

DETERMINAÇÃO DE PROTOCOLO MINIMAMENTE INVASIVO PARA AVALIAÇÃO DE NECESSIDADE PROTEICA EM CAES – ESTUDO PILOTO

LUCAS B. SCARPIM¹, LETICIA G. PACHECO¹, CAMILA GOLONI¹, VLADIMIR E. COSTA², AULUS C. CARCIOFI¹

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

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

Resumo: O método indireto de oxidação de aminoácidos (IAAO) usando ¹³C-Fenilalanina (¹³C-Phe) é minimamente invasivo, seguro, acurado e pode ser empregado na determinação da necessidade mínima de proteína (NMP). O objetivo deste trabalho foi estudar protocolo prático que não necessite de restrição do animal para avaliação da NMP, que possa vir a ser aplicado para cães de laboratório, domiciliados, ou que apresentem comorbidades. Três protocolos e cinco níveis proteicos (6%, 8%, 10%, 12% e 14%) foram usados. Estes diferiram entre período de coleta, início do enriquecimento, quantidade de doses de ¹³C-Phe e número de alimentações. Todos os cães atingiram em todos os teores proteicos o platô de enriquecimento de ¹³CO₂. No entanto, o tempo para alcançar o platô e a acurácia variou entre os protocolos: P1 - 183,7 min ($r^2 = 0,39$); P2 - 170,6 min ($r^2 = 0,81$); P3 - 105,4 min ($r^2 = 0,67$) ($P < 0,05$). Dentre os protocolos avaliados, o P2 foi o mais acurado em estimar o enriquecimento de ¹³CO₂ e a NMP ($r^2 = 0,96$), este incluiu 7 alimentações e 5 doses de ¹³C-Phe, com coletas se iniciando 90 minutos após a o início do enriquecimento isotópico. Em relação à determinação da NMP, valores mínimos de proteína bruta (PB) próximos à 10% e intervalo de confiança (> 95%) de 12% de PB foram observados para cães.

PalavrasChaves: IAAO; isótopos estáveis; ¹³C-Fenilalanina.

DETERMINATION OF A MINIMALLY INVASIVE PROTOCOL TO ASSESS PROTEIN REQUIREMENT IN DOGS – PILOT STUDY

Abstract: The indirect amino acid oxidation method (IAAO) using ¹³C-Phenylalanine (¹³C-Phe) is minimally invasive, safe, and accurate and can be used to determine the minimum protein requirement (MPR). The objective of this study was to evaluate a practical protocol that does not require restriction of the animal to evaluate MPR, which could be applied to laboratory dogs, domiciled animals, or those with comorbidities. Three protocols and five crude protein levels (6%, 8%, 10%, 12% and 14%) were used. These differed between collection periods, start of enrichment, number of ¹³C-Phe doses and number of feedings. All dogs reached the ¹³CO₂ enrichment plateau at all protein levels. However, the time to reach the plateau and accuracy varied between protocols: P1 - 183.7 min ($r^2 = 0.39$); P2 - 170.6 min ($r^2 = 0.81$); P3 - 105.4 min ($r^2 = 0.67$) ($P < 0.05$). Among the protocols evaluated, P2 was the most accurate in estimating the enrichment of ¹³CO₂ and MPR ($r^2 = 0.96$), it included 7 feedings and 5 doses of ¹³C-Phe, with collections starting 90 minutes after the isotopic enrichment. Regarding MPR determination, minimum crude protein (CP) values close to 10% and a confidence interval (> 95%) of 12% CP were observed for dogs.

Keywords: IAAO; stable isotopes; ¹³C- Phenylalanine.

Introdução: A determinação NMP dos animais é historicamente desafiadora. O uso de isótopos estáveis para sua determinação tem sido extensivamente estudado em humanos (Coutney-Martin et al., 2016; Matsumoto et al., 2023), embora pouco investigado em cães. O IAAO usando ¹³C-Phe como traçador é uma abordagem minimamente invasiva, segura, rápida e precisa que permite a avaliação da necessidade proteica (Elango et al., 2012). Seu uso em cães através do ar expirado é inovador e apresenta potencial significativo para estudo das recomendações de inclusão de proteínas na dieta de animais saudáveis ou apresentando comorbidades. Diante disso, este trabalho teve por objetivo determinar protocolo minimamente invasivo para condução do IAAO, sem o uso de gaiolas metabólicas ou câmaras respirométricas, que possa ser empregado em cães de laboratório ou domiciliados, utilizando dietas extrusadas contendo diferentes teores proteicos.

Material e Métodos: Foi adotado delineamento em blocos casualizados, com dois blocos e um cão por nível proteico em cada bloco, totalizando 2 cães em cada teor de proteína. Teores proteicos de 6%, 8%, 10%, 12% e 14% foram obtidos pelo método da diluição, empregando-se dietas extrusadas contendo 28,5% e 5,8% de PB. Fenilalanina e tirosina foram suplementadas na dieta 5,8% de PB para que ambas apresentassem teores iguais destes aminoácidos. Foram utilizados cinco cães (14,8 ± 1,1 kg; 5,8 ± 2,0 anos). Após 2 dias de adaptação utilizando dieta contendo 11% de PB, estes foram testados segundo protocolo adaptado de Bross, et al. (1998). A alimentação dos cães foi dividida em 10, 7 ou 5 porções iguais (protocolos P1, P2 e P3) e fornecidas a cada 30 min. Uma dose enriquecimento inicial (EI) de 0,18 mg/kg de ¹³C-Bicarbonato e 0,66 mg/kg de ¹³C-Phe (Cambridge Stable Isotope, EUA) foi oferecida na quarta, sexta ou quinta alimentação, seguida por 6, 4 ou 4 doses de 1,33 mg/kg de ¹³C-Phe, a cada 30 min (P1, P2 e P3), fornecidas em cápsulas. Amostras do ar expirado foram coletadas a cada 30 min por meio de máscara (Pacheco et al., 2024) e analisadas para razão isotópica (ABCA2, SerCon, UK). Foram coletadas duas amostras antes do EI e oito após, iniciando-se 30, 90 ou 90 min após o EI (P1, P2 e P3). O volume de CO₂ foi obtido pelo método do ¹³C-Bicarbonato (Larsson et al., 2012). A oxidação pós-prandial aminoacídica foi obtida (Shoveller et al., 2017) e os resultados de oxidação e EI aplicados a um modelo broken-line linear-platô. Os dados de EI foram submetidos a ANOVA e comparados por Tukey ($P < 0,05$).

Resultado e Discussão: Os cães ingeriram durante o teste 1,8; 2,5; 3,1; 3,7 e 4,3 g PB/kg^{0,75}. As ingestões totais de fenilalanina (0,36±0,01 g/kg^{0,75}) e tirosina (0,31±0,01 g/kg^{0,75}) não diferiram ($P > 0,05$), atendendo a necessidade dos cães,

requisito do método IAAO (Elango et al., 2012). Todos os cães alcançaram o platô de enriquecimento de $^{13}\text{CO}_2$ em cada nível proteico, porém o tempo para o alcançar e a acurácia diferiu entre os protocolos: P1 - 183,7 min ($r^2=0,39$); P2 - 170,6 min ($r^2=0,81$); P3 - 105,4 min ($r^2 = 0,67$), sendo o P3 o mais rápido ($P<0,05$) em alcançar o platô (Figura 1). O P2 foi o mais eficiente em estimar tanto o EI e como a NMP ($r^2=0,96$). Essa diferença pode estar relacionada a quantidade de fenilalanina ingerida antes do EI e o tempo de digestão e absorção dos animais. No P1, o EI foi iniciado após a ingestão de $0,15\pm 0,01$ g/kg $0,75$ de fenilalanina, desta maneira esta pode ter sido inicialmente utilizada como nutriente, resultando em protocolo pouco eficiente. No P2 e P3 as coletas iniciaram-se 90 min após EI e o número de alimentações foi reduzido, resultando em ingestão de fenilalanina antes do EI de $0,32\pm 0,01$ g/kg $0,75$ no P2 e $0,37\pm 0,01$ g/kg $0,75$ no P3, obtendo-se protocolos mais eficientes ($r^2=0,81$; P2) e ($r^2 = 0,67$; P3). Em relação a NMP, embora esta não possa ser estabelecida devido ao pequeno número de cães por nível proteico, valores próximos a $10\pm 0,2\%$ de PB e intervalo de confiança superior a 95% de $12\pm 0,1\%$ de PB foram observados, próximos aos propostos pelo NRC (2006), que por sua vez foram obtidos majoritariamente através de dietas baseadas em aminoácidos cristalinos.

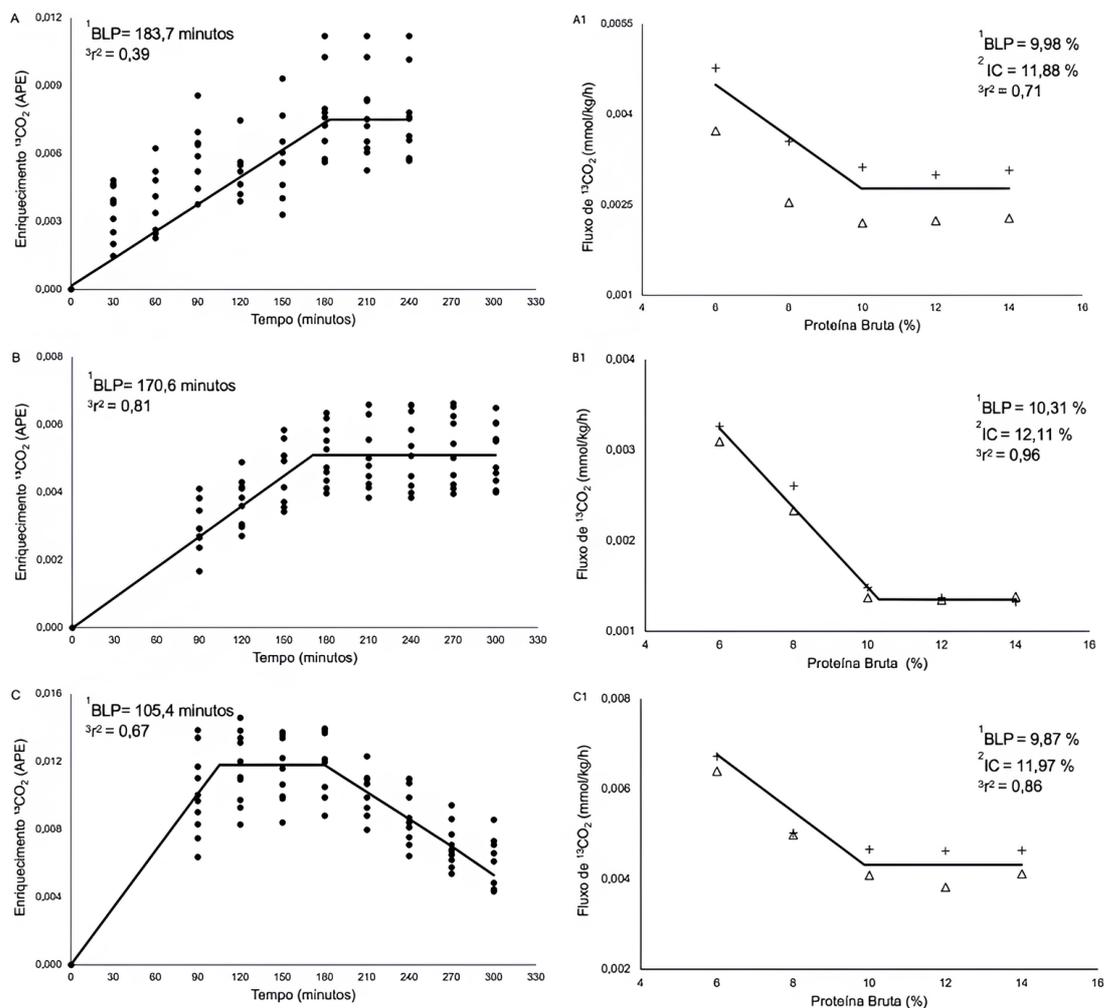


Figura 1. Valores de enriquecimento em átomos por cento em excesso (APE) e necessidade mínima de proteína em cães (%). A, B e C referente ao enriquecimento nos protocolos P1, P2 e P3. A1, B1 e C1 referente à NMP nos protocolos P1, P2 e P3. 1 BLP =Ponto de quebra que representa a ingestão mínima para oxidação estável. 2 IC=representa a ingestão recomendada. $^3r^2$ = representa o coeficiente de determinação do método.

Conclusão: Os delineamentos propostos atenderam aos critérios para uso do IAAO e podem ser aplicados sem necessidade de restrição dos animais em câmaras respirométricas. O P2 mostrou-se o mais preciso na estimativa do enriquecimento de $^{13}\text{CO}_2$ e da NMP, devido aos valores de r^2 mais elevados. Valores de NMP próximos a 10% foram observados com intervalo de confiança próximo a 12% de PB na dieta de cães.

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: Bross, R. et al. (1998). "Development of a minimally invasive protocol for the determination of phenylalanine and lysine kinetics in humans during the fed state." *The Journal of nutrition* 128(11): 1913-1919. Courtney-Martin, G et al. (2016). "Protein requirements during aging." *Nutrients* 8(8): 492. Elango, R et al. (2012). "Recent advances in determining protein and amino acid requirements in humans." *British Journal of Nutrition* 108(S2): S22-S30. Larsson, C et al.

(2014). The oral ^{13}C -bicarbonate technique for estimation of energy expenditure in dogs: validation against indirect calorimetry. *Archives of animal nutrition*, 68(1), 42-54.

Matsumoto, M et al. (2023). "Evaluation of protein requirements using the indicator amino acid oxidation method: a scoping review." *The Journal of Nutrition*.

NRC, (2006). *Nutrient requirements of dogs and cats*, National Academies Press.

Pacheco, L. G et al. (2024). Comparison of the precursor, amino acid oxidation, and end-product methods for the evaluation of protein turnover in senior dogs. *Plos One*, Accepted to Publication.

Shoveller, A. K et al. (2017). Calibration and validation of a carbon oxidation system and determination of the bicarbonate retention factor and the dietary phenylalanine requirement, in the presence of excess tyrosine, of adult, female, mixed-breed dogs. *J. Anim. Sci.* 95:2917-2927.