

MENSURAÇÃO DO OXIGÊNIO-18 NO AR EXPIRADO PARA DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CORPORAL, GASTO ENERGÉTICO E TURNOVER HÍDRICO DE CÃES

LUCAS B. SCARPIM, LETICIA G. PACHECO¹, CAMILA GOLONI¹, JHENNIFER DE C. FENERICK¹, ANA PAULA GARCIA¹, VLADIMIR E. COSTA², AULUS C. CARCIOFI¹

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal, ²Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista - UNESP de Botucatu

Contato: lucas.scarpim@unesp.br / Apresentador: LUCAS B. SCARPIM

Resumo: Com o objetivo de propor método menos invasivo e simples para obtenção da composição corporal (CC), gasto energético (GE) e turnover hídrico (TH), foi avaliado o uso de ar expirado (AE) para mensuração do oxigênio-18 (¹⁸O), sem o uso concomitante de deutério (²H), em alternativa ao método da água duplamente marcada (ADM). Foram utilizados seis cães da raça Beagle por um período de 13 dias (d). Após jejum alimentar de 12 horas (h) e hídrico de 4h, amostras de AE e sangue basal foram coletadas. Posteriormente, os cães receberam por via subcutânea 0,12g de ²H e 2g de ¹⁸O/kg de água corporal. Para avaliação do enriquecimento, amostras de sangue e AE foram tomadas nos tempos 2, 3, 4 e 5h após aplicação da ADM. Para avaliação da taxa de eliminação, aos 3, 5, 7, 9, 11 e 13d, amostras de sangue e AE foram coletadas. Para estudo do equilíbrio isotópico, devido ao fracionamento de ¹⁸O foi empregado fator de correção 1,04 sobre a concentração do isótopo. Não houve (P>0,05) nos valores de enriquecimento de ¹⁸O, bem como nos resultados de CC, GE e TH dos cães estimados pela ADM (plasma) ou pelo AE utilizando ¹⁸O. O uso do AE demonstrou ser seguro e menos invasivo, com ampla aplicação em animais saudáveis, além de facilitar estudos em pacientes hospitalizados e domiciliados.

PalavrasChaves: Água duplamente marcada; equilíbrio; eliminação.

QUANTIFICATION OF OXYGEN-18 ON EXPIRED AIR TO DETERMINE THE BODY COMPOSITION, ENERGY EXPENDITURE, AND WATER TURNOVER IN DOGS

Abstract: With the aim of proposing a less invasive and simple method for obtaining body composition (CC), energy expenditure (GE), and water turnover (TH), the use of expired air (EA) for measuring oxygen-18 (¹⁸O) was evaluated without the concomitant use of deuterium (²H) as an alternative to the doubly labeled water method (DLW). Six Beagle dogs were used for a period of 13 days (d). After 12-hour (h) fast and 4-h hydration, basal EA and blood samples were collected. Subsequently, the dogs received subcutaneously 0.12g of ²H and 2g of ¹⁸O/kg of body water. For enrichment evaluation, blood and AE samples were taken at 2, 3, 4, and 5 h after DLW application. For elimination rate evaluation, blood and EA samples were collected at 3, 5, 7, 9, 11, and 13 days. For isotopic equilibrium study, a correction factor of 1.04 was applied to the isotope concentration due to ¹⁸O fractionation. There was no difference (P>0.05) in the ¹⁸O enrichment values, as well as in the CC, GE, and TH results of dogs estimated by DLW (plasma) or EA using ¹⁸O. The use of EA showed to be safe and less invasive, with wide application in healthy animals, as well as facilitating studies in hospitalized and domiciled patients.

Keywords: Doubly labeled water method; equilibrium; elimination rate.

Introdução: O método da ADM é referência para estudos metabólicos em seres humanos e animais (Speakman, 1998), seu emprego comumente inclui avaliações no soro ou plasma. A incorporação dos isótopos de ²H e ¹⁸O na água corporal permite a estimativa da CC, a diferença nas taxas de eliminação dos dois isótopos permite se estimar o GE, e a taxa de eliminação de ²H se conhecer o TH. Enquanto o ²H é perdido apenas na forma de água, o ¹⁸O é eliminado tanto pela água quanto pelo dióxido de carbono (CO₂) (Schoeller et al., 1986). Considerando-se a importância do desenvolvimento de métodos mais simples e menos invasivos, o objetivo deste estudo foi validar o uso do AE para obtenção do enriquecimento de ¹⁸O e adaptar as equações existentes para estimativa da CC, GE e TH de cães (Podlesak et al., 2007; Coward, 1988), de forma menos invasiva e sem a utilização de ²H.

Material e Métodos: Foram utilizados 6 cães adultos (5,8±2,0 anos; 14,8±1,1kg). Os cães foram submetidos a jejum alimentar de 12 h e hídrico de 4 h e em seguida pesados. Amostras basais de sangue foram coletadas da veia jugular e de AE com uso de máscara (Pacheco et al., 2024). Os cães receberam por via subcutânea 0,12g de ²H e 2g de ¹⁸O/kg de água corporal. Para avaliação do enriquecimento, amostras de sangue (com uso de cateter) e de AE foram tomadas nos tempos 2, 3, 4 e 5h após administração da ADM. Para estudo da taxa de eliminação, amostras de sangue e AE foram tomadas após 3, 5, 7, 9, 11 e 13 dias. As amostras de AE foram armazenadas em vials de 12 mL para análise de razão isotópica de ¹⁸O (ABCA2, SerCon, UK). A cada coleta 3 mL de sangue eram retirados e depositados em tubos vacutainer com anticoagulante, sendo o plasma recolhido e armazenado a -20°C para posterior análise de razão isotópica de ²H e ¹⁸O (EA Isolink - Delta V, Thermo Fisher Scientific, USA). Na ADM, a CC foi calculada segundo Schoeller, et al. (1996), a produção de CO₂ e o GE seguiram as equações de Ballevre et al. (1994) e o TH o proposto por Hendriks et al. (1999). Para o AE, as equações foram adaptadas para que os dados de ²H fossem estimados a partir das concentrações de ¹⁸O, utilizando-se a constante de fracionamento proposta de 1,04 e de decaimento entre ²H e ¹⁸O de 0,75, já que o fracionamento de saída entre água e CO₂ são constantes (Coward, 1988). Os resultados obtidos foram comparados por Bland-Itman e ANOVA (P<0,05).

Resultado e Discussão: Durante o equilíbrio isotópico foi observado menor concentração (4±0,5%) de ¹⁸O em AE em relação ao plasma (P<0,05), enquanto nos momentos basal e de decaimento estas foram semelhantes (0,8±0,2%; P>0,05). Os resultados obtidos assemelham-se ao verificado para seres humanos, sendo possível aplicar fator de correção de 1,04 definido por Wong et al. (1988). Esta variação parece estar relacionada ao fracionamento do equilíbrio isotópico nas moléculas de

CO₂ e água nos pulmões, à temperatura corporal (Bryant e Froelich, 1995). Quando comparado os resultados de ¹⁸O em plasma e AE após correção, estes foram semelhantes (P>0,05) com elevada correlação na comparação de Bland-Altman (P<0,05; r² 0,99), demonstrando ser eficaz a determinação da concentração de ¹⁸O no ar expirado (Figura 1). O equilíbrio isotópico não se estabeleceu às 2h, permanecendo estável nos momentos 3, 4 e 5 h que podem ser adotados nos estudos. Quando estimada a CC, GE, TH com o ¹⁸O no AE ou pela ADM (Tabela 1) não foram encontradas diferenças para as variáveis avaliadas (P>0,05). A adaptação das equações para calcular as variáveis a partir do fracionamento de ¹⁸O mostrou-se viável, não impactando nos resultados obtidos e tornando desnecessário o uso do ²H para a obtenção dos dados de CC, GE e TH. Desta maneira, o uso do AE mostrou-se ferramenta inovadora, segura, acurada, menos invasiva e laboriosa que a coleta de sangue para determinação dos parâmetros pela ADM, tornando o método mais aplicável em estudos nutricionais tanto para animais saudáveis quanto aqueles em ambiente hospitalar ou domiciliar.

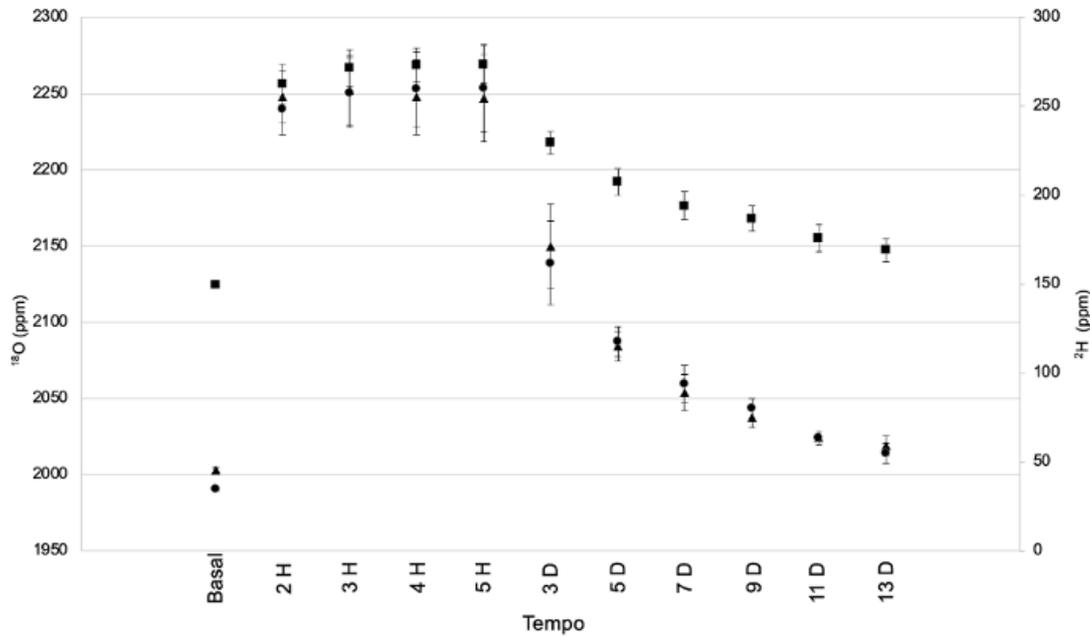


Figura 1. Curva de enriquecimento e decaimento dos isótopos de ²H (■) e ¹⁸O em plasma (•) e ¹⁸O em ar expirado (▲) de cães após correção no período de equilíbrio isotópico (n=6).

Tabela 1. Composição corporal, gasto energético e turnover hídrico de cães estimados pela água duplamente marcada (ADM) ou pelo ar expirado (AE) com uso de ¹⁸O.

Animal	Água Corporal (%)		Massa gorda (%)		Massa magra (%)		Gasto energético (kcal/kg ^{0,75} /dia)		Turnover hídrico (mL/kg ^{0,75} /dia)	
	ADM ¹	AE ²	ADM	AE	ADM	AE	ADM	AE	ADM	AE
1	58,26	59,67	20,41	18,49	79,59	80,51	125,18	122,01	105,56	114,99
2	49,43	50,90	32,47	30,46	67,93	69,54	133,06	137,97	168,32	164,77
3	48,45	49,73	33,81	32,06	66,19	67,94	139,83	141,54	146,44	150,94
4	52,84	55,29	27,11	25,46	72,19	75,54	150,22	148,02	149,30	159,70
5	45,06	45,25	38,45	36,82	61,55	63,18	131,07	137,20	183,12	176,20
6	51,37	52,50	29,82	28,27	70,18	71,73	118,89	114,98	124,51	134,91
Média por método	50,90	52,23	30,34	28,59	69,61	71,41	133,04	133,62	146,21	152,58
Média geral	51,56		29,47		70,51		133,33		149,40	
EPM ³	0,76		0,58		0,59		0,31		0,14	
P-valor ⁴	0,58		0,75		0,55		0,92		0,62	

¹Água duplamente marcada. ²Ar expirado. ³ Erro padrão da média. ⁴ P-valor da análise de variância

Conclusão: Foi necessária a aplicação do fator de correção de 1,04 para obtenção de valor preciso de ¹⁸O no AE durante o enriquecimento. A adoção da constante de fracionamento isotópico de 1,04 e razão de decaimento de 0,75 entre ²H e ¹⁸O permitiu emprego acurado das equações e a obtenção de estimativas precisas da CC, GE e TH de cães a partir da concentração de ¹⁸O no AE.

Agradecimentos: À BRF Petfood, BRF Ingredients, ADIMAX Pet e ADM Pet Food pelo suporte ao Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos e a Manzoni Industrial Ltda pela doação da extrusora.

Referências Bibliográficas: Bryant, J. D., & Froelich, P. N. (1995). A model of oxygen isotope fractionation in body water of large mammals. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 59(21), 4523-4537. Coward, W. A. (1988). The doubly-labelled-water (2H218O) method: principles and practice. *Proceedings of the Nutrition Society*, 47(3), 209-218. Schoeller, D. A et al. (1986). Doubly labeled water method: in vivo oxygen and hydrogen isotope fractionation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 251(6), R1137-R1143. Speakman, J. R (1988). The history and theory of the doubly labeled water technique. *Am. J. of Clin. Nutr.*, v. 68, n. 4, p. 932S-938S. Speakman, J. R., & Król, E. (2005).

Comparison of different approaches for the calculation of energy expenditure using doubly labeled water in a small mammal. *Physiological and Biochemical Zoology*, 78(4), 650-667. Podlesak, D. W., Torregrossa, A. M., Ehleringer, J. R., Dearing, M. D., Passey, B. H., & Cerling, T. E. (2008). Turnover of oxygen and hydrogen isotopes in the body water, CO₂, hair, and enamel of a small mammal. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(1), 19-35. Wong, W et al. (1988). In vivo isotope-fractionation factors and the measurement of deuterium-and oxygen-18-dilution spaces from plasma, urine, saliva, respiratory water vapor, and carbon dioxide. *The American journal of clinical nutrition*, 47(1), 1-6