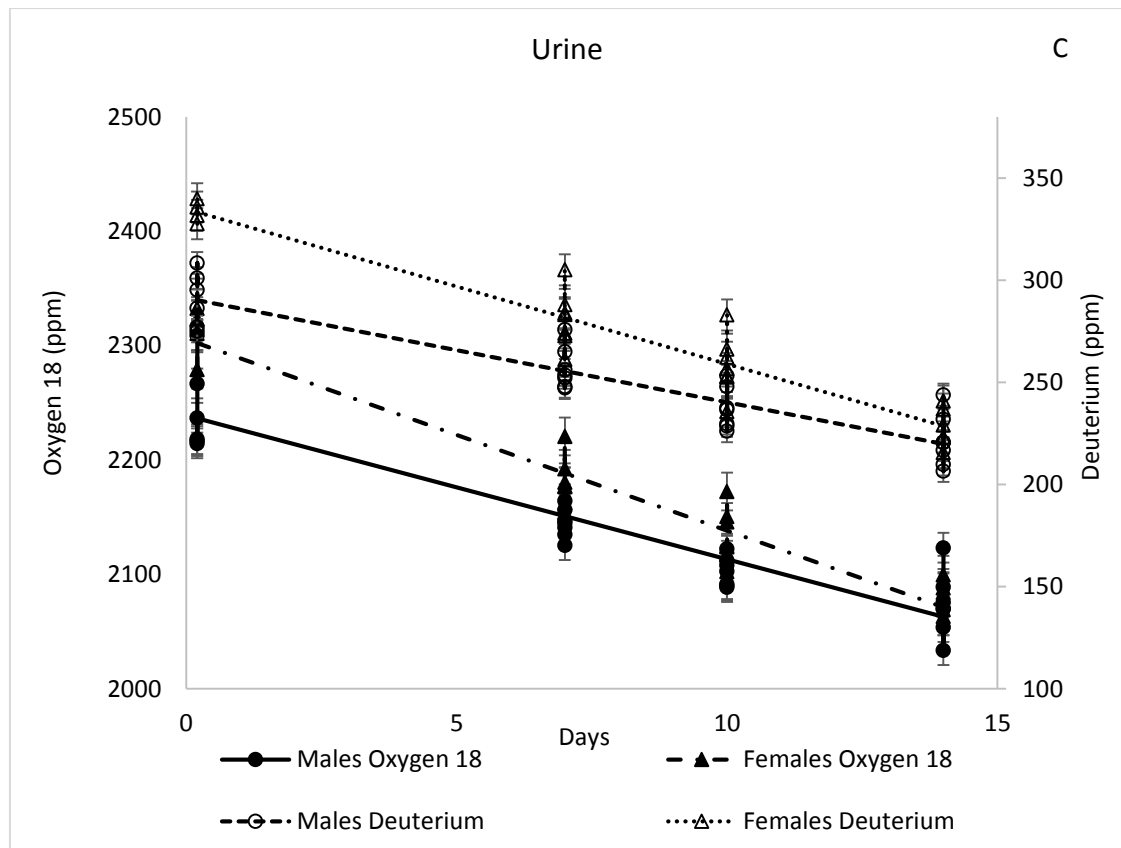
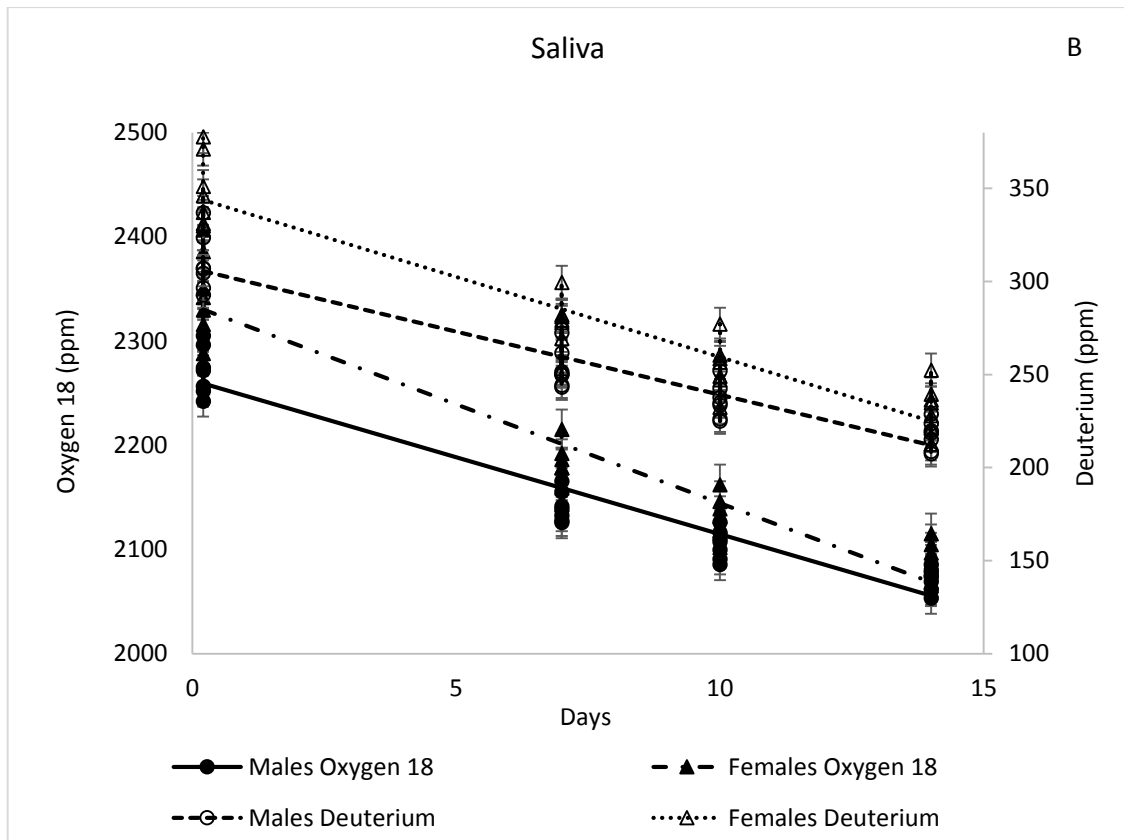
663 urina (P=0.0022). As médias e o desvios padrões dos coeficientes angulares de fêmeas e machos para

664 ²H e ¹⁸O foram: -8.4±1.4°, -6.2±1.4°, -18.2±3.1°, -13,8±3.3°, respectivamente. Os valores foram

665 diferentes entre os sexos (P<0.05) para os dois isótopos. Entre os isótopos, tanto para machos como

666 para fêmeas, houve diferença em seus decaimentos (P<0.0001).





668

669

670 Figura 2. Representação gráfica do decaimento de ^{18}O e ^2H no sangue, na saliva e na urina de gatos
 671 machos e fêmeas, durante o experimento dois. A= decaimento de ^{18}O e ^2H no sangue, B= decaimento

672 de ^{18}O e ^2H na saliva, C= decaimento de ^{18}O e ^2H na urina. (n= 7 gatos por sexo para sangue e saliva;
673 n=6 para machos e n=4 para fêmeas na urina).

674 Os valores da razão Nd/No e composição corporal estão descritas na Tabela 5. As médias da
675 razão Nd/No apresentaram valores de 1,07 para o sangue, 1,08 para saliva e 1,12 para urina,
676 considerados no cálculo da composição corporal pelo isótopo de deutério, como fator de correção.
677 Esta razão não variou em relação ao sexo e ao tipo de fluido estatisticamente, não havendo interação
678 entre ambos ($P>0.05$). A composição corporal calculada com os isótopos ^{18}O e ^2H foram semelhantes,
679 apresentando valores de $P>0.05$, também não havendo diferença entre os tipos de fluido ($P>0.05$).
680 Não houve interação entre tipo de fluido, sexo ou isótopo ($P>0.05$). Em relação ao sexo, como machos
681 foram mais pesados estes apresentaram mais massa magra (kg) e massa gorda (kg) do que fêmeas
682 ($P<0.05$). No entanto, a composição corporal não diferiu entre machos e fêmeas em composição
683 percentual de massa magra e massa gorda ($P>0.05$).

684 Tabela 5. Razão Nd/No, massa magra e massa gorda de gatos machos e fêmeas durante o experimento dois.

	Fluido corporal			<i>Média</i>	EPM ¹	P-valor [†]		
	Sangue	Saliva	Urina			Fluido	Sexo	Isótopo
Nd/No								
Macho	1.06	1.07	1.14	1.09	0.01			
Fêmea	1.07	1.09	1.09	1.08	0.01			
<i>Média</i>	1.07	1.08	1.12			0•1494	0•7849	0•2529
Massa magra (kg) *								
Macho	3.41	3.52	3.73	3.55	0.08			
Fêmea	2.75	2.83	2.87	2.79	0.08			
<i>Média</i>	3.08	3.18	3.19			0•1326	<0•0001	0•1925
Massa magra (%) *								
Macho	75.3	77.6	83.0	78.6	2.05			
Fêmea	73.9	76.4	76.8	75.7	2.05			
<i>Média</i>	74.7	77.2	77.2			0•1796	0•2135	0•2188
Massa gorda (kg) *								
Macho	1.13	1.02	0.95	1.03	0.07			
Fêmea	0.96	0.86	0.84	0.88	0.07			
<i>Média</i>	1.04	0.94	0.98			0•1657	0•0005	0•2973
Massa gorda (%) *								
Macho	24.6	22.3	20.8	22.5	1.48			
Fêmea	26.0	23.5	22.9	24.1	1.48			
<i>Média</i>	25.2	22.7	23.7			0•0704	0•3563	0•2745

685 * Valores de massa magra (kg e %) e massa gorda (kg e %) calculados com isótopo de ¹⁸O.

686 [†] Não houve interação fluido*sexo, fluido*isótopo, sexo*isótopo e fluido*sexo*isótopo (P>0•05).

687 ¹ EPM = erro padrão da média (n= 7 gatos por sexo para sangue e saliva; n=6 para machos e n=4 para fêmeas na urina)

688

689 A produção de CO₂ e as estimativas de GED não variaram em função do fluído empregado
 690 (P>0.05). No entanto, as estimativas com emprego de sangue e saliva foram numericamente mais
 691 próximas do que as com urina. Em relação ao sexo, os gatos machos apresentaram maior produção
 692 de CO₂ e GED do que as fêmeas, tanto este expresso em MJ/kg massa corporal^{0.67}/dia como em MJ/kg
 693 massa magra^{0.67}/dia (P<0.001), representados na Tabela 6. Como estas estimativas foram realizadas
 694 com a equação de dois pontos, foram comparados os resultados obtidos com os valores de isótopos
 695 dos dias 7, 10 ou 14 (Figura 3), obtendo-se resultados de GED semelhantes (P=0.269).

696 Tabela 6. Produção de CO₂ e gasto energético diário de gatos machos e fêmeas durante o experimento
 697 dois. Valores expressos com a média dos dias 7, 10 e 14 de decaimento dos isótopos.

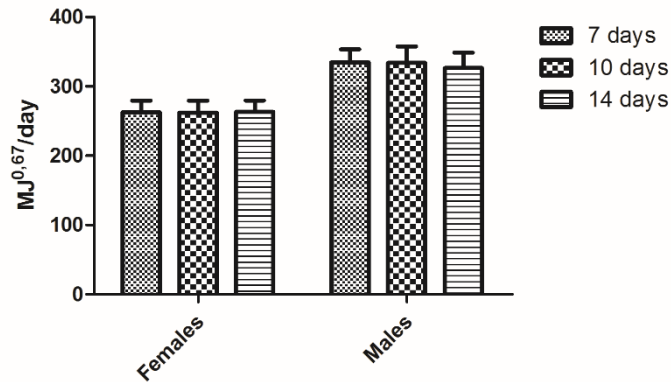
	Fluido corporal			Média	EPM ¹	P-valor		
	Sangue	Saliva	Urina			Fluido	Sexo	Fluido*Sexo
CO ₂ (mol/dia)								
Macho	1.6	1.6	1.7	1.6	0.05			
Fêmea	1.1	1.1	1.2	1.2	0.05			
<i>Média</i>	1.4	1.3	1.5			0.5248	<0.0001	0.9621
kcal/kg peso corporal ^{0.67} /dia*								
Macho	326.4	325.6	344.0	331.8	2.50			
Fêmea	263.3	260.4	289.2	270.8	2.80			
<i>Média</i>	294.6	293.0	316.8			0.4732	0.0007	0.9663
kcal/kg massa magra ^{0.67} /dia [†]								
Macho	396.6	387.4	388.7	390.8	2.40			
Fêmea	323.9	316.0	349.0	329.8	2.60			
<i>Média</i>	360.3	351.9	369.0			0.6727	0.0004	0.6358
Fluxo de água (mL/kg ^{0.67} /dia) [‡]								
Macho	61.6	64.2	60.8	62.2	2.21			
Fêmea	60.1	61.6	65.1	62.3	2.34			
<i>Média</i>	60.9	62.9	63.0			0.8154	0.9744	0.6949

698 * Gasto energético calculado com a média dos três dias de decaimento

699 † Teor de massa magra estimado com o isótopo ¹⁸O e cálculo com a média dos três dias de decaimento.

700 ‡ Fluxo de água estimado com Nd e Kd e média dos três dias de decaimento.

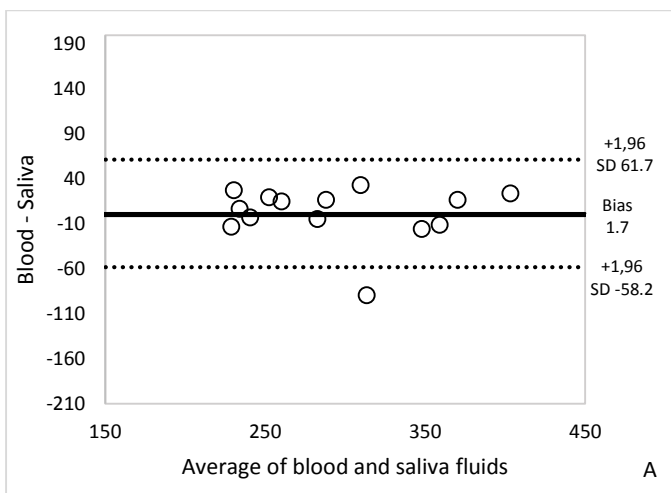
701 ¹ EPM = erro padrão da média (n= 7 gatos por sexo para sangue e saliva; n=6 para machos e n=4 para
 702 fêmeas na urina)



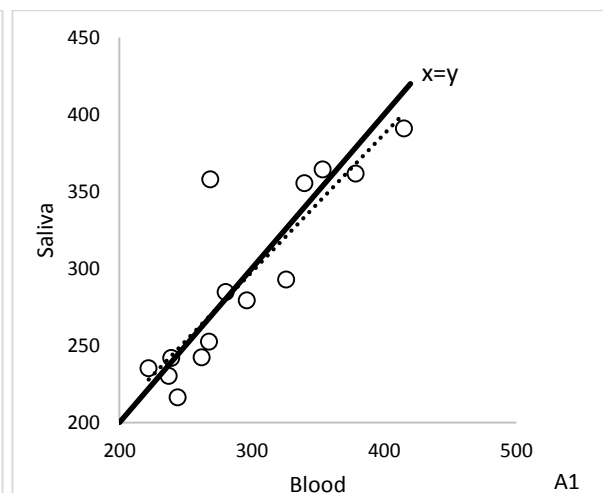
703

704 Figura 3. Gasto energético diário (MJ/kg PC^{0.67}/dia) de gatos machos e fêmeas, estimados
 705 considerando decaimento de isótopos no compartimento sanguíneo nos dias 7, 10 e 14 durante o
 706 experimento dois.

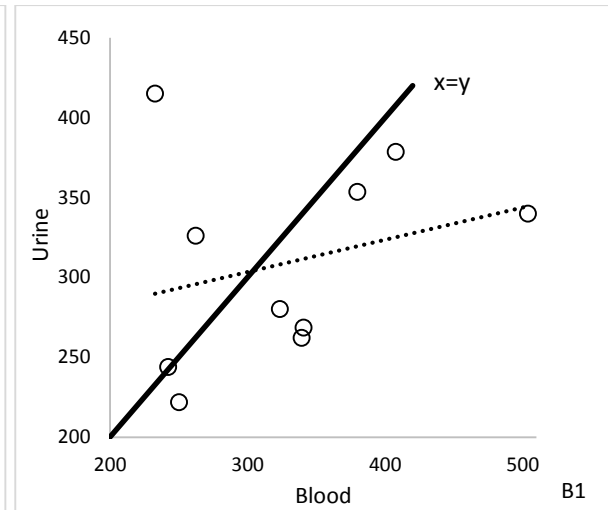
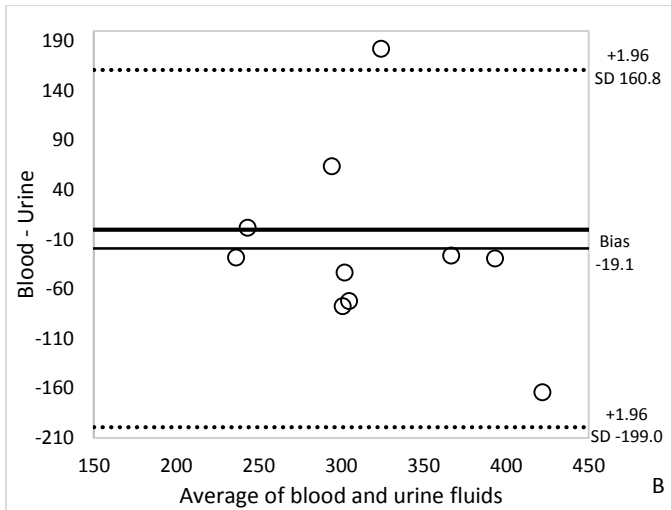
707 Comparação independente do sexo do GED (kcal/kg peso corporal^{0.67}/dia) estimado pelos três
 708 fluídos corporais e pelo método de consumo de alimento foi realizada pelo teste estatístico proposto
 709 por Bland e Altman (1986) e por Correlação de Pearson dos métodos, como apresentado na Figura 4.
 710 A diferença entre as estimativas do sangue com a saliva apresentou viés de 1.7 MJ/kg^{0.67}/dia com
 711 variação de 61.7 e -58.2 e coeficiente de correlação de 0.86, enquanto entre sangue e urina viés de -
 712 19.1 MJ/kg^{0.67}/dia e variação de 160.8 a -199 e correlação de 0.27 e, por último, DLW utilizando o
 713 fluido sangue e método de consumo de alimento com viés de -54.7 MJ/kg^{0.67}/dia com variação de
 714 45.1 a -154 e correlação de 0.51. Por fim, a estimativa de GED pelo método da água duplamente
 715 marcada utilizando sangue com a obtida pelo método de consumo de alimento está apresentada na
 716 Figura 5. Pode-se notar que houve diferença estatística entre os resultados obtidos pelos dois métodos
 717 ($P < 0.0043$) e entre os sexos ($P = 0.0133$). Fêmeas com o método do DLW apresentaram médias de
 718 259 MJ/kg^{0.67}/dia e com o método do consumo 338 MJ/kg^{0.67}/dia, enquanto que machos apresentaram
 719 médias 330 MJ/kg^{0.67}/dia e 359 MJ/kg^{0.67}/dia, respectivamente.



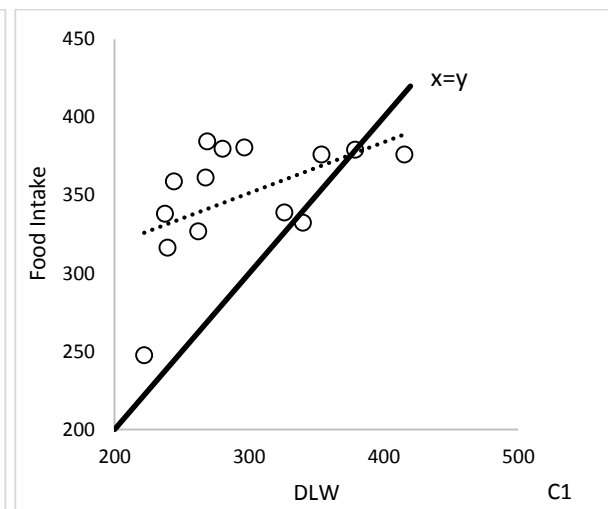
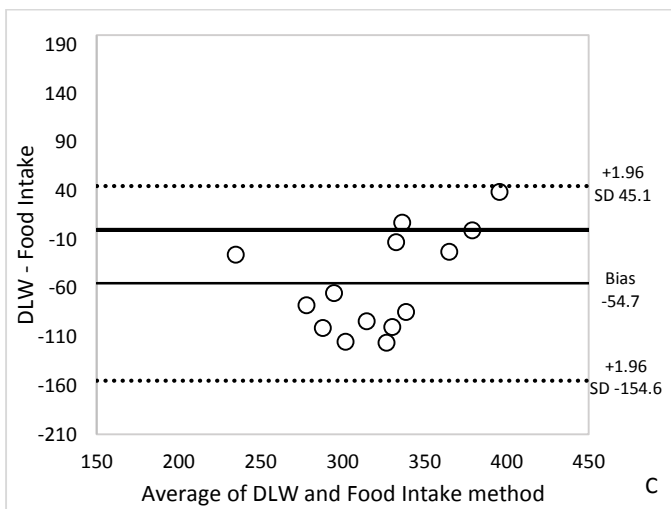
720



721



722



723 Figura 4. Comparação Bland e Altman do gasto energético diário ($\text{kcal/kg peso corporal}^{0.67}/\text{dia}$) de
 724 gatos pelo método da água duplamente marcada, comparando fluído sangue com fluídos alternativos
 725 saliva (A) ($n=14$) e urina (B) ($n=10$) e, método da água duplamente marcada medido no sangue
 726 comparado ao método de consumo de alimento (C) ($n=14$), seguidos de suas respectivas Correlações
 727 de Pearson, A1 ($R=0.86$; $p<0.0001$), B1 ($R=0.27$; $p=0.4411$), e C1 ($R=0.51$; $p=0.0604$). Valores
 728 conjuntos de machos e fêmeas, determinados pela média dos dias 7, 10 e 14 de decaimento dos
 729 isótopos com o método DLW e, para o método do consumo de alimento valores médios de GED em
 730 14 dias.

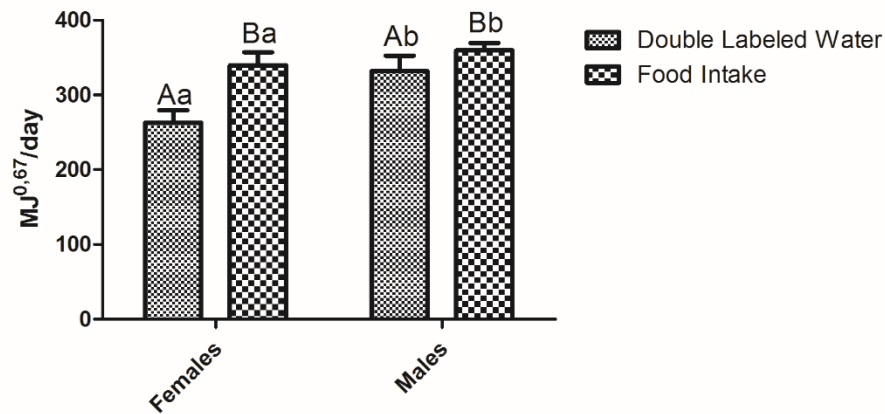


Figura 5. Comparação entre o GED de gatos machos e fêmeas, estimados pelo método de consumo de alimento e pelo método DLW com o fluido sangue, durante o experimento dois. ^{A,B} = diferenças entre métodos, dentro de um mesmo sexo ($P < 0.05$). ^{a,b} = diferenças entre sexos, dentro de um mesmo método ($P < 0.05$).

Discussão

No método da água duplamente marcada, os pontos de enriquecimento mensurados na literatura envolvem desde 1 até 8 horas de enriquecimento (CENTER et al, 2011; NGYUEN et al, 2004; KANCHUK et al., 2003), período onde se estabilizou a incorporação dos isótopos no contingente de água corporal dos animais deste estudo com ponto máximo de enriquecimento de 5 h e 20 minutos, corroborando com Speakman et al., (2001) que encontrou equilíbrio máximo de ²H e ¹⁸O no período de 5 e 6 horas em cães. Os dias de decaimento foram semelhantes, não interferindo nos cálculos de gasto energético e fluxo de água, como encontrado por outros autores (BERMINGHAM et al., 2013; SPEAKMAN et al., 2001). Mais de um dia de decaimento deve ser mensurado para minimizar possíveis variações ou erros de coleta e/ou análise, como contaminação da amostra e armazenamento inadequado, devido à criteriosidade do método da DLW (GUIDOTTI et al., 2013; FERRIOLLI et al., 2008).

Os valores analisados de ²H e ¹⁸O e os coeficientes angulares do decaimento dos isótopos na saliva foram semelhantes aos analisados no sangue em todos os momentos coletados, assim como verificado no estudo de Schoeller et al., (1981) a semelhança entre estes dois fluidos corporais em seres humanos. O menor valor de enriquecimento dos isótopos encontrado foi na urina. A diferença neste período de coleta da urina em comparação com o sangue já era esperado. O pool de urina remanescente na bexiga urinária dos gatos antes da aplicação dos isótopos mascara seu verdadeiro enriquecimento isotópico. A produção média de urina em gatos saudáveis gira em torno de 1 mL/h/kg

756 de massa corporal (GRAUER, 2005), portanto, para coleta do ponto de enriquecimento do isótopo na
757 urina neste método, a bexiga urinária deve estar completamente vazia antes da aplicação de ^2H e ^{18}O .
758 Estudo com gatos utilizaram a técnica de cistocentese para coleta de urina no ponto de enriquecimento
759 (NGUYEN et al., 2004). Para garantir o esvaziamento completo da bexiga urinária, esta técnica
760 poderia ter sido usada, porém torna o método menos prático, confrontando com o objetivo deste
761 estudo. A coleta de enriquecimento do ^2H analisado na urina apresentou valores 7,5% menor
762 comparado com o sangue, não enriquecendo totalmente este fluido com os isótopos. Neste estudo,
763 valores de urina enriquecida não obtiveram confiabilidade para os cálculos das variáveis. O contrário
764 pode ser visto com os tempos de decaimento que foram iguais para todos os fluidos analisados.
765 Schierbeeck et al., (2009) encontrou valores semelhantes de ^2H e ^{18}O em amostras de urina e saliva
766 de crianças com paralisia cerebral concluindo ser a amostra de saliva a mais indicada para o método
767 da DLW devido à sua coleta obter momento exato e pela produção imediata de saliva, ao contrário
768 da urina que permanece na bexiga urinária até atingir o estímulo para micção. Nguyen et al., (2004)
769 utilizou a princípio coletas de urina para análise de decaimento dos isótopos em gatos, permanecendo
770 estes animais período de 3 horas em gaiolas metabólicas. Quando a urina não era obtida neste período,
771 amostras de sangue eram coletadas para o método da DLW. Devido aos valores analisados dos
772 isótopos nos dias de decaimento serem semelhantes em todos os fluidos coletados, a possibilidade de
773 mesclar o uso destes fluidos no método do DLW é interessante. Como exemplo, pode-se coletar
774 sangue ou saliva nos tempos basal e enriquecimento e coletas de urina para o decaimento. A
775 semelhança existente entre as amostras de sangue e saliva neste estudo são válidas para todos os
776 pontos de coletas deste método.

777 A medida que o tempo decai no platô de enriquecimento, o ^2H se espalha por vias menos
778 acessíveis, incorporando-se além da água para aminoácidos, aumentando o valor de seu contingente
779 de água corporal (SPEAKMAN et al., 2001). O contingente de água corporal de ^{18}O é menos variável
780 e acompanha os processos metabólicos da água com maior precisão comparado com o ^2H
781 (SAGAYAMA et al, 2016). Portanto, um fator de correção (f) no cálculo de contingência da água
782 corporal de deutério deve ser realizada para a composição corporal. As médias da relação Nd/No para
783 gatos machos e fêmeas foram de 1.06 para o sangue e 1.08 para a saliva, apresentando valores
784 condizentes com o intervalo de 1.01 a 1.10 tanto em mamíferos como em humanos (SPEAKMAN,
785 1997). No entanto, a urina apresentou valor médio maior, 1.12. Este intervalo da relação Nd/No
786 segundo Speakman (1997), além de envolver estudos com seres humanos, difere em protocolos e
787 intervalos de amostragem, dose administrada, via de administração (endovenosa ou por via oral) e
788 tipo de amostra utilizada para o equilíbrio entre os contingentes de água corporal para ^2H e ^{18}O
789 (SPEAKMAN et al., 2001). Os valores encontrados da relação Nd/No no sangue e na saliva de gatos

790 machos e fêmeas parece representar com mais acurácia esta diferença entre os contingentes de água
791 corporal.

792 Os valores calculados de composição corporal, produção de CO₂, GED por MJ/kg peso
793 corporal^{0,67}/dia e por MJ/kg massa magra^{0,67}/dia e, fluxo de água não diferiram entre os fluidos.
794 Apesar do GED não apresentar diferença estatística entre os fluidos, a diferença existente entre o
795 fluido sangue e urina para o método DLW é evidentemente diferente no gráfico Bland e Altman. A
796 diferença entre as médias de sangue e urina variam entre +160.8 e -199 MJ/kg de massa
797 corporal^{0,67}/dia, variações importantes quando aplicadas para avaliação da necessidade energética de
798 gatos. Esta diferença pode ser explicada pela uso do valor analisado dos isótopos na amostra
799 enriquecida de urina, que apresentou valores não tão enriquecidos quando comparados com o sangue
800 e a saliva. A comparação entre os métodos de consumo alimentar e DLW apresentaram diferenças
801 consideráveis no valor do GED. Porém, o período avaliado do método do consumo de alimento, de
802 apenas 14 dias, foi muito curto para obter valores confiáveis de energia consumida diariamente pelos
803 animais, com margem para interpretações incorretas. Mensurar o GED pelo método do consumo de
804 alimento deve ser realizado por períodos mais longos. Porém, diferença de gasto energético médio
805 entre o método do consumo de alimento avaliado por 26 semanas e, do DLW, foi visto no estudo de
806 Nguyen et al., (2004) entre gatos castrados machos e fêmeas, cujo os machos apresentaram valores
807 40% maiores para o método do consumo e fêmeas 21%. Neste estudo também foi verificado valores
808 percentuais maiores para o método do consumo de 8% para machos e 23% para fêmeas.

809 O efeito de sexo verificado a partir do enriquecimento até o último dia de decaimento
810 mensurado nos isótopos, assim como a diferença dos coeficientes angulares do mesmo isótopo entre
811 os sexos pode ser explicado pelo uso de dose fixa da solução isotópica aplicada. Como as fêmeas do
812 estudo são mais leves que os machos, ao aplicar mesma dose para ambos os sexos, o enriquecimento
813 em fêmeas apresentou valor maior devido à sua menor área corpórea. A massa gorda e a massa magra
814 de ambos os sexos em porcentagem não apresentou diferença significativa. Em valores absolutos,
815 machos apresentaram 200 gramas a mais de gordura que fêmeas, não interferindo metabolicamente
816 na incorporação dos isótopos. A dose fixa administrada não interferiu no comportamento linear dos
817 isótopos nos machos, verificado pelo coeficiente angular das retas de decaimento (Figura 2), sendo
818 altamente correlacionado em todos os fluidos estudados entre machos e fêmeas. Tanto as fêmeas
819 como os machos deste estudo não apresentaram sobrepeso ou obesidade, considerando animais
820 magros com porcentagem de massa gorda de até 25% (TOLL et al., 2010). Apesar da porcentagem
821 de massa magra ser estatisticamente semelhante entre os sexos, o GED de fêmeas foi menor
822 comparado com machos, mesmo quando calculado por kg de MM^{0,67}. Em valores absolutos de massa
823 magra, machos apresentaram 640 gramas a mais que fêmeas. Outros estudos verificaram GED por

kg de massa muscular^{0,67} semelhantes entre os sexos (CENTER et al., 2011), porém a composição corporal foi realizada por método MF-BIA (Impedância bioelétrica de múltiplas frequências) que especifica o teor de massa muscular, diferentemente do método da composição corporal por deutério, correspondendo ao teor de massa magra composto por massa muscular+massa óssea. Esta diferença de métodos entre os dois resultados pode explicar o GED de machos ser maior do que de fêmeas mesmo quando comparado pela massa magra.

O fluxo de água reflete a água presente no alimento, água de bebida e a água metabólica (BALLEVRE et al., 1994). Entre os sexos não houveram diferenças no fluxo de água, diferentemente do gasto energético, cujo os machos apresentaram fluxo de água 25% menor. A composição da dieta interfere diretamente na ingestão hídrica de gatos. Dietas com alta proteína tendem a aumentar a ingestão hídrica independente da kcal consumida (WELLMAN, DIBARTOLA & KOHN, 2007). Ballevre et al., (1994) ao calcular o fluxo de água em gatos (2 machos e 1 fêmea), obtiveram valores 36% menores de fluxo de água comparados com o GED pelo método da DLW, cujo os gatos consumindo dieta com 29% de proteína bruta e 3,2 kcal/g de energia metabolizável.

Conclusão

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

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

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

Referências

- Ahlstrom O, Skrede A, Speakman JR et al. (2006) Energy Expenditure and Water Turnover in Hunting Dogs: A Pilot Study. American Society for Nutrition. J. Nutr. v. 136, p. 2063S–2065S.
- Backus R & Wara A. (2016). Development of Obesity: Mechanisms and Physiology. Veterinary Clinics: Small Animal Practice, v. 46, n. 5, p. 773-784.

- 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). CO₂ 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 ²H and ¹⁸O 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.