

APLICAÇÃO DO MÉTODO DA ÁGUA DUPLAMENTE MARCADA EM CÃES IDOSOS OU ADULTOS PELOS FLUIDOS SORO E URINA

LUIZ E.A.L. PEREIRA¹, LETÍCIA G. PACHECO², ARIEL DE CASTRO², ELOISE C. RAMOS², CLARA U. AUFIERI¹, DÉBORA A. EUGÊNIO², AULUS C. CARCIOFI², CAMILA GOLONI¹

¹FMVA/Unesp, Câmpus de Araçatuba, ²FCAV/Unesp, Câmpus de Jaboticabal
Contato: luiz.amador@unesp.br / Apresentador: LUIZ E.A.L. PEREIRA

Resumo: O método da água duplamente marcada (ADM) acompanha o declínio dos isótopos deutério (^2H) e oxigênio 18 (^{18}O) no *pool* de água corporal (AC), estimando-se composição corporal (CC), gasto energético diário (GED) e fluxo de água (FA). Comparou-se soro e urina para aplicação do método da ADM em cães adultos ou idosos. Após aplicação dos isótopos, coletou-se sangue por venopunção e urina por micção espontânea em cães adultos (n=10) ou idosos (n=8), analisados por espectrometria de massa. Foram avaliados o enriquecimento e decaimento dos isótopos na AC para estimativa de CC, GED e FA. Regressão linear foi aplicada para cinética dos isótopos nos fluidos e ANOVA em esquema fatorial 2×3 para efeitos de idade, tratamentos e interação ($P < 0,05$). Cinéticas de ^2H e ^{18}O foram lineares para fluidos e idades ($P < 0,01$), mas o enriquecimento tardio na urina (12h) comprometeu a incorporação dos isótopos neste fluido com estimativas de CC e GED distintas ao soro ($P > 0,05$). Ao estimar os resultados das variáveis com o enriquecimento dos isótopos no soro e demais pontos na urina, os valores foram semelhantes ao soro ($P > 0,05$). Cães idosos apresentaram sarcopenia e maior massa gorda comparado aos adultos ($P < 0,05$). Substituição do enriquecimento da urina por soro é uma alternativa para aplicação da ADM.

Palavras-Chaves: massa magra; energia; deutério; oxigênio 18; micção

APPLICATION OF THE DOUBLY LABELED WATER METHOD IN SENIOR OR ADULT DOGS USING SERUM AND URINE SAMPLES

Abstract: The doubly labeled water (DLW) method tracks the decline of deuterium (^2H) and oxygen-18 (^{18}O) isotopes in the body water pool (BWp), estimating body composition (BC), daily energy expenditure (DEE), and water flux (WF). Serum and urine were compared for application of the DLW method in adult or elderly dogs. After application of the isotopes, blood was collected by venipuncture and urine by spontaneous urination in adult (n=10) or elderly (n=8) dogs, analyzed by mass spectrometry. The enrichment and decay of isotopes in the BWp were evaluated to estimate BC, DEE, and WF. Linear regression was applied for isotope kinetics in fluids and ANOVA in a 2×3 factorial scheme for the effects of age, treatments, and interaction ($P < 0.05$). The kinetics of ^2H and ^{18}O were linear for fluids and ages ($P < 0.01$), but late enrichment in urine (12h) compromised the incorporation of isotopes in this fluid with BC and DEE estimates different from serum ($P > 0.05$). When estimating the results of the variables with isotope enrichment in serum and other points in urine, the values were similar to serum ($P > 0.05$). Older dogs had sarcopenia and greater fat mass compared to adults ($P < 0.05$). Replacing urine enrichment with serum is an alternative for DLW application.

Keywords: lean body mass; energy; deuterium; oxygen-18; urination

Introdução: O envelhecimento é um processo progressivo e irreversível, marcado pela diminuição do metabolismo e de massa magra (MM), definido como sarcopenia (Saker, 2021). Métodos práticos aplicáveis a campo para reconhecer esses processos apresentam maior adesão pelos responsáveis de cães em estudos fisiológicos e nutricionais. O método da ADM é considerado padrão-ouro para a avaliação da taxa metabólica e composição corporal em animais (Speakman e Król, 2005). Consiste em acompanhar o declínio dos isótopos de ^2H e ^{18}O no *pool* de AC. Dessa forma, estima-se MM e massa gorda (MG). O ^{18}O perdido em dióxido de carbono (CO_2) e água e o ^2H perdido apenas em água, refletem a produção de CO_2 pelo organismo, sendo possível estimar o GED. Ainda, ao se calcular a meia vida de ^2H , o FA pode ser determinado (Park *et al.*, 2014). Os fluidos soro e urina foram comparados para a cinética dos isótopos e para as variáveis estimadas do método da ADM em cães adultos ou idosos.

Material e Métodos: O estudo seguiu delineamento inteiramente casualizado, com duração de 30 dias, em cães adultos (n=10; $3,5 \pm 1,0$ anos; $11,4 \pm 1,8$ kg) ou idosos (n=8; $13,3 \pm 2,2$ anos; $12,8 \pm 1,3$ kg; CEUA 9537/18) após a aplicação subcutânea dos isótopos em jejum hídrico e alimentar dos cães ($0,12\text{g } ^2\text{H}$ a $99,9 \text{ atm\%}$ e $2\text{g } ^{18}\text{O}$ a $99,9 \text{ atm\%}$ por kg de AC; Sercon Limited, UK). Foram colhidas amostras de sangue por venopunção nos tempos basal, 2h, 2, 4 e 15 dias após a aplicação, e amostras de urina foram coletadas por micção espontânea em gaiola metabólica nos tempos basal, entre 3 e 24 horas e, 2 e 4 dias após a aplicação. As concentrações de isótopos foram analisadas por espectrometria de massa por determinação da razão isotópica (Ferriolli *et al.*, 2008), definindo-se a cinética dos isótopos na AC (Schoeller *et al.*, 1996). Foram estimados MM, MG, GED e FA (Ferriolli *et al.*, 2008; Goloni *et al.*, 2020). Aplicou-se regressão linear para determinação da cinética dos isótopos nos fluidos. Os efeitos de idade e fluido foram submetidos a análise de variância em esquema fatorial 2 idades (adultos e idosos) e 3 tratamentos – soro, urina e, um terceiro tratamento com o enriquecimento dos isótopos pelo soro e, isótopos nos tempos basal e decaimento pela urina. Foram considerados os efeitos de idade, tratamento e interação idade $\times$ tratamento, totalizando 6 grupos experimentais. Quando significância foram obtidas no teste F, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ($P < 0,05$ significativo).

Resultado e Discussão: As cinéticas de ^2H e ^{18}O foram lineares para os fluidos e idades ($P < 0,01$; Figura 1), mas o tempo de enriquecimento para a urina foi tardio (12 ± 5 h; soro: $2,4 \pm 0,2$ h), o que comprometeu o comportamento dos isótopos no fluido para adultos (^2H , $R^2 = 0,22$; $P = 0,01$; ^{18}O , $R^2 = 0,33$; $P < 0,01$; n=8) e idosos (^2H , $R^2 = 0,56$; $P < 0,01$; ^{18}O , $R^2 = 0,74$;

P<0,01; n=9; Figura 1). Para acurácia do método da ADM, até 6 horas de enriquecimento dos isótopos no fluido é indicado (Speakman e Król, 2005). Com isso, o tempo de coleta para a incorporação dos isótopos na urina ultrapassou o enriquecimento máximo no pool de AC de ^2H (250 ± 30 ppm) comparado ao soro (278 ± 12 ppm; P<0,01), assim como para ^{18}O (P<0,01), promovendo resultados de MM e GED superestimadas e, subestimando-se a MG quando comparado ao soro (P<0,05; Tabela 1). No entanto, a análise dos isótopos nos pontos de decaimento na urina foi semelhante ao do soro (P>0,05) e, quando aplicados a ADM com soro para enriquecimento e demais tempos para a urina, os resultados foram semelhantes ao do soro (P>0,05; Tabela 1), assim como descrito para gatos (Goloni *et al.*, 2020). Cães idosos apresentaram menor MM ($78 \pm 1,2\%$) e maior MG ($21,2 \pm 1,2\%$) comparado aos cães adultos (MM: $88 \pm 1,2\%$; MG: $12 \pm 1,2\%$; P<0,05), mas com mesmo GED (P=0,23; Tabela 1). O uso de diuréticos pelos animais idosos (n=5) como terapia de doença valvar mixomatosa pode ter interferido nas estimativas de FA, com valor superior comparado ao de cães adultos (Idosos: $114 \pm 6,5$; Adultos $91 \pm 5,9$ mL/kg^{0,75}/dia; P=0,02).

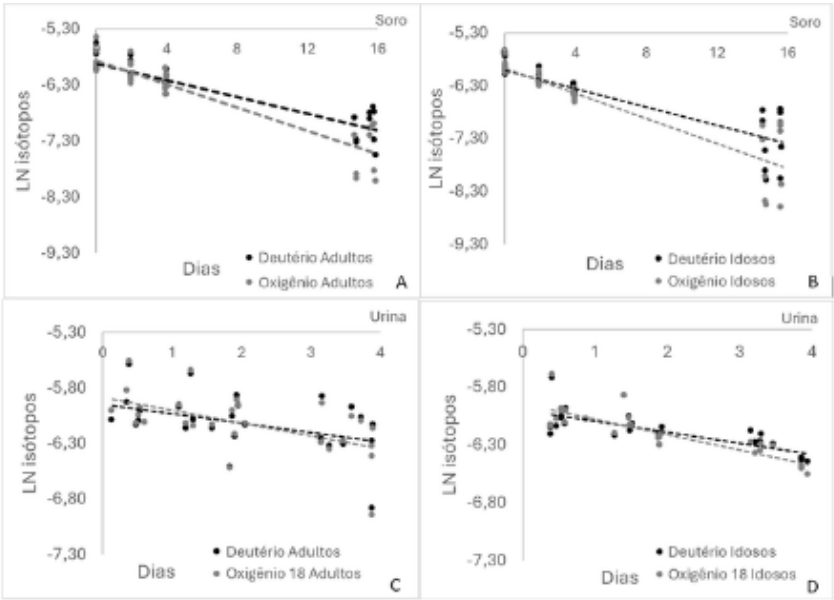


Figura 1. Cinética de deutério (^2H) e oxigênio 18 (^{18}O) no soro e na urina de cães adultos e idosos. LN: logaritmo natural. A, ^2H : $y = -0,0746x - 5,914$; $R^2 = 0,84$; P<0,01; ^{18}O : $y = -0,1042x - 5,8656$; $R^2 = 0,84$; P<0,01 (n=9); B, ^2H : $y = -0,0868x - 6,0112$; $R^2 = 0,76$; P<0,01; ^{18}O : $y = -0,1185x - 5,9708$; $R^2 = 0,80$; P<0,01 (n=10); C, ^2H : $y = -0,0947x - 5,9461$; $R^2 = 0,22$; P=0,01; ^{18}O : $y = -0,1243x - 5,886$; $R^2 = 0,33$; P<0,01 (n=8); D, ^2H : $y = -0,0952x - 5,9994$; $R^2 = 0,56$; P<0,01; ^{18}O : $y = -0,1333x - 5,9431$; $R^2 = 0,74$; P<0,01 (n=9).

Tabela 1. Massa magra, massa gorda, gasto energético diário e fluxo de água de cães adultos ou idosos calculados com ^2H ou ^{18}O para os fluidos soro, urina e, soro e urina.

Item	Soro	Urina	Soro e Urina	Média	1 EPM	2 P valor	
						Idade	Tratamento
<i>MM (%)</i>							
Adulto	86,05	93,50	85,32	87,92	1,20		
Idoso	77,59	83,25	77,21	78,75	1,26		
Média	81,82 ^a	89,11 ^b	81,26 ^a		1,07	<0,001	0,002
<i>MG (%)</i>							
Adulto	13,95	6,50	14,68	12,08	1,20		
Idoso	22,42	16,75	22,79	21,25	1,26		
Média	18,18 ^a	10,89 ^b	18,74 ^a		1,07	<0,001	0,001
<i>Gasto energético (kcal/kg^{0,75}/d)</i>							
Adulto	101,38	142,16	73,82	108,69	11,55		
Idoso	109,62	135,49	96,86	113,79	8,41		
Média	105,50 ^a	139,05 ^b	86,22 ^a		7,07	0,237	0,024
<i>Fluxo de água (ml/kg^{0,75}/d)</i>							
Adulto	88,54	76,44	109,60	91,18	5,90		
Idoso	110,15	111,06	121,10	114,30	6,51		
Média	101,25	91,82	116,68		4,80	0,021	0,174

¹ EPM = Erro Padrão da Média.

² P valor = Não verificado interação entre idade × tratamento (P>0,05).

Conclusão: Cães idosos apresentaram sarcopenia e FA maior do que em adultos. O momento em horas da coleta de urina por micção espontânea ultrapassou o tempo de incorporação máxima dos isótopos na água corporal. Ao substituir apenas este ponto pelas análises no soro e demais mantidos pela urina, estimativas de condição corporal, GED e FA foram acuradas, tornando o método mais aplicável em estudos a campo.

Agradecimentos: Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada” FCAV/Unesp, Departamento de Produção e Saúde Animal, FMVA/Unesp.

Referências Bibliográficas: FERRIOLI, E.; PFRIMER, K.; MIRANDA-DA-CRUZ, B. Uso de isótopos estáveis leves em ciências Nutricionais. In: DUTRA DE OLIVEIRA, J.E; MARCHINI, J. S. (Org). Ciências Nutricionais. 2 ed. São Paulo- SP: Sarvier (Almed), 2008, v.1, p. 443-465.GOLONI, C., PERES, F. M., SENHORELLO, I. L., DI SANTO, L. G., MENDONÇA, F. S., LOUREIRO, B. A., CARCIOFI, A. C. Validation of saliva and urine use and sampling time on the doubly labelled water method to measure energy expenditure, body composition and water turnover in male and female cats.

British Journal of Nutrition, 124(4), 457-469, 2020. PARK, J.; KAZUKO, I. T.; KIM, E.; KIM, J.; YOON, J. Estimating free-living human energy expenditure: Practical aspects of the doubly labeled water method and its applications. Nutrition Research and Practice. 2014. 8(3) p. 241-248. SCHOELLER, D. A. Hydrometry. Human Body Compos 2, 35-49, 1996. SPEAKMAN, J. R; ELZBIETA KRÓL. Comparison of Different Approaches for the Calculation of Energy Expenditure Using Doubly Labeled Water in a Small Mammal. Physiological and Biochemical Zoology, Vol. 78, No. 4), pp. 650-667. 2005.