

RAQUEL SILVEIRA PEDREIRA

**Abundância de proteínas no soro, composição corporal e perfil
aminoacídico plasmático de cães adultos em manutenção
alimentados com duas dietas formuladas com diferentes teores de
proteína**

Pirassununga

2024

RAQUEL SILVEIRA PEDREIRA

Abundância de proteínas no soro, composição corporal e perfil aminoacídico plasmático de cães adultos em manutenção alimentados com duas dietas formuladas com diferentes teores de proteína

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Nutrição e Produção Animal

Área de concentração:

Nutrição e Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Júlio César de Carvalho Balieiro

De acordo: _____

Orientador

São Paulo
2024

Obs: A versão original encontra-se disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Catálogo na Publicação

Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo
Ficha catalográfica gerada automaticamente com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

silveira pedreira, raquel
Abundância de proteínas no soro, composição corporal e perfil
aminoacídico plasmático de cães adultos em manutenção alimentados
com duas dietas formuladas com diferentes teores de proteína /
raquel silveira pedreira ; orientador prof. dr. júlio César de
carvalho salieiro - versão corrigida.-- Pirassununga, 2024.
79 f. : il.

tese (doutorado - programa de pós-graduação em nutrição e produção
animal - departamento de nutrição e produção animal) - Faculdade de
Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2024.

1. aminoácidos. 2. canino. 3. composição corporal. 4. proteômica.
5. recomendação de proteína. I. título.

Bibliotecária responsável pela estrutura de catalogação
na publicação: Maria Aparecida Laet - CRB 5673-B.



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Abundância de proteínas no soro, composição corporal e perfil aminoacídico plasmático de cães adultos em manutenção alimentados com duas dietas formuladas com diferentes teores de proteína", protocolada sob o CEUA nº 6772200922 (0009671), sob a responsabilidade de **Júlio Cesar de Carvalho Balleiro** e equipe; Raquel Silveira Pedreira - 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 - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 07/12/2022.

We certify that the proposal "Serum protein abundance, body composition and plasma amino acid profile of maintenance adult dogs fed two diets formulated with different protein contents", utilizing 8 Dogs (males and females), protocol number CEUA 6772200922 (0009671), under the responsibility of **Júlio Cesar de Carvalho Balleiro** and team; Raquel Silveira Pedreira - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 12/07/2022.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 11/2022 a 03/2023 Área: Nutrição E Produção Animal

Origem: Animais de proprietários

Espécie: Cães

sexo: Machos e Fêmeas

Idade: 2 a 6 anos

Quantidade: 8

Linhagem: Sem raça definida

Peso: 11 a 24 kg

São Paulo, 07 de dezembro de 2022

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

Profa. Dra. Camilla Mota Mendes

Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo



Aprovação Tácita

Eu Paula Takeara, coordenadora da CEUA/Grandfood, considerando a Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e as demais Resoluções Normativas do CONCEA, priorizando o bem-estar dos animais utilizados em pesquisas, DECLARO:

1. Ter encaminhado em 18 de fevereiro de 2022, aos membros da CEUA/Grandfood, o projeto de pesquisa intitulado “**Projeto proteína**” – 162/22, de responsabilidade das pesquisadas **Raquel Silveira Pedreira**.
2. O presente projeto de pesquisa enquadra-se em uma ou ambas as categorias abaixo:
 - a) Apresenta **apenas** metodologias experimentais já aprovadas pela CEUA/Grandfood e descritas no documento “**Roteiro de Metodologia de Testes**”, anexo ao Regimento da CEUA/Grandfood, e/ou;
 - b) Tem **Grau de Invasividade Mínima** igual a **GI1**, de acordo com o **Formulário Unificado para Solicitação de Autorização para uso de animais em experimentação e/ou ensino**, apresentado à CEUA/Grandfood no momento da submissão.
3. Não houve nenhuma manifestação do colegiado, nas 48 horas subsequentes, ao envio, quanto à realização do projeto na Premier Pet.
4. Considera-se, o presente projeto, como **aprovado** nos termos do Regimento da CEUA/Grandfood.

Dourado, 20 de fevereiro de 2022.

Paula Takeara

Assinatura
Paula Takeara
Coordenadora CEUA / Grandfood

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: PEDREIRA, Raquel Silveira

Título: Abundância de proteínas no soro, composição corporal e perfil aminoacídico plasmático de cães adultos em manutenção alimentados com duas dietas formuladas com diferentes teores de proteína

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Produção Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho ao querido amigo e orientador
Prof. Dr. Marcio Antonio Brunetto (*in memoriam*).

RESUMO

PEDREIRA, R.S. Abundância de proteínas no soro, composição corporal e perfil aminoacídico plasmático de cães adultos em manutenção alimentados com duas dietas formuladas com diferentes teores de proteína [Serum proteins abundance, body composition and plasma amino acid profile of maintenance adult dogs fed diets formulated with different protein content]. 2024. Tese (Doutorado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2024.

O crescimento populacional humano e de animais de companhia aumenta a demanda por alimentos, o que impacta o meio ambiente de forma distinta a depender do alimento utilizado. A procura por ingredientes proteicos é crescente e a cadeia de produção de proteínas é uma das que mais impacta de forma negativa o ecossistema, de forma que excessos devem ser evitados. A proteína, mais especificamente os aminoácidos essenciais e o nitrogênio devem estar presentes na dieta do cão. Porém, o teor ideal para manutenção da saúde e qualidade de vida do cão adulto saudável ainda não está bem estabelecido. O advento das ciências “ômicas” como a proteômica abre muitas possibilidades para estudos de nutrição, sendo mais uma possível ferramenta para avaliação do impacto dos alimentos na saúde. Com isso o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito de dietas formuladas com diferentes teores de proteína bruta sobre a abundância de proteínas no soro e perfil de aminoácido plasmático e urinário, e composição corporal de cães adultos em manutenção. Foram utilizados nove cães castrados, adultos saudáveis, fêmeas e machos, sem raças definida, do canil da empresa Grandfood Ind Com LTDA, localizada na cidade de Dourado-SP. Dois alimentos formulados com os mesmos ingredientes, porém com diferentes teores de proteína bruta, um com 23% (P 23) e outro com 30% (P 30) foram avaliados após o consumo por 56 dias. Os cães permaneceram em sua rotina habitual, foram coletadas amostras de sangue para análise do proteoma no soro, perfil de aminoácidos (jejum), composição corporal e amostra de urina para análise de aminoácidos. Para as análises estatísticas adotou-se um modelo linear misto que contemplou o efeito fixo de tratamentos (P 23 e P 30), além dos efeitos aleatórios de período e animal. Os animais foram incluídos nas análises visando acomodar a estrutura de medidas repetidas nas mesmas unidades experimentais ao longo dos períodos experimentais. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do procedimento PROC MIXED. Os alimentos foram adequadamente consumidos pelos cães, o peso corporal e escore de condição corporal não variou ao longo do estudo,

assim como, a porcentagem de massa magra e de massa gorda, para nenhuma das dietas avaliadas ($P > 0.05$). Foi verificada maior ingestão de gPB/kgPC ($P = 0,0079$), e por gPB/PC^{0,75} ($P = 0,0136$) após o consumo da P 30, bem como, maior ingestão (g/kgPC/dia) dos AA ($P < 0,05$), exceto na ingestão do triptofano ($P > 0,05$), que foi igual entre as dietas. Foram detectados 30 aminoácidos no plasma e na urina, mas não foi encontrada diferença significativa na concentração de nenhum destes ($P > 0,05$) após consumo das duas dietas. As análises proteômica e de bioinformática resultaram em 559 proteínas nas 18 amostras, após depleção das proteínas mais abundantes. A análise de variância apontou vinte proteínas diferentemente abundantes entre os tratamentos P 23 e P 30, destas, 9 são codificadas pelo mesmo gene. Com os dados deste estudo, conclui-se que através das análises de composição corporal, perfil de aminoácidos plasmático e urinário e de proteoma no soro de cães adultos saudáveis é possível reduzir a proteína bruta do alimento do cão de 30% para 23% na matéria natural.

Palavras-chave: Aminoácidos. Canino. Composição corporal. Proteômica. Recomendação de proteína.

ABSTRACT

PEDREIRA, R.S. **Serum proteins abundance, body composition and plasma amino acid profile of maintenance adult dogs fed diets formulated with different protein content.** [Abundância de proteínas no soro, composição corporal e perfil aminoacídico plasmático de cães adultos em manutenção alimentados com duas dietas formuladas com diferentes teores de proteína]. Tese (Doutorado em Nutrição e Produção Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, 2024.

Human and companion animal population growth increases the demand for food, which impacts the environment differently depending on the food used. The demand for protein ingredients is growing and the protein production chain is one of those that most negatively impacts the ecosystem, so excesses must be avoided. Protein, more specifically essential amino acids, and nitrogen must be present in the dog's diet. However, the ideal content for maintaining the health and quality of life of a healthy adult dog is not yet well established. The advent of "omic" sciences such as proteomics opens many possibilities for nutrition studies, providing another possible tool for evaluating the impact of food on health. Therefore, the objective of the present study was to evaluate the effect of diets formulated with different levels of crude protein on the abundance of proteins in serum and plasma and urinary amino acid profiles, and body composition of adult dogs under maintenance. Nine castrated dogs, healthy adults, females, and males, without defined breeds, from the kennel of the company Grandfood Ind Com LTDA, located in the city of Dourado-SP, were used. Two foods formulated with the same ingredients, but with different levels of crude protein, one with 23% (P 23) and the other with 30% (P 30) were evaluated after consumption for 56 days. The dogs remained in their usual routine, blood samples were collected for serum proteome analysis, amino acid profile (fasting), body composition and urine sample for amino acid analysis. For statistical analysis, a mixed linear model was adopted that included the fixed effect of treatments (P 23 and P 30), in addition to the random effects of period and animal. Animals were included in the analyzes to accommodate the structure of repeated measurements in the same experimental units throughout the experimental periods. All analyzes were performed using the PROC MIXED procedure. The foods were adequately consumed by the dogs, body weight and body condition score did not vary throughout the study, as did the percentage of lean mass and fat mass, for any of the diets evaluated ($P>0.05$). A higher intake of

gPB/kgBW ($P=0.0079$), and gPB/BW^{0.75} ($P=0.0136$) was observed after consumption of P 30, as well as a higher intake (g/kgBW/day) of AA ($P<0.05$), except for tryptophan intake ($P>0.05$), which was the same between the diets. 30 amino acids were detected in plasma and urine, but no significant difference was found in the concentration of any of these ($P>0.05$) after consumption of the two diets. Proteomic and bioinformatics analyzes resulted in 559 proteins in the 18 samples, after depletion of the most abundant proteins. The analysis of variance showed twenty proteins that were differently abundant between the P 23 and P 30 treatments, of which 9 were encoded by the same gene. With the data from this study, it is concluded that through analyzes of body composition, plasma and urinary amino acid profile and proteome in the serum of healthy adult dogs, it is possible to reduce the crude protein in dog food from 30% to 23% in matter. Natural.

Keywords: Amino acids. Canine. Body composition. Proteomics. Protein requirement

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1. REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1. CRESCIMENTO DA POPULAÇÃO E DEMANDA POR ALIMENTO	17
1.1.1. Impacto dos animais de companhia	19
1.2. PROTEÍNA	20
1.2.1. Proteínas e nutrição de cães em manutenção	21
1.2.2. Requerimento proteico, de aminoácidos e composição corporal	22
1.3. CIÊNCIAS ÔMICAS	27
1.3.1. Proteômica	28
1.3.2. Proteômica e nutrição humana	29
1.3.3. Proteômica em animais	31
2. HIPÓTESE	36
3. OBJETIVOS	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS	38
4.2. DIETAS EXPERIMENTAIS	38
4.2.1. Digestibilidade das dietas experimentais	41
4.3. MANEJO ALIMENTAR	41
4.4. COLHEITA DE MATERIAL	42
4.4.1. Colheita de sangue	42
4.4.2. Colheita de urina	42
4.5. ANÁLISES PROTEÔMICAS	42
4.6. DETERMINAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS	44
4.7. COMPOSIÇÃO CORPORAL	45
5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	45
6. RESULTADOS	46

6.1. DIGESTIBILIDADE DAS DIETAS, CONSUMO, PESO CORPORAL, ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E COMPOSIÇÃO CORPORAL DOS CÃES	46
6.2. PERFIL DE AMINOÁCIDOS PLASMATICOS E URINÁRIO	49
6.3. ANÁLISE PROTEÔMICA	51
7. DISCUSSÃO	55
7.1. ANIMAIS E CONSUMO, PESO CORPORAL, ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E COMPOSIÇÃO CORPORAL, DIGESTIBILIDADE DAS DIETAS	56
7.2. PERFIL DE AMINOÁCIDOS PLASMATICOS E URINÁRIO	57
7.3. ANÁLISE PROTEÔMICA	60
8. CONCLUSÃO	69
9. REFERÊNCIAS	70

1. INTRODUÇÃO

O atual sistema alimentar mundial é falho e gera grandes problemas para a saúde da população e para o meio ambiente. A produção de alimentos tem apresentado um crescimento acentuado nas últimas cinco décadas devido a sua tecnificação, permitindo uma redução dramática no número de indivíduos que passam fome, mas ainda assim, uma em cada sete pessoas no mundo, não tem acesso a proteína e energia suficientes em sua dieta e sofrem de alguma forma de desnutrição por micronutrientes (GODFRAY *et al.*, 2010; TAMBURINO *et al.*, 2020).

Ao mesmo tempo, existem 2 bilhões de pessoas obesas ou com sobrepeso no mundo, situação que pode ser agravada com as perspectivas do crescimento populacional. As estimativas apontam que, até a metade do século, a população mundial atingirá algo em torno de 9 bilhões de pessoas (GODFRAY *et al.*, 2010; TAMBURINO *et al.*, 2020).

Outro ponto importante é o impacto que todos esses fatores têm no meio ambiente. A crescente demanda por alimento aumenta o consumo de recursos naturais, como água e terras agricultáveis além do aumento na produção de gases do efeito estufa e outros poluentes (TIAN *et al.*, 2021). Atualmente, não há nenhum país no mundo que atenda às necessidades mínimas para o bem-estar dos indivíduos e ao mesmo tempo respeite os recursos naturais e o meio ambiente como um todo (O'NEILL *et al.*, 2018).

O crescimento populacional não é homogêneo e, segundo dados estatísticos, ocorrerá principalmente em países em desenvolvimento. Com o aumento da riqueza e, com maior poder aquisitivo, ocorre uma maior demanda e consumo por alimentos proteicos como carnes e laticínio, todos os quais aumentam a pressão no sistema de abastecimento de alimentos e também na natureza (ALEXANDRATOS & BRUINSMA., 2012; PARISI *et al.*, 2020).

O crescimento da população de animais de companhia também leva a um aumento na demanda por alimentos e a um impacto negativo no meio ambiente. No geral as matérias-primas utilizadas na produção dos alimentos para cães e gatos utilizam subprodutos da alimentação humana, mas também competem com ingredientes de consumo humano e de animais de produção. Dentre os nutrientes

necessários para a saúde e bem-estar dos cães e gatos a proteína pode ser considerada a mais cara, tanto em termos econômicos, quanto em termos ecológicos.

Atualmente existem teores recomendados de proteína e aminoácidos (AA) para cães em manutenção nos guias nutricionais, mas tais recomendações são frequentemente extrapoladas associando-se maior aporte a mais saúde e longevidade. Mais estudos são necessários levando-se em consideração um teor proteico adequado para saúde dos animais, sem comprometer os sistemas ecológicos (SWANSON *et al.*, 2013; ACUFF *et al.*, 2021)

A proteômica pode auxiliar os estudos de nutrição, permitindo entender causa e efeito em sistemas vivos, descobrir e desenvolver biomarcadores que podem auxiliar no tratamento de doenças e avaliar a segurança e funcionalidade de novos alimentos e ingredientes (KEUSCH, 2006). A interação dos componentes da dieta com as proteínas do organismo, ocorre de duas maneiras diferentes, tanto, influenciando a expressão ou modificação pós-tradução das proteínas, como causando pequenas interações molécula-proteína e mudanças na estrutura tridimensional da proteína (GANESH & HETTIARACHCHY, 2012).

As chamadas ciências “ômicas” surgiram após a descoberta do material genético e do desenvolvimento de ferramentas de sequenciamento do genoma completo de uma espécie. Entretanto, já haviam pistas que o conhecimento puro e simples das sequências lineares dos nucleotídeos não explicariam as variações fenotípicas observadas, devido às diversas reações que ocorrem entre o material genético e o resultado final, que são as proteínas e os metabólitos (PANDEY *et al.*, 2000; SOUZA *et al.*, 2014).

A proteômica é a ciência que estuda o conjunto de proteínas de um organismo em um determinado tempo e sob uma determinada condição. Estimativas sugerem que existam mais de um milhão de diferentes tipos de proteínas nas células, nos tecidos e nos fluidos corporais, tornando sua análise bastante complexa (BARBOSA *et al.*, 2012).

Embora a aplicação de proteômica em medicina veterinária não seja tão significativa quando em estudo da medicina humana, é possível encontrar na literatura informações principalmente nas áreas de animais de produção, mas também de animais de companhia (CECILIANI *et al.*, 2014). São inúmeras as possibilidades de aplicação da técnica e pode trazer importantes informações para a melhor

compreensão do funcionamento do organismo com um todo (TIAN *et al.*, 2019; LUCENA *et al.*, 2020).

Se considerarmos que a crescente demanda da população, tanto humana quanto de animais de companhia, leva a um aumento na demanda por alimentos e gera impactos negativos no meio ambiente, estratégias para redução do consumo de nutrientes, sem prejudicar a saúde e bem-estar, tornam-se obrigatórias. A proteína é um nutriente essencial para a vida e deve estar presente no alimento, mas seu teor de inclusão permanece sendo uma questão importante da nutrição de cães. O surgimento das ciências “ômicas”, especificamente da proteômica pode possibilitar uma nova abordagem dos efeitos dos nutrientes sobre o organismo do animal.

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1. CRESCIMENTO DA POPULAÇÃO E DEMANDA POR ALIMENTO

Segundo relatório da Organização da Nações Unidas (ONU) divulgado em 2019 a população mundial deve passar de 7,7 bilhões de indivíduos para 9,7 bilhões em 2050 (ONU, 2019). Um crescimento de 2 bilhões de pessoas nos próximos 30 anos, levando a uma demanda de alimento 70% maior que o atual sistema de produção pode gerar, de acordo com estimativas da Agência de Alimentação e Agricultura da ONU (FAO) (DJISALOV *et al.*, 2021).

Se alimentar é uma necessidade básica de qualquer ser humano e atender essa necessidade é fundamental para alcançar um mínimo de qualidade de vida para todos. “Fome zero e Agricultura Sustentável” é um dos itens do “Objetivos de Desenvolvimento Sustentável” da ONU, considerado um apelo global para acabar com a pobreza, proteger o meio ambiente e o clima, garantindo que as pessoas em todo o mundo possam ter paz e prosperidade (TAMBURINO *et al.*, 2020).

A revolução verde foi responsável por triplicar a produção de cereais, reduzir a fome e a pobreza, trazendo benefícios à saúde e expectativa de vida em escala global (GODFRAY *et al.*, 2010). Mas hoje a produção de alimentos enfrenta um desafio ainda maior, pois, além de aumentar a quantidade produzida, deve-se reduzir os impactos ambientais. Para o meio ambiente, a produção de alimentos é o principal fator da perda de biodiversidade, consumo de água e uso de terras (BERNERS-LEE *et al.*, 2018; TAMBURINO *et al.*, 2020).

O crescimento da população mundial não é homogêneo, as taxas de crescimento variam consideravelmente entre uma região e outra. Apenas nove países vão responder por mais da metade do crescimento estimado, sendo: Índia, Nigéria, Paquistão, República Democrática do Congo, Etiópia, Tanzânia, Indonésia Egito e Estados Unidos (ONU, 2019). Podemos observar que a maioria são países em desenvolvimento. De acordo com Godfray (2010) dois fatores influenciam o aumento da demanda por alimento, o incremento do tamanho da população e o aumento no consumo *per capita* de alimento.

Os países em desenvolvimento apresentaram o maior crescimento no consumo *per capita* de alimento. Entre os anos de 1969-2007, o consumo de alimento expresso

em quilocalorias *per capita* por dia no mundo foi de 2.372 para 2.772, um crescimento de 16,8% e nos países em desenvolvimento foi de 2.055 para 2.619 um crescimento de 27,4%, sendo que nos países desenvolvidos o crescimento foi de 7,1% (ALEXANDRATOS & BRUINSMA, 2012). Foi visto não só uma variação no consumo de calorias como também nas fontes, em países em desenvolvimento houve um aumento no consumo de calorias provenientes de carne (154,5%), açúcares (26,7%), leite (79,3%) e óleos e vegetais (106,1%). Já nos países desenvolvidos o aumento no consumo de calorias se concentrou nos grupos alimentares de óleos e vegetais (72,7%) e de carnes (27%). O consumo de calorias advindas de tubérculos, leguminosas e raízes foi menor em todos os grupos analisados. Esses números condizem com o fato de que à medida que a renda global se eleva, normalmente as dietas vão daquelas construídas principalmente de grãos, para as que contém uma proporção maior de carne, laticínio e ovos (CASSIDY *et al.*, 2013).

A partir de taxas de crescimento demográfico e da urbanização, projeções da FAO para 2030, apontam um crescimento na demanda por carnes e laticínios de 48% e 57% respectivamente, em países em desenvolvimento (ALEXANDRATOS & BRUINSMA, 2012; PARISI *et al.*, 2020). Dados na literatura apontam que a participação da proteína de origem animal na dieta da população aumenta conforme a renda do país cresce, enquanto a média mundial de proteína animal é de 80g/ *per capita*/dia países pertencentes à União Europeia, por exemplo, o consumo é de 104 g/ *per capita*/dia (SANS & COMBRIS, 2015).

Essas mudança nos hábitos alimentares aumentam a necessidade por áreas cultiváveis e recursos hídricos, atualmente a produção de carne ocupa 70% das regiões agrícolas mundiais (TIAN *et al.*, 2021).

Para atender à crescente demanda por alimento e garantir a segurança alimentar, podemos agir em duas frentes diferentes. Uma leva em consideração a demanda por alimentos, neste caso é possível adequar a estrutura alimentar da população em relação à quantidade de alimento e perfil da dieta. E outra que trabalha com a produção de alimento, se baseando no uso de tecnologias para otimização da produção (PARISI *et al.*, 2020). Uma abordagem que leve em consideração tanto a produtividade quanto redução da demanda global de alimentos, pode ser mais prudente e eficaz (TAMBURINO *et al.*, 2020).

1.1.1. Impacto dos animais de companhia

Assim como a população humana o número de cães e gatos no mundo está crescendo e seu impacto no consumo de alimento e produção de resíduos também deve ser considerado. Segundo a Federação Europeia das Indústrias de Pet Food (FEDIAF, 2021) atualmente a população de cães na Europa é de 90 milhões de cães e 110 milhões de gatos. No Brasil, segundo dados oficiais do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) em 2018, havia 54,2 milhões de cães e 23,9 milhões de gatos. Já nos Estados Unidos, estima-se que dois terços das famílias possuam pelo menos 1 animal em quase 85 milhões de lares. Todos esses cães e gatos precisam ser alimentados, seja com alimento industrializados ou com comida caseira, e tanto essa demanda como os resíduos gerados por eles causam um impacto negativo no meio ambiente (CINQUEPALMI *et al.*, 2013; MARTENS *et al.*, 2019)

O sistema de produção de alimentos para cães e gatos é bastante singular. Está estreitamente interligado com a produção de proteína de origem animal e com a cadeia alimentar humana. A produção de carne e a produção de *pet food* competem com alguns ingredientes da alimentação humana, mas ao mesmo tempo é um importante consumidor de vários subprodutos. Na maioria dos casos são produtos gerados pelo sistema alimentar humano e devem ser levados em consideração na análise do impacto ambiental (SWANSON *et al.*, 2013; ACUFF *et al.*, 2021).

Atualmente a grande maioria das rações para cães e gatos encontradas no mercado, é a base de grãos e proteína de origem animal e vegetal, com isso podemos dizer, que a formulação da dieta de animais de companhia tem um papel importante no impacto ambiental e sustentabilidade do sistema alimentar como um todo (MARTENS *et al.*, 2019).

Dentre os nutrientes necessários para a saúde e bem-estar dos cães e gatos, a proteína pode ser considerada a mais cara, tanto em termos econômicos, quanto em termos ecológicos. Quando comparamos a quantidade de PB presente na maioria dos alimentos encontrados no mercado com os requerimentos indicados pelos principais guias de alimentação vemos uma grande diferença, sendo a oferta muito maior do que a recomendação. Uma possível explicação para isso é o hábito cultural dos proprietários de acharem que por serem animais da ordem carnívora os cães e

gatos precisam de um elevado teor de proteína na dieta. Embora muito importante para aporte de aminoácidos essenciais (AAE), nitrogênio e manutenção da massa magra é possível que os cães e gatos adultos saudáveis não precisem da quantidade de PB geralmente vista nos produtos do mercado *pet food* (SWANSON *et al.*, 2013; ACUFF *et al.*, 2021).

1.2. PROTEÍNA

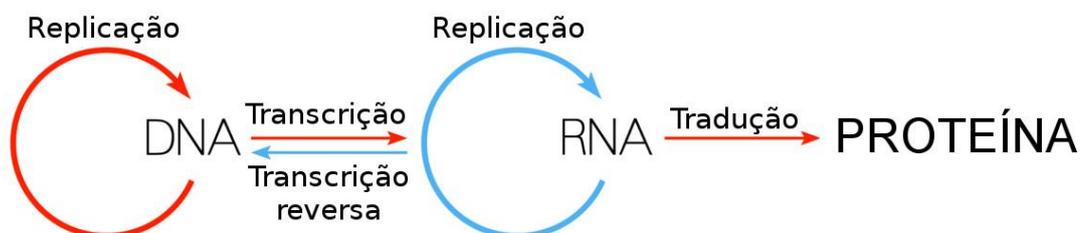
A palavra proteína deriva do grego “proteios” e significa “a que está à frente” ou “a mais importante” (GALDOS-RIVEROS *et al.*, 2010). Realmente as proteínas são indispensáveis para todos os seres vivos do planeta, controlam quase todos os processos que ocorrem em uma célula, tendo assim uma vasta diversidade de funções. As informações genéticas dos organismos são expressas através das proteínas (NELSON & COX, 2018).

Proteínas são polímeros de AA unidos por uma ligação covalente, podem formar estruturas pequenas de dois ou três AA chamados de di e tripeptídeos ou até mesmo cadeias longas denominadas polipeptídios. Embora existam muitos AA na natureza apenas 22 são encontrados nas proteínas. Eles têm um grupo carboxila e um grupo amino ligados ao mesmo átomo de carbono. A diferença entre um AA e outro está em sua cadeia lateral também chamada de grupo R, que variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, influenciando a solubilidade dos AA em água. As proteínas podem formar substâncias com atividades biológicas muito distintas, desde enzimas, anticorpos, hormônios, fibras musculares, penas até veneno de cogumelos e chifres de rinocerontes (NELSON & COX, 2018).

Os polipeptídios são criados pela ligação de vários AA em uma sequência específica e é essa sequência que confere a função das proteínas, através dos arranjos dos polipeptídios na estrutura da molécula de proteína e determinação da localização do sítio reativo na superfície. As moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) contêm especificações para milhares de proteínas, sendo o fluxo de informação genética nas células de DNA para ácido ribonucleico (RNA) e deste para proteína. Quando a célula precisa de uma determinada proteína, uma sequência de nucleotídeos de uma região específica da molécula de DNA é copiada para RNA, através de um processo denominado transcrição. Essa “cópia”, ainda no núcleo,

passa por um processamento, em eucariotos, conhecido como *Splicing* e, então, essas “cópias processadas” de RNA são lançadas no citoplasma e utilizadas como moldes para a síntese da proteína, em um processo denominado tradução. A Figura 1 apresenta o dogma central da biologia molecular, segundo Alberts *et al.*, (2010).

Figura 1. Esquema do dogma central da biologia molecular.



Fonte: <https://www.infoescola.com/biologia/dogma-central-da-biologia-molecular/>

1.2.1. Proteínas e nutrição de cães em manutenção

A ingestão restrita ou excessiva de proteína tem sido um assunto controverso na nutrição animal por muitos anos, tanto para animais em manutenção quanto para aqueles que estão com alguma alteração fisiológica e/ou metabólica (LAFLAMME, 2008; EPHRAIM *et al.*, 2020).

A proteína do alimento é necessária por dois motivos. O primeiro é para fornecer os aminoácidos essenciais (AAE), que são aqueles que o organismo não consegue sintetizar sozinho, em quantidades suficientes para atender a sua demanda, e que são usados para a síntese de muitas proteínas necessárias para o bom funcionamento do organismo. O segundo é para fornecer os aminoácidos não essenciais (AANE) que são aqueles que podem ser sintetizados pelo organismo de forma endógena desde que tenha quantidade adequadas de carbono e nitrogênio. Além de fornecer carbono e nitrogênio para síntese de qualquer AANE necessário pelo organismo, eles também fornecem carbono para a gliconeogênese e nitrogênio para formação de outros compostos que são essenciais para a vida como purinas, pirimidinas, hormônios e neurotransmissores (NRC, 2006).

Nos cães a digestão da proteína começa no estômago tendo como resultado longas cadeias de polipeptídeos, que seguem para o intestino delgado onde são quebradas em AA livres e posteriormente absorvidos pela parede do intestino. Os AA

e proteínas que não são absorvidos no intestino delgado seguem para o intestino grosso onde podem ser fermentados e levar a produção de mal odores (GROSS *et al.*, 2010).

Após a absorção os AA podem ser utilizados pelos organismos das seguintes maneiras: síntese de proteína tecidual, principalmente musculo e fígado, síntese de enzimas, albuminas, hormônios e outros compostos nitrogenados e uso do carbono para geração de energia. O organismo é capaz de formar novas proteínas desde que tenha todos os AA e eles estejam em quantidade adequada. Não só a quantidade, mas também a proporção entre os AA deve estar correta. O desbalanço pode ocorrer quando um AA necessário para a síntese proteica não está na quantidade necessária e ao menos um outro AA está em excesso. Já o antagonismo de AA ocorre quando o excesso de um AA aumenta o requerimento de outro AA com estrutura química semelhantes, como a lisina e arginina. O uso de fontes de proteínas complementares evita que essas duas situações ocorram na dieta (GROSS *et al.*, 2010).

Todas as proteínas do organismo são constantemente quebradas e resintetizadas, um processo chamado de *turnover* proteico. Durante esse processo uma fração dos AA é excretado de forma definitiva, e por isso devem ser repostos por meio da alimentação. Assim, podemos dizer que os cães não têm necessidade de proteína propriamente dita, mas sim de AA, tanto para suprir os AAÉ quanto para reposição de nitrogênio (GROSS *et al.*, 2010).

1.2.2. Requerimento proteico, de aminoácidos e composição corporal

O teor de PB recomendado para cães adultos saudáveis em manutenção por alguns guias nutricionais podem ser vistos na tabela 01 a seguir.

Tabela 01. Recomendações de proteína bruta e aminoácidos essenciais de cães adultos expressos na em % com base na matéria seca (MS) e em g kg de PC^{0,75} e g/1000kcal.

Nutriente	na MS ^a (%)			gKg de PC ^{0,75b}		g/1000kcal EM ^c		
	AAFCO	FEDIAF ^b	NRC	FEDIAF	NRC	AAFCO	FEDIAF ^b	NRC
Proteína bruta	18,00	18-21,00	10,00	4,95	3,28	45,00	45-52,10	25,0
Arginina	0,51	0,52-0,60	0,35	0,14	0,11	1,28	1,30-1,51	0,88
Histidina	0,19	0,23-0,27	0,19	0,06	0,062	0,48	0,58-0,67	0,48
Isoleucina	0,38	0,46-0,53	0,38	0,13	0,12	0,95	1,15-1,33	0,95
Leucina	0,68	0,82-0,95	0,68	0,23	0,22	1,70	2,05-2,37	1,70
Lisina	0,63	0,42-0,46	0,35	0,12	0,11	1,58	1,05-1,22	0,88
Metionina	0,33	0,40-0,46	0,33	0,11	0,11	0,83	1,00-1,16	0,83
Metionina + Cistina	0,65	0,76-0,88	0,65	0,21	0,21	1,63	1,91-2,21	1,63
Fenilalanina	0,45	0,54-0,63	0,45	0,15	0,15	1,13	1,35-1,56	1,13
Fenilalanina+ Tirosina	0,74	0,89-1,03	0,74	0,24	0,24	1,85	2,23-2,58	1,85
Treonina	0,48	0,52-0,60	0,43	0,14	0,14	1,20	1,30-1,51	1,08
Triptofano	0,16	0,17-0,20	0,14	0,05	0,046	0,50	0,43-0,49	0,35
Valina	0,68	0,59-0,68	0,49	0,16	0,16	1,70	1,48-1,71	1,23

^a Considerando uma dieta de 4.000 kcal/EM.

^b Gramas do nutriente por quilo de peso metabólico (PC^{0,75})

^c O FEDIAF coloca valores para cães com necessidade energética diária de 110kca/kg^{0,75} e 95kcal/Kg^{0,75}

O método de balanço de nitrogênio tem sido utilizado para determinar o requerimento de AA e proteína em diversas espécies. Entretanto, essa técnica é limitada, baseia-se na determinação da menor quantidade de proteína de boa qualidade que consegue manter o indivíduo em um balanço de nitrogênio positivo, após estar adaptado a um baixo consumo de proteína, não leva em consideração o efeito na composição da massa muscular e outros parâmetros de saúde. Os animais podem manter um balanço de nitrogênio positivo mesmo em um estado de depleção proteica. Fazem isso através da redução do *turnover* proteico e pelo uso de reservas da massa magra. Quando o consumo inadequado de proteína leva a redução do turnover proteico, pode ocorrer queda da imunidade e aumentando a susceptibilidade a infecções e ferimentos (LAFLAMME, 2008). Além disso o balanço de nitrogênio não consegue separar qual é a contribuição das mudanças na síntese, oxidação e degradação de proteínas na resposta geral do organismo a diferentes ingestões de proteína (HUMBERT *et al.*, 2001).

Segundo Williams (2001) mais do que 16% de PB na dieta não é necessário para cães adultos em manutenção, pois cães adultos que consumiram dietas de mesma energia (4,4kcal/g) com 16%, 24% e 32% de PB, por 10 semanas, mantiveram o balanço de nitrogênio e taxas de síntese de proteínas positivas quando comparada com a taxa de degradação. Já um estudo sobre o catabolismo proteico em cães saudáveis que foram alimentados com uma dieta com 12% de PB por 3 semanas, encontrou diminuições na síntese e degradação de proteínas corporais, através da leucina marcada com isótopos (HUMBERT *et al.*, 2001).

Outro estudo que utilizou a técnica de infusão contínua de isótopos teve como objetivos avaliar o metabolismo proteico de cães adultos em manutenção usando o método da ^{13}C -leucina, e verificar os efeitos da restrição de proteínas e deficiência de AA na cinética da leucina. Durante 2 semanas 8 cães adultos saudáveis consumiram as seguintes dietas: controle com 380 kcal/100g de energia metabolizável (EM); 63g de PB/Mcal e 1,33 g N/kg de (PC) 0,75 ; uma dieta restrita em proteínas com 430 kcal/100g; 32 g PB/Mcal e 0,68g N/kg (PC) 0,75 e uma dieta que não era apenas restrita em proteínas, mas também em lisina e triptofano com 365 kcal/100g; 31 g PB/Mcal; 0,65g N/kg (PC) 0,75 dia. Como conclusão os pesquisadores relataram que os cães têm a capacidade de adaptar seu *turnover* de proteína ao teor e à qualidade de seus

suprimentos de proteína. Com base nos resultados obtidos através do método ^{13}C -leucina, a necessidade de nitrogênio do cão para manutenção pode estar entre 0,55g N/kg PC^{0,75} a 0,41g N/kg PC^{0,75} por dia (HUMBERT *et al.*, 2001), o que corresponde a 3,44 a 2,56g PB/Kg PC^{0,75}.

Em uma pesquisa que utilizou técnicas das ciências ômicas, dietas com diferentes teores de proteína, sendo 18,99%, 25,34% e 45,77% de PB com base na matéria seca, influenciaram a metabolômica e o microbioma intestinal de cães adultos. Os resultados indicaram que o consumo da dieta com teor proteína elevado (45,77%) a longo prazo aumentou os metabólitos associados à disfunção renal, inflamação e proteólise. Já na avaliação da microbiota, um dos achados, foi que o consumo do alimento com 18,99% de PB, aumentou a abundância relativa da bactéria *Faecalibacterium praisnitzii*, bactéria responsável pela produção de butirato e associada à propriedades anti-inflamatórias (EPHRAIM *et al.*, 2020).

Alguns estudos se concentraram em avaliar o requerimento de determinados AA através da técnica de indicador de oxidação de AA (IAAO – *Indicator Amino Acid Oxidation*). A técnica se baseia na hipótese de que quando um aminoácido essencial está limitado na dieta para a síntese de proteínas, outros AA que estão em excesso devem ser oxidados (ELANGO *et al.*, 2012). Quando a ingestão de um aminoácido limitante aumenta, a oxidação de AA essenciais diminui, o que corresponde a um aumento da síntese de proteína. Porém, se a ingestão de AA limitante aumenta mais do que sua exigência, não haverá mudanças na oxidação dos indicadores, ou seja, ele se torna estável a partir do momento que atingiu a sua exigência (RIBEIRO *et al.*, 2008).

Um grupo de pesquisa avaliou os requisitos mínimos de metionina em dietas com cistina fornecida em excesso, em três diferentes raças de cães adultos com a hipótese que o requisito médio de metionina para cães adultos seria diferente entre as raças. A conclusão do estudo foi que cães das raças Beagles e Labrador Retrievers apresentaram maior requerimento por metionina que o recomendado pelo NRC já os da raças Dachshunds apresentaram requerimento semelhante (MANSILLA *et al.*, 2020). Em outro trabalho deste mesmo grupo de pesquisa, Sutherland (2020) sugeriram que os requerimentos de lisina para o cão em manutenção do NRC (2006) estão subestimados e que o teor de lisina na dieta de alimentos comerciais não deve ser inferior a 0,53% (68,41 mg/kg de PC).

Como já mencionado a dieta deve ser formulada com foco na composição dos AA, principalmente em uma dieta considerada baixa em proteína. Segundo Wakshlag (2003), cães que consumiram uma dieta com 12% de proteína por 10 semanas, tendo como fonte exclusiva de proteína o glúten de milho, que tem um ótimo valor biológico, mas é deficiente em algumas AAE como a lisina, apresentaram redução da massa corporal magra (MCM). Os autores também relataram aumento da massa gorda dos cães que consumiram essa dieta com teores de 12% de PB independente da fonte de proteína, possivelmente devido ao elevado teor de carboidrato. Em cães que consumiram dietas com 35 g PB/Mkcal, 65 g PB/Mkcal e 112 g PB/Mkcal por uma semana foi visto menor concentração de metionina no plasma nos cães que consumiram a dieta com baixo teor de proteína, porém isso não foi visto após 04 semanas de consumo das dietas. Este resultado sugere que o suprimento insuficiente de AA da dieta é suplementado por AA endógenos fornecidos após degradação do músculo. Hipótese que foi confirmada com os dados de composição corporal, no qual houve uma redução significativa da MCM após 10 semanas de consumo do alimento de baixo teor proteico (YAMAMOTO *et al.*, 2019).

A avaliação da composição corporal pode ser usada como um indicativo do status nutricional do animal, sendo uma importante ferramenta na rotina clínica (FERRIER, 2002). A metodologia mais prática e frequentemente utilizada é a escalada escore de condição corporal (ECC), é um método subjetivo e semiquantitativo que utiliza como ferramental a visão e o tato do avaliador, em conjunto com o escore de massa muscular (EMM) e o peso corporal (PC) do animal possibilitam a boa avaliação da composição corporal do cão (JEUSETTE *et al.*, 2009; MICHEL *et al.*, 2011). A avaliação precisa da composição corporal é um desafio, pois os componentes do corpo, tais como: gordura, ossos, massa muscular e fluidos, não são compartimentalizados, são misturados em vários tecidos ao longo do organismo (SANTAROSSA; PARR; VERBRUGGHE, 2017).

Entre as técnicas disponíveis, a avaliação da água corporal total por diluição isotópica tem sido utilizada. O enriquecimento isotópico pode ser testado em água plasmática após injeção de uma dose conhecida de água marcada. A medição da água corporal total permite o cálculo da massa livre de gordura. Três isótopos podem ser usados como marcadores de água: deutério (D), trítio e 18-oxigênio (18O), isso se

deve por terem a capacidade de trocar prótons com compostos orgânicos no organismo (FERRIER, 2002).

Medir a diluição do óxido de deutério é uma das técnicas mais eficazes para determinar a composição corporal de humanos e foi validado por resultados de análise química *ex vivo* em cães. A aplicação de deutério se faz através da via subcutânea (SC) e amostras de sangue são coletadas antes e após duas a quatro horas à inoculação. Por diferença entre as concentrações do isótopo, a água corporal total (ACT) é calculada e, com o resultado, é possível calcular a MCM e gordura corporal total (GCT) (SANTAROSSA; PARR; VERBRUGGHE, 2017).

A respeito da composição corporal é sabido que a perda da MCM está associada ao aumento da piora no quadro clínico e mortalidade, algo que pode passar despercebido pois, quando a deficiência de proteína é severa o animal reduz o consumo de alimento, mas quando a restrição é subclínica o cão pode manter o peso, mas ter alteração na sua composição corporal e perda da sua massa muscular. Estudos no qual foram usados marcadores de turnover proteico e medidas de composição corporal, mas especificamente MCM, tiveram resultados diferentes do que quando se utilizou balanço de nitrogênios com relação a necessidade de ingestão de proteína através da dieta (LAFLAMME, 2008).

1.3. CIÊNCIAS ÔMICAS

A descoberta do DNA por Watson e Crick em 1953 foi o início para uma revolução dentro das ciências biológicas e desde então muito conhecimento tem sido gerado, como o sequenciamento do material genético de diversos organismos. E somente com o desenvolvimento deste conhecimento e de novas tecnologias viu-se a necessidade de estudar não só o genoma como também as outras etapas do dogma central, como a transcrição, a tradução e a formação de metabolitos e assim surgiram as ciências “ômicas”. Atualmente temos a genômica (estudo dos genes), transcriptômica (estudo dos transcritos), proteômica (estudo das proteínas), lipidômica (estudo dos lipídios) e metabolômica (estudo dos metabólitos). Esse conjunto de técnicas visam identificar a sequência dos genes de um organismo e seus diferentes produtos em um determinado ambiente e tempo (SOUZA *et al.*, 2014). Nas últimas três décadas, as chamadas ferramentas pós-genômicas, desenvolveram-se e foram

cada vez mais, integradas na pesquisa em uma variedade considerável de áreas, incluindo saúde humana, ciência vegetal ou pesquisa ambiental, dentre muitas outras como a nutrição e medicina veterinária (ALMEIDA *et al.*, 2021). As ciências ômicas possibilitam a elaboração de perguntas biológicas que antes eram muito difíceis de formular, permitindo uma visão prospectiva sobre os efeitos de estímulos biológicos em vários sistemas de forma global (LIPPOLIS *et al.*, 2019).

1.3.1. Proteômica

Proteômica é o estudo das proteínas em larga escala, existe desde o final da década de 1970 e foi possível graças ao desenvolvimento de tecnologias como eletroforese de gel bidimensional e a espectrometria de massa. Trata-se de uma ferramenta complementar a genômica porque foca no produto do gene, que são as substâncias ativas na célula, as proteínas (PANDEY *et al.*, 2000; GALDOS-RIVEROS *et al.*, 2010). Já o proteoma refere-se ao conjunto de proteínas expressas pelo genoma de um organismo em um determinado tempo e condição, sendo assim, o proteoma é algo extremamente dinâmico e variável (WASINGER *et al.*, 1995). A proteômica possibilita saber não só se um gene está sendo expresso, mas todas as modificações que podem ocorrer desde o DNA até a proteína. O controle da expressão gênica ocorre desde a transcrição e processamento do RNA até as alterações nas abundâncias das proteínas e modificações pós-traducionais, como glicosilação, fosforilação, acetilação, hidroxilação, carboxilação, ubiquitinação, dentre outras, responsáveis por modificar a atividade das proteínas (GALDOS-RIVEROS *et al.*, 2010).

O genoma de um organismo permanece relativamente estável ao longo da vida, já o proteoma é dinâmico e se altera de acordo com o *status* fisiológico e as fases da diferenciação celular. Estimativas sugerem que existem mais de um milhão de diferentes tipos de proteínas nas células, nos tecidos e nos fluidos corporais, que são responsáveis pelo controle de todos ou quase todos os processos biológicos (BARBOSA *et al.*, 2012). É possível utilizar as técnicas de proteômica para identificação em larga escala de proteínas e suas modificações pós-traducionais, permitindo a comparação entre diferenças de abundâncias dessas proteínas, além de estudos das interações proteína-proteína (PANDEY *et al.*, 2000).

Dentre as tecnologias disponíveis para análise do proteoma a eletroforese bidimensional pode ser usada para separação de proteínas antes da aplicação da amostra no espectrômetro de massas. Possibilita a separação, com alta resolução, de uma grande quantidade de proteínas de uma amostra complexa, e fazer análise da abundância por meio de comparação dos padrões proteicos observados. A partir dos géis bidimensionais as proteínas de interesse podem ser identificadas pelo ponto isoelétrico e peso molecular aparente, porém é sempre necessário a identificação inequívoca por meio da espectrometria de massa (MS). Na espectrometria de massa as proteínas ou peptídeos sofrem ionização para depois serem identificados. Atualmente existem dois métodos de ionização o MALDI (*Matrix-Assited Laser Desorption/Ionization*) e o ESI (*Electropray Ionization*). No MALDI após bombardeamento por laser, a matriz sublima e seus íons transferem a carga para os analitos, resultando na formação de íons peptídicos. Então a massa molecular dos íons é avaliada em um analisador após passagem por uma câmara de vácuo. Um dos analisadores mais comuns é o TOF (*Time of Flight*). Nele os íons gerados na primeira fase, são acelerados por um potencial entre dois eletrodos e atravessam um tubo de vácuo com velocidade inversamente proporcional a sua massa. Quando os íons chegam até o detector, o tempo decorrido entre a ionização e a detecção é utilizado para gerar o valor m/z (massa/carga). Por meio de análises de bioinformática os sinais gerados são comparados com informações disponíveis em banco de dados, possibilitando a identificação da proteína de interesse (BARBOSA *et al.*, 2012).

As técnicas de proteômica "clássicas", que incluem a identificação e quantificação de proteínas em um determinado ponto de tempo de amostragem, não abordam a dinâmica de o proteoma em termos de síntese e degradação de proteínas individuais, mas sim fazem uma foto do proteoma em um momento específico sobre determinada circunstância (DOHERTY & BEYNON, 2006; GYGI *et al.*, 1999).

1.3.2. Proteômica e nutrição humana

A dieta e o estilo de vida podem afetar praticamente todos os processos celulares, desde a expressão gênica até a síntese e degradação de proteínas. Os nutrientes alteram as funções metabólicas das células de maneira complexa (PANAGIOTOU & NIELSEN, 2009). Com isso surgiram dois campos de pesquisa

dentro da nutrição a nutrigenética e a nutrigenômica, sendo que a nutrigenômica estuda o papel dos nutrientes e compostos bioativos de diferentes alimentos na expressão do gene. A proteômica desenvolveu-se dentro da nutrigenômica, para tentar compreender como nosso genoma é expresso em resposta à dieta (KUSSMANN *et al.*, 2010).

Os nutrientes ou componentes da dieta agem como "sinais", que são recebidos pelos fatores de transcrição, depois de receber os sinais dos nutrientes, os fatores de transcrição modulam a transcrição do DNA de genes específicos, alterando as abundâncias das proteínas em resposta aos nutrientes. Os padrões de expressão gênica, abundância proteica e produção de metabólitos influenciados por certos nutrientes ou componentes dietéticos são considerados "assinaturas dietéticas" (GANESH & HETTIARACHCHY, 2012).

A interação das proteínas com os componentes da dieta ocorre de duas maneiras diferentes, tanto, influenciando a abundância ou modificação pós-tradução das proteínas como causando pequenas interações molécula-proteína e mudanças tridimensionais na estrutura da proteína. Isso pode levar a modificações na função original da proteína, como atividade enzimática, reconhecimento molecular e propriedade regulatória. Desta forma verifica-se que, a maioria das vias catalíticas e regulatórias operam como redes e, uma pequena alteração na estrutura ou atividade de uma proteína, pode levar a um efeito significativo em um indivíduo (GANESH & HETTIARACHCHY, 2012).

A proteômica pode ser usada em estudos de nutrição para entender causa e efeito em sistemas vivos, descobrir e desenvolver biomarcadores que podem auxiliar no tratamento de doenças e também avaliar a segurança e funcionalidade de novos alimentos e ingredientes (KEUSCH, 2006). Através da proteômica foi possível verificar que a formação de peptídeos funcionais, ligeiramente diferentes, na proteína do leite de vaca, pode influenciar o potencial alergênico do leite em humanos. Também foi visto que, os níveis de enzimas hepáticas envolvidas na glicólise, gliconeogênese, oxidação de ácidos graxos e metabolismo de AA variam muito entre camundongos diabéticos magros e obesos. Outros exemplos da aplicação da técnica para achados relacionados a nutrição são que a glutamina altera o proteoma das células intestinais humanas, incluindo as proteínas que regulam o metabolismo de AA, lipídios e vitamina A. Em camundongos alimentados com uma dieta rica em gordura, a análise

proteômica mostrou que as concentrações de enzimas metabólicas hepáticas e proteínas pró-oxidativas foram maiores (WANG *et al.*, 2006).

São poucos os estudos que avaliaram a influência da alimentação na síntese e degradação de proteínas, abordar a dinâmica de renovação de proteínas representa alguns desafios técnicos para a análise de todo o proteoma. O uso de traçadores marcados com isótopos estáveis e espectrometria de massa de razão isotópica (*IRMS - Isotope Ratio Mass Spectrometry*), possibilitou o estudo de influências nutricionais na síntese e degradação de proteínas, porém o grau de enriquecimento dos isótopos necessário para estudos de todo o proteoma ainda é difícil de alcançar em animais e humanos. Algumas tentativas já foram feitas tanto em culturas celulares quanto em organismos vivos, um deles foi em frango alimentado com uma dieta semissintética contendo [²H₈] -valina. O estudo demonstrou pela primeira vez a possibilidade de abordar a análise do *turnover* de proteína em animais. A medição do *turnover* no proteoma humano foi feito usando a incorporação dinâmica de isótopos estáveis em culturas de células com AA (SILAC dinâmico) (KUSSMANN *et al.*, 2010; WAGENMAKERS, 1999).

1.3.3. Proteômica em animais

Embora a aplicação de proteômica em medicina veterinária não seja tão significativa quando em estudo da medicina humana, é possível encontrar na literatura informações principalmente nas áreas de animais de produção, mas também de animais de companhia (CECILIANI *et al.*, 2014). As abordagens proteômicas têm sido cada vez mais utilizadas na ciência veterinária para investigar os processos biológicos responsáveis pelo crescimento, reprodução, eventos patológicos e potências biomarcadores (CECILIANI *et al.*, 2014; GHODASARA *et al.*, 2017). Um conhecimento detalhado da composição proteica de fluidos biológicos em uma determinada espécie sob uma série de condições, é relevante, tanto para a rotina veterinária, quanto para o avanço científico, permitindo a compreensão de todos os processos biológicos e componentes afetados, ajudando a explicar mecanismos fisiopatológicos complexos (MILLER *et al.*, 2014).

1.3.3.1. Animais de produção

A maioria dos estudos que utilizam a proteômica são relacionados aos animais de produção, devido ao seu impacto econômico (CECILIANI *et al.*, 2014). Neste contexto, a proteômica pode ser utilizada em áreas como: saúde, produção e bem-estar animal. Pode trazer informações valiosas com relação a interação patógeno e hospedeiro, sendo útil para o desenvolvimento de vacinas e medicamentos, pode ser usada para garantir segurança alimentar e rastreabilidade, pode estar relacionada à pesquisa de doenças transmitidas por animais e podem auxiliar no desenvolvimento de protocolo de manejos, entre muitas outras aplicações. Um exemplo do uso da proteômica é em estudos de mastite, doença comum em vacas leiteira e que impactam diretamente a produção, por sua capacidade de identificar biomarcadores em condições subclínicas. Um grupo de pesquisa descobriu as principais proteínas associadas à membrana em isolados de *Staphylococcus aureus* de mastite bovina que poderiam estar envolvidas no reconhecimento de receptores de células epiteliais mamárias (ALMEIDA *et al.*, 2021).

Outro exemplo foi uma pesquisa realizada na China onde existe uma elevada demanda por leite. O tipo de forragem oferecido aos animais tem um papel muito importante em sua produção, mas como as diferentes forragens afetam a regulação da produção de leite não é bem compreendido. O país não tem plantações de alfafa, mas tem muita palha de arroz. Então um estudo propôs avaliar o efeito do consumo de palha de arroz e alfafa na regulação da produção de leite através da proteômica e transcriciômica. Doze vacas em lactação foram divididas em dois grupos, cada grupo recebeu uma dieta composta alfafa ou palha de arroz por 98 dias, após o período de consumo foi coletada amostra tecidual das glândulas mamárias das vacas. Foram avaliados a expressão dos transcritos, a abundâncias das proteínas e as vias metabólicas. A conclusão do estudo foi que quatro processos biológicos cruciais podem, contribuir para a redução da síntese de leite em vacas que consumiram palha de arroz, sendo: utilização ineficiente de energia que limitou a produção normal de proteína, degradação de proteínas, aumento do processamento de proteínas no gasto energético e degradação de proteínas associadas a geração de energia, que provavelmente diminuiu o transporte de proteínas a translocação de proteínas secretoras, e a abundância de proteínas relacionadas ao crescimento e

desenvolvimento celular, que prejudicou o crescimento da glândula mamária e produção de leite (DAI *et al.*, 2017).

Outra questão importante na China é a poluição ambiental causada pela elevada produção de nitrogênio pelos animais de produção e ao mesmo tempo a escassez de proteína alimentar para a população e animais. Com isso, pesquisadores avaliaram o efeito do teor de proteína na dieta sobre a expressão de proteínas em três diferentes tecidos tecido do trato gastrointestinal (antro gástrico, duodeno e jejuno) de leitões. Dezoito leitões (Duroc x Landrace x Yorkshire) foram desmamados aos 28 dias de idade e distribuídos aleatoriamente em três dietas com níveis de 14%, 17% e 20% de PB, sendo o teor de 20% de PB considerado o controle, nas três dietas os AA lisina, metionina, tirosina e triptofano foram suplementados para atender aos requisitos de leitões desmamados, o período experimental durou 45 dias (MA *et al.*, 2018).

Os resultados da análise de proteômica dos três tecidos mostraram que, em comparação com o controle, o sistema imunológico, a digestão e absorção de proteínas, foram regulados positivamente no grupo 17% de PB, enquanto a maioria deles foi regulada negativamente no grupo 14% PB. O metabolismo de aminoácidos da secreção gástrica, pancreática do duodeno ou a biossíntese de hormônios esteróides do jejuno foi regulado negativamente no grupo 17% PB, e o metabolismo lipídico foi regulado positivamente no grupo 14% PB. Mesmo com a redução do teor de proteína de 20% para 17%, o desempenho do crescimento não foi afetado, enquanto a digestão e absorção de nutrientes ou a função imunológica foram melhorados. Com base nos resultados os autores concluem que o teor de proteína de 17% pode favorecer a absorção de nutrientes dos porcos, sugerindo que a redução de proteína pode ser benéfica a saúde dos leitões (MA *et al.*, 2018).

1.3.3.2. Animais de companhia

Nas pesquisas na área de pequenos animais a proteômica tem sido aplicada em estudos de oncologia, doenças infecciosas, patologia entre outros e em diversos tipos de amostras como: plasma, soro, saliva, urina, fezes, lagrima, tecido, leite, líquido amniótico e sêmen (CECILIANI *et al.*, 2014; MILLER *et al.*, 2020). Dentro da pesquisa comparativa os animais de companhia são ótimos modelos de pesquisa,

pois frequentemente sofrem de doenças semelhantes à dos humanos, como câncer, doenças cardíacas, doenças renais e obesidade.

Um exemplo interessante de modelo de doença genética é a distrofia muscular do Golden Retriever (GRMD), comparável à distrofia muscular de Duchenn (DMD). GRMD mostra uma patologia muscular muito mais grave do que o modelo de camundongo e reflete melhor o quadro clínico da DMD em humanos. Um estudo proteômico de amostras musculares de cães com GRMD e cães saudáveis, que utilizou a técnica de ICAT (*Isotope Coded Affinity Tag*), revelou que as proteínas envolvidas nas vias metabólicas diminuíram em abundância no músculo GRMD, com metabolismo energético reduzido como marca registrada da doença. (BILIĆ *et al.*, 2018).

Outra doença com elevada incidência tanto em humanos como em cães é a obesidade (DAY, 2010; PORSANI *et al.*, 2020), um estudo avaliou as alterações no proteoma de cães após a perda de peso com o objetivo de entender melhor as alterações fisiológicas decorrentes deste processo. Neste estudo 5 cães machos adultos da raça Beagle foram submetidos a um protocolo de perda de peso por 3 meses, o alimento oferecido foi um alimento comercial para cães obesos e durante o período foi feito um acompanhamento do animal para ajuste da quantidade oferecida. O fluido corporal escolhido para análise de proteômica foi a saliva dos cães, coletada antes e após o emagrecimento. Como conclusão os pesquisadores relatam que 23 proteínas salivares sofreram alteração com a perda de peso. As proteínas que tiveram sua abundância alterada foram as relacionadas com o sistema imune, status inflamatório, estresse oxidativo e metabolismo de glicose, mostrando uma possível melhora fisiológica dos cães após a perda de peso (LUCENA *et al.*, 2020).

Alguns estudos procuram por biomarcadores que possam auxiliar no diagnóstico precoce de algumas doenças comum na prática clínica, como por exemplo, um estudo com cães que teve como objetivo detectar e identificar as proteínas mais abundantes em amostras de fezes de cães saudáveis e de cães com diarreia responsiva ao alimento. Utilizando a técnica de proteômica os pesquisadores encontraram que a cadeia J de imunoglobulina de isoforma 1 estava presente apenas nas amostras dos cães com a doença. A cadeia J combina especialmente monômeros e dímeros de IgA e desempenha um papel crucial para suas secreções na mucosa. Uma possível hipótese é que a presença desta proteína provavelmente está ligada a

ativação do sistema imunológico ou a um dano da mucosa ou ambos em pacientes com diarreia responsiva ao alimento. Ainda é cedo para afirmar que essa proteína poderia ser usada como marcador diagnóstico/prognóstico de doença gastrointestinal, mas o estudo representa um primeiro passo em direção à proteômica fecal em distúrbios gastrointestinais caninos (CERQUETELLA *et al.*, 2019). Como resultado de uma pesquisa feita em cães viu-se uma diferença no proteoma salivar de cães com e sem cálculo dentário. Foram encontradas 225 proteínas em cães sem cálculo dentário, 300 exclusivas a cães com cálculo dentário e 133 pertencentes a ambos os grupos. O resultado mostra potenciais biomarcadores presentes na formação de cálculo dentário em cães, que podem ajudar no diagnóstico da doença e desenvolvimento de substâncias para tratar ou até mesmo evitar a sua formação (BRINGEL *et al.*, 2020).

Apesar de todo esse potencial é possível dizer que a proteômica ainda é subutilizada, devido a uma série de razões, incluindo custo, falta de bons dados genômicos de muitas espécies de interesse e falta de consciência do potencial dessa tecnologia por cientistas animais (ALMEIDA *et al.*, 2014). Na área de biomarcadores e seu possível uso na rotina clínica, alguns desafios encontrados são com relação a coleta de amostras, pois fatores como, diferenças entre idade, raças, coleta e armazenamento de amostras (ou seja, a quantidade de tempo entre a coleta e a análise da amostra) podem alterar profundamente os perfis de proteínas do sangue (MILLER *et al.*, 2014).

O soro e o plasma são muito utilizados na rotina clínica e revelam informações importantes sobre o estado geral do organismo. Apenas 10 proteínas compõem 90% do conteúdo total de proteínas do sangue, mais da metade sendo a albumina. Existem, portanto, pelo menos 10 ordens de diferença de magnitude entre a proteína de maior e menor abundância. Com relação a análise de proteômica, esses obstáculos potenciais podem ser superados pelo uso de algumas técnicas de depleção das proteínas mais abundantes, no entanto, várias proteínas potencialmente importantes podem ser perdidas no processo devido à sua ligação às proteínas altamente abundantes removidas, fato que deve ser considerado nas pesquisas do proteoma (CECILIANI *et al.*, 2014).

2. HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que a abundância de proteínas no soro, a composição corporal e o perfil de aminoácidos plasmático e urinário de cães adultos em manutenção serão semelhantes após o consumo de alimento seco completo e balanceado com 23% (P 23) ou com 30% (P 30) de PB na matéria natural.

3. OBJETIVOS

- Avaliar a composição corporal de cães adultos em manutenção após o consumo de alimento seco completo e balanceado com 23% ou 30% de PB.
- Avaliar o perfil de AA no plasma e na urina de cães adultos em manutenção após o consumo de alimento seco completo e balanceado com 23% ou 30% de PB.
- Avaliar a abundância de proteínas no soro de cães adultos em manutenção após o consumo de um alimento seco completo e balanceado com 23% ou 30% de PB.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL, INSTALAÇÕES E ANIMAIS

O estudo foi conduzido no canil da fazenda da empresa Grandfood LTDA e no Centro de Desenvolvimento Nutricional da Premierpet® (CDN), ambos localizados na cidade de Dourado, São Paulo.

Todo o protocolo experimental foi conduzido de acordo com os princípios éticos de experimentação animal, sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) (protocolo CEUA 6772200922) e CEUA/Grandfood (protocolo 162-22).

Foram utilizados 9 cães adultos, castrados, sem raça definida, sendo 4 fêmeas e 5 machos, com idade média de $4,11 \pm 1,53$ anos, PC médio de $14,40 \pm 3,22$ kg, ECC médio de $4,78 \pm 0,66$ na escala de 1 a 9 de Laflame 1997. Todos os cães estavam clinicamente saudáveis, desverminados e vacinados. Os animais permaneceram em seus canis originais, sob suas rotinas habituais de exercício e socialização.

4.2. DIETAS EXPERIMENTAIS

Antes de formular os tratamentos foi feito o acompanhamento do consumo de alimento, PC e ECC dos cães por 30 dias. Neste período não foi observada mudança significativa no peso e ECC dos animais. Com base no PC de cada animal foi feito o cálculo do peso metabólico ($PC^{0,75}$), os valores foram multiplicados por 4,95, o mínimo de g de proteína por kg de peso metabólico indicado pelo FEDIAF 2021.

O resultado desta multiplicação foi multiplicado por cem e dividido pela quantidade de ração (g) consumida por cada cão por dia. Assim, obteve-se o teor mínimo de PB que os cães precisariam consumir para manter o peso e ECC. Fazendo a média dos resultados foi obtido um valor usado com base, para o alimento com menor teor de proteína, para o outro alimento foi colocado 7 pontos percentuais a mais, uma quantidade de PB significativa.

Foram formuladas, em programa específico, duas rações, cujas composições químicas atendem as recomendações para o cão adulto, de acordo com a FEDIAF

(2021) e que resultaram em dietas com teores de proteína de 23% (P 23) e 30% (P 30) respectivamente.

Os ingredientes utilizados na fabricação das rações testes foram provenientes da unidade fabril da Grandfood Indústria e Comércio Ltda (PremieRpet®). Todos os ingredientes empregados na produção das dietas experimentais foram obtidos a partir de um único lote, para evitar variabilidade entre os alimentos. A farinha de vísceras de aves foi o único ingrediente proteico adicionado na fórmula. Este ingrediente foi previamente analisado quanto a PB e perfil de AA, e os resultados utilizados para formulação das dietas experimentais. Os alimentos foram extrusados na fábrica de rações da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista (FMVZ/UNESP), localizado em Botucatu, São Paulo. Após extrusão, amostras dos dois tratamentos foram enviadas para análise. As análises bromatológicas de umidade, PB, extrato etéreo em hidrólise ácida, matéria mineral, cálcio e fósforo foram realizadas no laboratório PremieRpet®, e as análises dos AA no laboratório CBO®, localizado em Valinhos, SP, os resultados estão na Tabela 02.

Tabela 02. Composição química analisada e ingredientes das dietas experimentais.

Variáveis (%)	Dietas ¹					
	P 23			P 30		
Umidade	6,75			6,06		
	Valores na MN	Valores na MS	g/1000kcal	Valores na MN	Valores na MS	g/1000kcal
Proteína Bruta	23,08	24,74	59,31	29,98	31,91	75,65
Aminoácidos						
Lisina	1,45	1,55	3,73	2,01	2,14	5,07
Treonina	0,88	0,94	2,26	1,10	1,17	2,78
Metionina	0,48	0,51	1,23	0,61	0,65	1,54
Metionina + Cistina	0,77	0,83	1,98	0,97	1,03	2,45
Arginina	1,39	1,49	3,57	1,82	1,94	4,59
Histidina	0,84	0,90	2,16	1,08	1,15	2,73
Isoleucina	0,82	0,88	2,11	1,09	1,16	2,75
Leucina	1,78	1,91	4,58	2,18	2,32	5,50
Fenilalanina	0,92	0,99	2,36	1,15	1,22	2,90
Fenilalanina + Tirosina	1,62	1,74	4,16	2,03	2,16	5,12
Valina	1,07	1,15	2,75	1,39	1,48	3,51
Taurina	0,10	0,11	0,26	0,13	0,14	0,33
Glicina	1,74	1,87	4,47	2,23	2,37	5,63
Serina	0,93	1,00	2,39	1,14	1,21	2,88
Hidroxiprolina	0,53	0,57	1,36	0,69	0,73	1,74
Triptofano	0,32	0,34	0,82	0,35	0,37	0,88
Extrato etéreo hidrólise ácida	14,74	15,80	37,88	14,59	15,53	36,80
Fibra Bruta	2,18	2,34	5,60	2,17	2,31	5,48
Matéria Mineral	5,55	5,96	14,27	7,10	7,55	17,91
Cálcio	1,38	1,48	3,55	1,60	1,70	4,04
Fósforo	0,71	0,76	1,83	0,87	0,93	2,20
Energia metabolizável <i>in vivo</i> (kcal/g)		3,890			3,962	

¹Ingredientes: Milho, farinha de vísceras de aves, quirera de arroz, polpa de beterraba, gordura de frango, antioxidantes BHA e BHT (0,012%), bentonita, cloreto de potássio, cloreto de sódio, antifúngico, hidrolisado de frango, vitamina A, vitamina B12, vitamina C, vitamina D3, vitamina E, vitamina K3, ácido fólico, ácido pantotênico, biotina, cloreto de colina, niacina, piridoxina, riboflavina, tiamina, ferro aminoácido quelato, iodeto de potássio, manganês aminoácido quelato, proteinato de selênio, sulfato de cobre, sulfato de ferro, sulfato de zinco, zinco aminoácido

4.2.1. Digestibilidade das dietas experimentais

Os coeficientes de digestibilidade aparente (CDA) dos nutrientes e a energia metabolizável das rações foram determinados segundo o método de coleta total de fezes (AAFCO, 2020). Durante quatro dias consecutivos as fezes dos cães foram recolhidas quantitativamente, ao menos duas vezes ao dia, pesadas e congeladas (-20°C) (MENDONCA *et al*, 2023). Ao final do período de colheita, as fezes foram descongeladas e homogeneizadas, compondo uma amostra por animal. As amostras de fezes foram secas em estufa de ventilação forçada (Fanem, São Paulo, Brasil) a 55°C por 72h. As amostras de fezes e rações foram moídas em moinho tipo faca (MOD 340, ART LAB, São Paulo), com peneira de 0,8mm e analisadas de acordo com os procedimentos descritos pela AOAC para a matéria seca, matéria mineral, PB e extrato etéreo em hidrólise ácida. Uma porção das amostras de fezes e uma amostra de cada dieta foi enviada para o laboratório CBO®, localizado em Valinhos, SP para análise de energia bruta.

Com base nos resultados laboratoriais obtidos, foram calculados os coeficientes de digestibilidade aparente dos nutrientes e a energia metabolizável dos alimentos.

4.3. MANEJO ALIMENTAR

O ensaio experimental durou 112 dias, dividido em dois períodos de 56 dias cada. Todos os animais consumiram os dois alimentos, caracterizando um ensaio rotacional (*crossover design*), ou seja, em cada período um grupo de animais consumiu um alimento. Após o final do primeiro período, houve a troca dos tratamentos entre os dois grupos e deu-se o início do segundo período. Os animais foram alimentados duas vezes ao dia. O cálculo da oferta diária de alimento foi feito com base na quantidade de kcal para manutenção do PC de cada um e energia metabolizável dos alimentos. A oferta diária foi dividida em duas porções, cada porção era pesada e armazenada em sacos plásticos identificado com o nome do animal, período e dia da semana. As sobras foram armazenadas no saco da oferta de cada refeição e posteriormente pesada, fazendo-se posteriormente o cálculo do consumo

diário das dietas para cada cão. A pesagem dos animais foi realizada em balança digital de uso veterinário, a cada 7 dias, assim como a avaliação do ECC, de acordo com a escala de um a nove pontos validada para cães por Laflamme (2005), durante todo o período experimental. Quando necessário foi feito o ajuste da quantidade de alimento oferecido, objetivando-se a manutenção do PC inicial.

Durante 15 dias antes de começar o período experimental todos os cães consumiram o mesmo alimento, sendo um alimento super premium com 27% de PB.

4.4. COLHEITA DE MATERIAL

Após consumo dos tratamentos por 56 dias, foi feita a coleta de amostras de sangue para análise de proteômica, perfil AA no plasma e composição corporal. Também foi feita a coleta de urina para análise de AA.

4.4.1. Colheita de sangue

Após jejum alimentar de 12 horas e hídrico de 2h amostras de sangue foram coletadas por venopunção da jugular e/ou cefálica, para análises proteômica, perfil de AA e composição corporal. As amostras foram separadas em 2 tubos, sendo um tubo com ativador de coágulo para posterior separação do soro e um com heparina para posterior separação do plasma. Foram colocados em isopor com gelo e levados ao laboratório.

4.4.2. Colheita de urina

As amostras de urina foram coletadas por micção espontânea ou por sonda uretral, em pote coletor estéril e logo colocadas em tubo com heparina sódica, então foram colocados em isopor com gelo e levados ao laboratório.

4.5. ANÁLISES PROTEÔMICAS

Ao chegar no laboratório as amostras foram colocadas em centrífuga refrigerada a 3915rpm por 20 minutos a 4°C. Então as amostras de soro foram

armazenadas em *eppendorfs* previamente identificados e armazenado em freezer a -80°C até serem enviadas para análise.

Para a análise as amostras de soro destinadas a proteômica foram retiradas do armazenamento a -80°C e descongeladas em banho de gelo.

Após descongelamento das amostras de soro canino foi adicionado um coquetel de inibidores de protease às amostras (*Protease Inhibitor Cocktail*, SIGMA) para evitar a degradação proteica e para promover a depleção das proteínas mais abundantes. Para remover as 14 proteínas mais abundantes encontradas no sangue, a mesma quantidade de cada amostra de soro passou por uma coluna cromatográfica de afinidade (*Multi Affinity Removal Column*, Agilent Technologies). As frações de menor abundância de proteína foram usadas para todas as etapas seguintes.

A quantidade de proteína da fração recuperada das amostras de soro foi quantificada usando o método ácido bicinonínico (*BCA. Protein Assay Kit*). Com o objetivo de obter maior qualidade da troca de tampão e digestão de proteínas, realizamos o protocolo FASP (*Filter aided sample preparation*) para digestão trípica (Distler U. e Tenzer S., 2016). De forma resumida esse protocolo consiste em lavagem para troca de tampão em uma ponta de microcoluna com um corte de MW de 10kDa e digestão trípica realizada em coluna. Foram utilizados 20 microgramas de proteína para a realização do protocolo FASP, onde as amostras foram reduzidas, alquiladas e posteriormente digeridas com tripsina. Os peptídeos digeridos de cada amostra foram ressuspensos em 0,1% de FA. A separação dos peptídeos trípticos foi realizada em um Sistema *ACQUITY IClass*, Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência - UPLC (*Waters Corporation*). 5 µg de cada amostra digerida foi carregado em uma pré-coluna *Symmetry C18 5 µm*, 180 µm × 20 mm (*Waters Corporation*) usada como coluna de captura e subsequentemente separada por um gradiente de fase reversa de 120 min a 300 nL/min (gradiente linear, 3–55% ACN ao longo de 90 min) usando um HSS T3 C18 1,7 µm, 1 mm × 150 mm e Coluna LC (*Waters Corporation*) mantida a 40°C. Para a eluição de gradiente água-ácido fórmico (99,9/0,1, v/v) foi usado como eluente A e ácido acetonitrilo fórmico (99,9/0,1, v/v) como eluente B. Os peptídeos separados foram analisados por espectrômetro de massa de alta definição Xevo-G2Xs diretamente acoplado ao sistema cromatográfico. A abundância diferencial de proteínas foi avaliada com uma aquisição independente de dados (DIA) de análise proteômica *shotgun* pelo modo de configuração de expressão (MSe). O espectrômetro

de massa operou no “Modo Expressão” alternando entre energias de colisão baixas (4 eV) e altas (25–60 eV) na célula de gás, usando um tempo de varredura de 1,0s por função em 50–2000 m/z. O processamento de energia baixa e elevada, adicionado aos dados da massa de bloqueio de referência (*[Glu1]-Fibrinopeptide B Standard*, Waters Corporation) fornece um inventário alinhado no tempo de componentes de tempo de retenção de massa precisos para energia baixa e elevada (EMRT, tempo exato de retenção de massa), cada amostra foi processada duas vezes.

Os dados de Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) de três repetições para cada amostra foram processados para análise qualitativa e quantitativa usando o programa *Progenesis* (Waters Corporation). A identificação qualitativa das proteínas foi obtida por meio de busca no banco de dados de *Canis lupos familiaris*. Os parâmetros de pesquisa foram definidos como: tolerância automática para íons precursores e para íons de produto, mínimo de 7 íons de fragmentos correspondentes por peptídeo, mínimo de 3 íons de fragmentos correspondentes por proteína, mínimo de 1 peptídeo exclusivo correspondente por proteína, 2 falhas de clivagem, carbamidometilação de cisteínas como modificação fixa e oxidação de metioninas como modificações variáveis, taxa de descoberta falsa (FDR) do algoritmo de identificação <1%. Plataforma UPLC em espectrômetro de massa com fonte ionização por ESI e analisador de massas híbrido Xevo G2 Q-TOF (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado com sistema nanoAcquity Ultra Performance LC (Waters, Milford, MA, EUA). A identificação das proteínas foi feita por meio de busca em banco de dados Uniprot (www.uniprot.org).

A análise quantitativa sem marcação foi obtida usando a intensidade de abundância relativa integrada no programa *Progenesis*, usando todos os peptídeos identificados para normalização.

4.6. DETERMINAÇÃO DOS AMINOÁCIDOS

Após as coletas, as amostras de sangue e urina foram colocadas em centrífuga refrigerada por 10 minutos, a 3.0000 rpm e ângulo de 45°. Alíquotas de 0,5mL de plasma e 1mL de urina foram congeladas a -80°C até o encaminhamento para análise. As amostras foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; Biochrom 30 Amino Acid Analyser, Biochrom, Cambridge, UK).

4.7. COMPOSIÇÃO CORPORAL

Para a composição corporal dos cães optou-se pelo método de diluição de isótopos de deutério. Foi administrado 1mL/kg de PC de uma solução de óxido de deutério diluído a 10% por via subcutânea. As amostras de sangue foram coletadas da veia jugular antes e após 02 horas à inoculação da solução contendo o óxido de deutério. Estas foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm para extração do soro e armazenadas a - 20°C em criotubos âmbar de tampa rosqueável, vedados com parafilme. As análises foram realizadas por espectrometria de massa de razões isotópica no Centro de Isótopos Estáveis Prof. Dr. Carlos Ducatti do Instituto de Biociência, UNESP, Campus de Botucatu/SP. A partir destas amostras, foi possível quantificar a água corpórea e, então, prosseguir com os cálculos de massa gorda e massa magra corpórea.

5. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A análise de abundância dos peptídeos foi realizada considerando um modelo linear misto com o efeito fixo de tratamento (P 23 ou P 30), além dos efeitos aleatórios de período e animal. Nestas análises foi adotada a estrutura de medidas repetidas nas mesmas unidades experimentais (mesmos animais avaliados em diferentes períodos). As estruturas de covariância entre as medidas repetidas foram avaliadas pelo critério de informação de Akaike, AIC (AKAIKE,1973). As pressuposições dos modelos de análise variância (normalidade e homogeneidade dos resíduos) foram realizadas simultaneamente por meio de análises de resíduos condicionais *Studentizados*. Em caso de Teste F significativo ($P < 0,05$), o próprio Teste F foi considerado discriminatório.

Todas as variáveis relacionadas à composição corporal e perfil aminoacídico plasmático foram avaliadas considerando um modelo linear misto geral que contemplaram os efeitos fixos de tratamentos (P 23 ou P 30), Momentos (T_0 =início de administração das Dietas Experimentais ou T_{56} = 56 dias após o início de administração das Dietas Experimentais), interação Tratamentos x Momentos, além dos efeitos aleatórios de animal e resíduo. Os animais foram incluídos nas análises

visando acomodar a estrutura de medidas repetidas nas mesmas unidades experimentais. As avaliações das pressuposições dos modelos de análise variância (normalidade e homogeneidade dos erros) foram também realizadas simultaneamente por meio de análises de resíduos condicionais *Studentizados*. Em caso de resultados significativos para os efeitos fixos de Tratamentos, Momentos ou Interação Tratamentos x Momentos, o Teste F foi utilizado, de forma apropriada, como procedimento para comparação das médias, visando manter o nível de confiança conjunto fixado.

Todas as análises foram realizadas utilizando o procedimento PROC MIXED, do programa *Statistical Analysis System*, versão 9.4 (*SAS Institute Inc.*, Cary, NC, EUA)

6. RESULTADOS

6.1. DIGESTIBILIDADE DAS DIETAS, CONSUMO, PESO CORPORAL, ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E COMPOSIÇÃO CORPORAL DOS CÃES

Todos os animais apresentaram ingestão adequada dos alimentos, não houve episódios de rejeição ou diarreia. Nenhum animal apresentou reação adversa ao consumir os tratamentos com diferentes teores de proteína, todos os animais permaneceram saudáveis durante todo o período do experimento.

O PC dos cães não variou ao longo do estudo, para nenhum dos tratamentos em avaliação ($P > 0,05$). Não foi visto diferença significativa na composição corporal dos cães após consumo de dietas com diferentes teores de proteína, tanto na porcentagem de massa magra quanto na de gordura ($P > 0,05$). Para a média dos 56 dias de observação, foi verificado consumo de matéria seca e energia metabolizável semelhantes entre cães alimentados com os diferentes tratamentos ($P > 0,05$), como pode ser observado na Tabela 03.

Tabela 03. Peso corporal inicial e final, composição corporal e consumo de matéria seca e energia metabolizável (EM) de cães alimentados com alimentos extrusados com diferentes teores de proteína.

Variáveis	Dieta ¹		EPM ²	P valor
	P 23	P 30		

Peso Corporal (kg)				
Inicial	14,36	14,56	1,06	0,8954
Final	14,33	14,52	1,02	0,8972
Escore de condição corporal (ECC)				
Inicial	4,89	4,78	0,24	0,7498
Final	5,00	5,11	0,22	0,7241
Composição corporal (%) - média dos 56 dias				
Gordura	21,27	19,71	1,96	0,5888
Massa Magra	78,73	80,29	1,96	0,5888
Consumo (média dos 56 dias)				
MS (g/kg PC/dia)	12,52	12,95	0,83	0,7198
Consumo de energia (kcal/dia)	733,05	781,15	48,43	0,4926

¹P 23: ração 23% de proteína; P 30: ração com 30% de proteína;

²Erro padrão da média (n=9 cães por dieta)

Para a ingestão de PB por quilo de PC (g /kg PC/dia) e por quilo de peso metabólico (g/kg PC^{0,75}/dia) por dia, diferenças significativas foram observadas (P=0,0079 e P=0,0136) entre os tratamentos, assim como, para a ingestão por quilo de PC, dos AAE e AANE (alanina, aspartato, cisteína, glicina, glutamina, hidroxiprolina, prolina, serina, taurina e tirosina). Já o triptofano teve sua ingestão diária semelhante entre as dietas avaliadas (P>0,05), dados que podem ser vistos na Tabela 04.

Tabela 04. Ingestão de proteína bruta em gramas (g) por quilo de peso corporal e por quilo de peso metabólico (PC^{0,75}) e ingestão de aminoácidos por quilo de peso metabólico de cães alimentados com alimentos extrusados com diferentes teores de proteína.

Variáveis	Dietas ¹		EPM ²	P valor
	P 23	P 30		
Ingestão durante o ensaio experimental				
Proteína bruta (g/kg PC/dia)	3,10	4,13	0,24	0,007
Proteína bruta (g/kg PC ^{0,75} / dia)	6,19	8,02	0,47	0,013
Aminoácidos essenciais (g/kg PC ^{0,75} / dia)				
Arginina (ARG)	0,357	0,52	0,03	0,004
Histidina (HIS)	0,23	0,34	0,02	0,006
Isoleucina (ILE)	0,23	0,31	0,02	0,003
Leucina (LEU)	0,49	0,62	0,03	0,020
Lisina (LIS)	0,40	0,57	0,03	0,001
Metionina (MET)	0,13	0,17	0,01	0,008
Metionina + Cistina	0,21	0,28	0,01	0,010

Fenilalanina (FEN)	0,26	0,33	0,02	0,012
Fenilalanina + Tirosina	0,45	0,58	0,03	0,012
Treonina (THR)	0,24	0,31	0,02	0,012
Triptofano (TRP)	0,09	0,10	0,01	0,2086
Valina (VAL)	0,30	0,39	0,02	0,005
Aminoácidos não essenciais (g/kg PC ^{0,75} / dia)				
Alanina (ALA)	0,41	0,53	0,03	0,008
Aspartato (ASP)	0,52	0,70	0,04	0,005
Cisteína (CIS)	0,08	0,10	0,01	0,014
Glicina (GLI)	0,48	0,63	0,03	0,007
Glutamina (GLN)	0,89	1,14	0,06	0,012
Hidróxiprolina (HPR)	0,15	0,20	0,01	0,005
Prolina (PRO)	0,39	0,48	0,03	0,033
Serina (SER)	0,26	0,32	0,02	0,019
Taurina (TAU)	0,03	0,04	0,01	0,005
Tirosina (TYR)	0,19	0,25	0,01	0,011

¹P 23: ração 23% de proteína; P 30: ração com 30% de proteína;

²Erro padrão da média (n=9 cães por dieta)

Não foram observadas diferenças significativas nos coeficientes de digestibilidade aparente da matéria seca (MS), matéria orgânica (MO), extrato etéreo hidrolise ácida (EEA) e extrativo não nitrogenado (ENN) ($P > 0,05$), entre os tratamentos. Contudo, o tratamento P 30 apresentou um coeficiente de digestibilidade aparente de PB superior ao tratamento P 23 ($P = 0,0042$). A energia metabolizável (kcal/kg), também foi significativamente diferente entre as dietas ($P = 0,0495$), sendo maior no tratamento P 30, conforme observado na Tabela 05.

De acordo com a Tabela 05, as variáveis fecais, escore de fezes e volume de fezes não foram verificadas diferenças significativas entre os tratamentos ($P > 0,05$).

Tabela 05. Coeficiente de digestibilidade aparente dos nutrientes, produção e escore fecal de cães alimentados com dietas experimentais contendo diferentes teores de proteína.

Variáveis	Dieta ¹		EPM ²	Valor de p
	P 23	P 30		
	Coeficiente de digestibilidade aparente (%)			
Matéria seca	83,03	83,20	0,67	0,8565
Matéria orgânica	86,96	87,64	0,55	0,3607
Proteína Bruta	85,68	88,49	0,54	0,0042
Extrato etéreo em hidrolise ácida	93,94	94,47	0,44	0,4202
Extrativos não-nitrogenados	87,91	87,92	0,64	0,9914
	Produção fecal			

Escore fecal	4,57	4,51	0,21	0,8504
Volume de fezes (MN) gFz/gR	0,56	0,56	0,02	0,8865
	Energia Metabolizável			
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3.890,42	3.962,76	22,89	0,0495

¹P 23: ração 23% de proteína; P 30: ração com 30% de proteína;

²Erro padrão da média (n=9 cães por dieta)

6.2. PERFIL DE AMINOÁCIDOS PLASMÁTICOS E URINÁRIO

Foram detectados 30 AA no plasma e na urina, sendo prolina e hidroxiprolina encontrado exclusivamente no plasma e os compostos d-hidroxilisina e amônio encontrados somente na urina. Não foi encontrada diferença significativa na concentração de nenhum dos AA plasmáticos e urinários ($P > 0,05$) após consumo de dietas com teor de PB de 23% e 30% respectivamente. Também não foram encontradas diferenças na soma dos aminoácidos de cadeia ramificadas (BCAA), AAE e AANE, assim como a relação AAE/AANE, valina e glicina, arginina e cistina, tirosina e fenilalanina, e serina e glicina, tanto na urina quanto no plasma ($P > 0,05$). Os dados podem ser vistos nas tabelas 06 e 07.

Tabela 06. Concentrações dos aminoácidos séricos em cães saudáveis após consumo de dietas com diferentes teores de proteína

Variáveis	Dieta ¹		EPM ²	Valor de p
	P 23	P 30		
	Aminoácidos essenciais (nMol/mL)			
Arginina (ARG)	136,15	142,25	8,09	0,608
Histidina (HIS)	87,49	89,05	2,79	0,704
Isoleucina (ILE)	72,60	72,27	4,37	0,958
Leucina (LEU)	147,38	147,19	7,71	0,987
Lisina (LIS)	197,74	210,20	15,57	0,587
Metionina (MET)	61,98	61,38	2,18	0,848
Fenilalanina (FEN)	62,15	64,58	2,93	0,575
Treonina (THR)	212,23	228,50	15,04	0,466
Triptofano (TRP)	61,84	64,27	7,93	0,834
Valina (VAL)	208,32	260,25	10,48	0,893
	Aminoácidos não essenciais (nMol/mL)			
Alanina (ALA)	479,34	500,32	47,82	0,764
Aspargina (ASN)	70,41	72,31	3,72	0,727
Aspartato (ASP)	6,67	6,84	0,26	0,661
Cisteína (CIS)	21,32	22,07	1,74	0,771
Citrulina (CIT)	58,83	52,10	4,77	0,347
Glicina (GLI)	226,56	251,14	17,20	0,342
Glutamato (GLU)	30,49	30,90	1,97	0,886
Glutamina (GLN)	576,80	575,60	32,20	0,979

Hidróxiprolina (HPR)	18,50	24,62	4,29	0,342
Ornitina (ORN)	10,96	11,64	1,25	0,713
Prolina (PRO)	155,15	146,52	12,84	0,647
Serina (SER)	129,28	128,69	9,74	0,967
Taurina (TAU)	125,12	120,76	6,16	0,630
Tirosina (TYR)	51,54	53,24	2,99	0,698
Ácido α -aminobutírico (AABA)	30,12	24,36	4,43	0,384
1-Metil-L-histidina (1_MHIS)	13,53	15,52	2,48	0,587
3-Metil-L-histidina (3_MHIS)	8,84	10,64	1,54	0,433
Anserina	9,24	12,43	1,43	0,154
Carnosina (CAR)	31,99	33,22	2,65	0,752
Cistationina	5,24	6,90	0,73	0,148
BCAA ³	428,30	425,72	22,22	0,936
AAE ⁴	1247,89	1285,94	50,09	0,606
AAE ⁵	2059,95	20,9981	83,09	0,743
Razões dos aminoácidos (nMol/mL)				
AAE/AAE	0,61	0,62	0,02	0,874
Val/Gli	0,96	0,84	0,06	0,217
Arg/Cit	2,24	2,82	0,20	0,183
Tir/Fen	0,83	0,83	0,03	0,911
Ser/Gli	0,57	0,53	0,04	0,502

¹P 23: ração 23% de proteína; P 30: ração com 30% de proteína;

²Erro padrão da média (n=9 cães por dieta)

³Aminoácidos de cadeia ramificada (soma dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina)

⁴Aminoácidos essenciais

⁵Aminoácidos não essenciais

Tabela 07. Concentrações dos aminoácidos urinários em cães saudáveis após consumo de dietas com diferentes teores de proteína

Variáveis	Dieta ¹		EPM ²	Valor de p
	P 23	P 30		
	Aminoácidos essenciais (nMol/mL)			
Arginina (ARG)	3077	38,32	7,30	0,514
Histidina (HIS)	22,77	19,56	6,40	0,748
Leucina (LEU)	42,94	34,65	10,13	0,585
Lisina (LIS)	303,77	416,64	79,02	0,376
Metionina (MET)	42,15	54,94	11,63	0,489
Fenilalanina (FEN)	12,48	15,06	2,58	0,519
Treonina (THR)	114,38	132,88	29,55	0,866
Triptofano (TRP)	25,90	16,04	4,84	0,668
Valina (VAL)	8,72	12,33	2,12	0,295
	Aminoácidos não essenciais (nMol/mL)			
Alanina (ALA)	217,85	214,79	51,90	0,969
Aspargina (ASN)	117,60	129,82	32,04	0,806
Aspartato (ASP)	105,38	123,55	22,40	0,605
Cisteína (CIS)	57,54	66,19	14,14	0,695
Citrulina (CIT)	21,48	23,65	5,91	0,813

Glicina (GLI)	135,48	177,60	37,08	0,475
Glutamato (GLU)	62,07	79,78	15,95	0,485
Glutamina (GLN)	118,61	155,34	31,73	0,467
Ornitina (ORN)	21,39	15,91	5,74	0,531
Serina (SER)	207,65	246,63	51,92	0,632
Taurina (TAU)	6100,72	8490,93	1154,28	0,218
Tirosina (TYR)	20,43	23,14	4,06	0,669
Ácido α -aminobutírico (AABA)	25,96	29,55	7,82	0,768
1-Metil-L-histidina (1_MHIS)	3090,09	3885,69	896,82	0,573
3-Metil-L-histidina (3_MHIS)	417,60	546,06	106,20	0,449
Anserina	213,24	178,60	59,09	0,694
Carnosina (CAR)	99,08	116,90	26,41	0,666
Cistationina	8,71	8,08	2,94	0,885
Amônio	28851,00	25398,00	5738,16	0,699
d-hidroxilisina	188,56	59,96	91,24	0,382
BCAA ³	18,13	49,66	13,30	0,939
AAE ⁴	656,84	743,09	157,13	0,718
AANE ⁵	12797	14748,00	2470,14	0,606
Razões dos aminoácidos (nMol/mL)				
AAE/AANE	0,05	0,05	0,00	0,924
Val/Gli	0,07	0,07	0,01	0,974
Arg/Cit	1,96	1,65	0,29	0,503
Tir/Fen	1,78	1,75	0,25	0,935
Ser/Gli	1,61	1,39	1,14	0,319

¹P 23: ração 23% de proteína; P 30: ração com 30% de proteína;

²Erro padrão da média (n=9 cães por dieta)

³Aminoácidos de cadeia ramificada (soma dos aminoácidos isoleucina, leucina e valina)

⁴Aminoácidos essenciais

⁵Aminoácidos não essenciais

6.3. ANÁLISE PROTEÔMICA

A análise de bioinformática resultou em 559 peptídeos nas 18 amostras, após depleção das proteínas mais abundantes. A análise de variância apontou vinte proteínas diferentemente abundantes entre os tratamentos P 23 e P 30, e destas, 9 são codificadas pelo mesmo gene. Das 20 proteínas significativamente diferentes apenas 6 estavam reguladas positivamente no tratamento P 30 quando comparadas com o tratamento P 23, sugerindo que estavam em maior abundância relativa. Essas proteínas foram: *hydroxyisourate hydrolase*, *CD164 molecule*, *integral membrane protein*, *biotinidase*, *amine oxidase* e *olfactory receptor (Fragment)* (Tabela. 08).

Tabela 08. Proteínas diferencialmente abundantes no soro de cães alimentados com dietas experimentais contendo diferentes teores de proteína.

Acesso no UniProt	Nome da proteína	Dieta¹	Média	EPM²	
A0A8C0M3W0	<i>Ig-like domain-containing protein</i>	P 23	0,0309	0,0028	A
		P 30	0,0258	0,0028	B
A0A8C0M6I3	<i>Complement C8 gamma chain</i>	P 23	0,0011	0,0002	A
		P 30	0,0009	0,0002	B
A0A8C0M9Q8	<i>Ig-like domain-containing protein</i>	P 23	0,0240	0,0030	A
		P 30	0,0187	0,0030	B
A0A8C0MLK2	<i>hydroxyisourate hydrolase[...]</i>	P 23	0,0022	0,0009	B
		P 30	0,0033	0,0009	A
A0A8C0MM38	<i>CD164 molecule</i>	P 23	0,0074	0,0005	B
		P 30	0,0086	0,0005	A
A0A8C0MN59	<i>Serotransferrin</i>	P 23	1,6145	0,1316	A
		P 30	1,4157	0,1316	B
A0A8C0N4N9	<i>Ankyrin repeat domain 11</i>	P 23	0,0007	0,0001	A
		P 30	0,0002	0,0001	B
A0A8C0N9F1	<i>APC regulator of WNT signaling pathway</i>	P 23	0,0010	0,0001	A
		P 30	0,0008	0,0001	B
A0A8C0NVP3	<i>Complement C1s (C1 Esterase)</i>	P 23	0,1417	0,0097	A
		P 30	0,1297	0,0097	B
A0A8C0NZI0	<i>Integral membrane protein 2 (Single-pass type II membrane protein)</i>	P 23	0,0883	0,0113	B
		P 30	0,1076	0,0113	A
A0A8C0P1Y7	<i>CCDC144C-like coiled-coil domain-containing protein</i>	P 23	0,0004	0,0000	A
		P 30	0,0004	0,0000	B
A0A8C0PBJ1	<i>Perilipin 4</i>	P 23	0,0995	0,0092	A
		P 30	0,0835	0,0092	B
A0A8C0PDA2	<i>Biotinidase</i>	P 23	0,0078	0,0005	B
		P 30	0,0090	0,0005	A
A0A8C0SKL5	<i>Amine oxidase[...]</i>	P 23	0,0007	0,0001	B
		P 30	0,0008	0,0001	A
A0A8C0TJ42	<i>Transferrin</i>	P 23	1,5846	0,1485	A
		P 30	1,3978	0,1485	B
A0A8C0TK12	<i>Complement C1s</i>	P 23	0,1172	0,0089	A
		P 30	0,1016	0,0089	B
A0A8I3PUP2	<i>Ig-like domain-containing protein</i>	P 23	0,0012	0,0001	A
		P 30	0,0010	0,0001	B
A0A8I3QAD7	<i>Transferrin-like domain-containing protein</i>	P 23	1,6136	0,1313	A
		P 30	1,4143	0,1313	B
A0A8P0NT31	<i>Ig-like domain-containing protein</i>	P 23	0,0209	0,0029	A
		P 30	0,0157	0,0029	B
Q70Z88	<i>Olfactory receptor 16 Subfamily C Member 11</i>	P 23	0,0433	0,0130	B
		P 30	0,0466	0,0130	A

¹P 23: ração 23% de proteína; P 30: ração com 30% de proteína;

²Erro padrão da média (n=9 cães por dieta)

Detalhes dos peptídeos, como números de acesso e *fold changes* são apresentadas na Tabela 09.

Tabela 09. Resumo dos peptídeos, como números de acesso e escore de confiança (*fold changes*) de cães alimentados com dietas experimentais contendo diferentes teores de proteína.

Acesso no UniProt	Nome da proteína	Nome do gene	Número de peptídeos	Peptídeos únicos	Escore de confiança
A0A8C0M3W0	<i>Ig-like domain-containing protein</i>	ENSG00000278263	9	0	114,42
A0A8C0M6I3	<i>Complement C8 gamma chain</i>	C8G	1	1	6,59
A0A8C0M9Q8	<i>Ig-like domain-containing protein</i>	ENSG00000278263	12	0	148,59
A0A8C0MLK2	<i>hydroxyisourate hydrolase[...]</i>	LOC489647	4	4	44,36
A0A8C0MM38	<i>CD164 molecule</i>	CD164	1	0	6,47
A0A8C0MN59	<i>Serotransferrin</i>	TF	57	0	954,02
A0A8C0N4N9	<i>Ankyrin repeat domain 11</i>	ANKRD11	2	1	5,50
A0A8C0N9F1	<i>APC regulator of WNT signaling pathway (Adenomatosis Polyposis Coli Tumor Suppressor)</i>	APC	6	6	41,99
A0A8C0NVP3	<i>Complement C1s (C1 Esterase)</i>	C1S	34	5	278,75
A0A8C0NZI0	<i>Integral membrane protein 2 (Single-pass type II membrane protein)</i>	C13orf44/SMIM2	1	0	5,76
A0A8C0P1Y7	<i>CCDC144C-like coiled-coil domain- containing protein</i>	CCDC144C	2	2	12,57
A0A8C0PBJ1	<i>Perilipin 4</i>	PLIN4	3	0	13,93
A0A8C0SKL5	<i>Amine oxidase[...]</i>	MAOB	1	0	5,17
Q70Z88	<i>Olfactory receptor 16 Subfamily C Member 11</i>	OR16C11	2	1	19,66

Proteínas que foram diferencialmente abundantes entre os tratamentos com um escore de confiança ≥ 2 foram usados para análise de ontologia gênica e foram categorizados de acordo com processos biológicos, componente celular e função molecular. Neste trabalho serão explorados quatro sistemas de cada categoria, estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Escores de significância (expresso em $-\log_2$ do valor-P), principais categorias e identificação associada de acordo com a Ontologia Gênica (G.O.), número de genes identificados (total de genes enriquecidos) associados com as diferenças de abundâncias de peptídeos em cães alimentados com dietas experimentais contendo diferentes teores de proteína.

Escore	Categoria/Nome associado à Ontologia Gênica	Número de Genes (Total Genes)
Processo Biológico		
15,31	<i>Complement Activation, Classical Pathway</i>	3 (110)
9,30	<i>Regulation of Iron Ion Transport</i>	1 (3)
9,30	<i>Biotin Metabolic Process</i>	1 (3)
7,85	<i>Innate Immune Response</i>	3 (651)
Componente Celular		
14,13	<i>Blood Microparticle</i>	3 (145)
7,05	<i>Extracellular Region</i>	5 (2553)
6,50	<i>Endosome Membrane</i>	2 (307)
5,02	<i>Cytoplasmic Microtubule</i>	1 (59)
Função Molecular		
9,30	<i>Iron Chaperone Activity</i>	1 (3)
8,89	<i>Aliphatic Amine Oxidase Activity</i>	1 (4)
7,43	<i>Transferrin Receptor Binding</i>	1 (11)
7,19	<i>Protein Kinase Regulator Activity</i>	1 (13)

A partir da ontologia gênica e das análises de enriquecimento funcional, as vias metabólicas (*pathways*) foram agrupadas de acordo com as principais fontes de dados disponíveis (*KEGG, Reactome, QIAGEN Ingenuity Pathway Analysis, NCBI BioSystem Database*, dentre outros), com base na similaridade nos genes identificados por meio dos peptídeos diferencialmente abundantes. As cinco principais vias metabólicas para os 20 peptídeos identificados que apresentaram abundâncias diferencialmente significativas para o efeito tratamento, são apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Escores de significância (expressos em $-\log_2$ do valor-P) nome e número de genes diferencialmente expresso (total de genes) associados às cinco principais vias metabólicas (Pathways) identificados para o efeito de grupo genotípico cães alimentados com dietas experimentais contendo diferentes teores de proteína.

Escore	Nome da via metabólica (Pathways)	Total de genes	N. genes Identificados	Genes
11,46	<i>Immune Response Lectin Induced Complement Pathway</i>	53	2	C1S, C8G
11,01	<i>Overlap Between Signal Transduction Pathways Contributing to LMNA Laminopathies</i>	62	2	MAOB, APC
7,19	<i>Dopamine Metabolism</i>	13	1	MAOB
7,19	<i>Degradation of GABA</i>	13	1	MAOB
6,89	<i>Regulation of Wnt / B-catenin Signaling By Small Molecule Compounds</i>	16	1	APC

7. DISCUSSÃO

Para a grande maioria dos nutrientes essenciais existem faixas de consumo dentro das quais mecanismos fisiológicos e bioquímicos mantêm homeostase sem consequências negativas. No entanto, existem limites inferior e superior para esses processos, e ingestões fora destas faixas terão efeitos adversos ao organismo. Desde que dentro destas variações, o corpo tem a capacidade de ajustar a absorção, catabolismo e/ou excreção de nutrientes para manter um funcionamento apropriado. A controvérsia surge, no entanto, sobre quais são os verdadeiros limites destas faixas - isto é, a ingestões mínima ou máxima dentro das quais variações na dieta, a ingestão de energia e de nutrientes específicos podem ocorrer sem consequências patológicas ou comportamentais e que contribui para o melhor desempenho do organismo (SCRIMSHAW & YOUNG., 1989).

O presente estudo foi conduzido para investigar o efeito do consumo de dietas com diferentes teores de PB no organismo de cães adultos saudáveis através de três abordagens, sendo: proteômica, perfil de AA no plasma e na urina e composição corporal, sendo, até o momento, o primeiro estudo que utilizou a proteômica para avaliar diferentes teores proteicos na dieta de cães adultos saudáveis.

7.1. ANIMAIS E CONSUMO, PESO CORPORAL, ESCORE DE CONDIÇÃO CORPORAL E COMPOSIÇÃO CORPORAL, DIGESTIBILIDADE DAS DIETAS

A necessidade de proteína de uma dieta, na verdade, representa a necessidade de AAE e AANE, na quantidade adequada para manter o fornecimento de nitrogênio e proteínas para o organismo, que então poderá sintetizar AANE e outros compostos nitrogenados (LAFLAMME, 2008). Os AA derivados da dieta podem ser usados pelos organismos de diferentes formas, como: incorporados a proteínas estruturais e enzimáticas, síntese de AANE, conversão para moléculas sinalizadoras, como hormônios e neurotransmissores e usados como uma fonte de energia (OBERBAUER & LARSEN, 2021).

As duas dietas utilizadas no estudo atenderam os requerimentos de proteína e AA indicado pelos principais guias nutricionais, como pode ser visto comparando os dados das tabelas 01 e 02. Foi visto uma diferença significativa na ingestão, tornando possível a comparação entre os resultados das amostras coletadas durante o estudo.

Para que ocorra a síntese de proteínas no organismo é necessário que os AA estejam disponíveis, sendo a principal fonte o catabolismo das proteínas endógenas, principalmente da massa magra. A proteína dietética provém apenas uma fração dos AA, mas é crítica para o bom funcionamento do organismo (LAFLAMME, 2008). O consumo inadequado de proteína reduz o turnover proteico, mas esse mecanismo só poupa as reservas musculares por um período, sendo que uma restrição proteica a longo prazo acaba afetando a composição corporal do organismo, com redução da massa magra (LAFLAMME, 2008). Após análise do peso corporal, ECC e composição corporal pela técnica de água marcada com deutério, vimos que cães adultos saudáveis após consumo de dietas P 23 (59,31 gPB/Mkcal) e P30 (75,65 gPB/Mkcal) e adequado balanço de AA, conseguem manter o balanço entre massa magra e massa gorda, sem mobilização excessiva de proteínas endógena.

Em estudo realizado com 30 cães adultos saudáveis após consumo de alimentos comerciais com 18,99%; 25,34% e 45,77% de PB por 90 dias, não foi visto diferença no PC dos animais (EPHRAIM *et al.*, 2020). Uma pesquisa que avaliou não somente o teor de proteína, mas também diferentes fontes de proteína, foi visto que o perfil dos AA influencia a composição corporal, pois cães que consumiram dietas com glúten de milho como fonte exclusiva de proteína, apresentaram redução na massa corporal magra, quando comparado com cães que consumiram dietas com o mesmo

teor de proteína, mas com a inclusão da farinha de vísceras de aves como fonte de proteína (WAKSHLAG *et al.*, 2003). Um estudo que avaliou a composição corporal de cães antes e após a castração comparando dietas com teores de proteína diferentes sendo: 59,7g de proteína por Mkal e 94g de proteína /Mkal encontrou aumento na massa gorda após a castração com o consumo do menor teor proteico, mesmo sem alteração no PC (KAWAUCHI *et al.*, 2017).

Para uma avaliação adequada do teor proteico e de aminoácido de uma dieta, geralmente se leva em consideração a digestibilidade do alimento, sendo essa afetada não somente pelas características dos ingredientes, mas também pelos parâmetros durante o processo de fabricação (SHOVELLER *et al.*, 2018). Neste estudo foram utilizados os mesmos ingredientes para as duas dietas, bem como foram controlados os parâmetros de processo. Desse modo acredita-se que o maior CDA da PB encontrado na dieta P 30 não seja real, e sim uma consequência da influência da maior ingestão total do nutriente sobre o método utilizado de estimativa aparente da digestibilidade.

7.2. PERFIL DE AMINOÁCIDOS PLASMATICOS E URINÁRIO

Os AA encontrados no sangue são resultado da digestão de refeições, degradação das proteínas e síntese endógena (OBERBAUER & LARSEN, 2021). Em mamíferos a homeostase dos AA a nível celular é regulada por 6 mecanismos, sendo: entrada, reabsorção, metabolismo, síntese de AANE, síntese de proteínas e quebra de proteínas. Esses processos funcionam em conjunto com elementos regulatórios que respondem as concentrações de AA e seus metabólitos (BRÖER & GAUTHIER-COLES, 2021).

As concentrações de AA no plasma são mantidas relativamente constante no estado pós-absortivo de adultos saudáveis, mesmo em condições de restrição proteica (WU *et al.*, 2009; BRÖER & BRÖER, 2017). O controle dos níveis plasmáticos de AA segue os mesmos princípios da homeostase celular, sendo as funções dividida entre os órgãos: entrada (intestino) e reabsorção (rim) através de transportadores de peptídeos e AA; biossíntese e degradação de AA (todos os órgãos, ciclo da ureia no fígado); biossíntese e degradação de proteínas (principalmente muscular) e regulação da ingestão e metabolismo de proteínas por hormônios metabólicos e pelo sistema nervoso central (BRÖER & BRÖER, 2017).

Os cães conseguem se adaptar a dietas com baixos teores de proteínas, aumentando o consumo de alimentos e reduzindo o catabolismo de AA. Já em dietas com elevados teores de proteína, inicialmente ocorre a redução no consumo e depois ocorrerá a regulação das enzimas do catabolismo proteico (LI *et al.*, 2023).

Neste trabalho vimos que mesmo havendo uma diferença na ingestão dos AA pelos cães, não houve diferença significativa entre a concentração plasmática dos AA em amostras coletadas após jejum alimentar de 12 horas, de cães que consumiram dietas com 59,31gPB/Mkcal e 75,65gPB/Mkcal. Dados que corroboram com estudo realizado com cães adultos e geriátricos submetidos a dietas comerciais com diferentes teores de proteína, sendo: 36,74g/Mkcal (16% PB), 53,84g/Mkcal (24% PB) e 69,12g/Mkcal (32% PB), e no qual a concentração plasmática dos AA foi a mesma independente do teor de proteína, os autores atribuem esse resultado ao protocolo experimental empregado, no qual a coleta foi feita antes da primeira refeição, ou seja, os cães estavam em jejum alimentar. Isso pode ser explicado pelo fato de a taxa de degradação dos AA aumentar com a elevação na concentração plasmática dos AA, devido a elevada atividade de enzimas, usadas para manter as concentrações séricas de AA estável (WILLIAMS *et al.*, 2001).

Em ratos alimentados com dietas contendo 6 e 24% de proteína por 7 a 10 dias, a concentração plasmática de AA foi praticamente igual, com exceção da glicina e serina que dobraram após consumo da dieta com menor teor proteico (KALHAN *et al.*, 2011). Em um estudo feito com camundongos, a redução na absorção intestinal de AA e peptídeos, não reduziu ou aumentou os níveis plasmáticos dos AA (NÄSSL, *et al.*, 2011; JIANG *et al.*, 2015). Estudo em humanos também evidenciaram uma regulação fina na concentração plasmática de AA, sendo observado um aumento somente em mensurações pós-prandiais em dietas elevas em teor proteico (1,5gPB/kg PC) (MILSOM *et al.*, 1979) Em humanos, tanto o jejum de curto prazo quanto o jejum de longo prazo, causam apenas alterações modestas na concentração plasmática dos AA (BRÖER & BRÖER, 2017).

Um elemento importante da homeostase dos AA é feito no córtex renal, através da filtração, quando alguns AA são eliminados e reabsorvidos. Em humanos, por dia, são perdidos 17g de AA urinários, na forma de ureia, amônia e creatinina. A quantidade de ureia aumenta à medida que aumenta o teor de proteína dietética, além do essencial para reposição, ou quando os AA são usados para gliconeogênese (BRÖER & GAUTHIER-COLES, 2021)

Neste trabalho embora o teor de PB e de AA tenha aumentado entre uma dieta e outra, não foi o suficiente para causar alteração significativa na concentração de AA na urina de cães adultos saudáveis.

Na área de animais de companhia a análise de concentração plasmática de AA vem sendo utilizada em estudos de cães e gatos com doença renal crônica (PARKER *et al*, 2018; BRUNETTO *et al*, 2021; LIPPI *et al*, 2022). Parker *et al*. (2018) avaliaram o status dos AA plasmáticos de cães diagnosticados com nefropatia com perda de proteína (PLN) e concluíram que cães com PLN têm concentração de AA alterada em comparação com cães saudáveis sendo necessária uma suplementação de certos AA em cães com essa doença.

Já o estudo de Brunetto *et al*. (2021), avaliou as concentrações séricas e urinárias de AA em cães saudáveis e com doença renal crônica (DRC) alimentados com uma dieta comercial de prescrição com níveis reduzidos de proteína e fósforo. Também foi encontrada diferença significativa na concentração plasmática e urinária de cães doentes e saudáveis, ressaltando a importância de adequar a oferta de AA em cães com doença renal crônica.

Na mesma linha de estudos, LIPPE *et al*. (2022) pesquisaram em cães as concentrações plasmáticas dos AAE e AANE com doenças renal crônica em diferentes estadiamento da doença, e a relação com anormalidade de cálcio e fósforo, acidose metabólica e a síndrome de perda de proteína-energia (PEW). No estudo, os níveis séricos de histidina, isoleucina, triptofano, alanina, cisteína e serina, foram significativamente mais baixos em cães com doença renal crônica, ao mesmo tempo que os de prolina, leucina, lisina, valina, arginina, ácido glutâmico e glicina, foram significativamente maiores quando comparados com os cães saudáveis. Os autores sugerem que essas diferenças podem ser atribuídas as condições patológicas presentes, como inflamação, resistência insulina e aumento da degradação de proteínas, mas dentre as diferentes complicações da DRC a PEW pareceu ser a que mais altera o perfil de aminoácido sérico dos cães, causando uma redução tanto dos AAE quanto dos AANE.

Um estudo retrospectivo relacionado a doença inflamatória intestinal (IBD) também usou a técnica de análise da concentração de AA séricos de cães, determinando a concentrações séricas de AA em cães com enteropatia perdedora de proteínas (EPP) e a sua correlação com variáveis clínicas e laboratoriais. Através das análises dos resultados foi encontrado que as concentrações séricas de triptofano

diminuíram significativamente em cães com EPP em comparação com cães saudáveis, não havendo diferença para os demais AA. Os autores concluíram que a diminuição da concentração sérica de triptofano pode ser consequência da doença ou pode desempenhar um papel na patogênese da EPP em cães (KATHRANI, *et al* 2018).

7.3. ANÁLISE PROTEÔMICA

O termo proteômica se refere ao estudo das proteínas de forma ampla, no qual envolve a função e a estrutura das proteínas, já o termo proteoma, refere-se ao conjunto de proteínas expressas por um material genético sobre condições específicas (CECILIANI *et al.*, 2014). A aplicação desta técnica vem crescendo dentro da medicina veterinária, mas estudos em animais de companhia são mais escassos do que os com animais de produção (FERNANDES, 2016). Em uma revisão feita por GONZALEZ-AROSTEGUI *et al.* (2022), quarenta e quatro artigos que usaram a proteômica como técnica analítica em cães foram incluídos, sendo oito em cães saudáveis e trinta e seis em cães com algum tipo de patologia. Os autores afirmam que o uso da proteômica em cães pode levar à detecção de novos biomarcadores e esclarecer ou descobrir novas vias fisiopatológicas. Já estudos relacionados a nutrição dos animais de companhia, que usaram a proteômica, são escassos. Após busca em diferentes plataformas de publicação foi encontrado um artigo em gatos, que se trata de um estudo piloto, que realizou análise de proteômica na urina de gatos alimentados com um alimento completo de teor proteico de 60,3% na matéria seca, com e sem suplementação de arginina, ornitina e zeolita (PAßLACK *et al.*, 2022).

No presente trabalho foram identificadas 20 proteínas diferentemente abundantes, sendo que algumas serão discutidas de forma mais detalhada, podendo ser somente a proteína, ou categorizada em processo biológico, componente celular ou função molecular, como também serão discutidas algumas proteínas relacionada a uma via metabólica.

A *transferrin*, *transferrin-like domain-containing protein*, *serotransferrin* (Tabela 08) foram proteínas diferencialmente abundantes, fazem parte do processo biológico, *Regulation of Iron Ion Transport*. Já na categoria componente celular fazem parte de *Blood Microparticle* e *Extracellular Region* e na categoria função molecular participa de *Iron Chaperone Activity* e *Transferrin Receptor Binding* (Tabela 10), sendo que foram reguladas positivamente no alimento P 23.

O ferro é um mineral essencial para o organismo, necessário para a função de muitas enzimas e proteínas (HOWER *et al.*, 2009, RICHARDSON *et al.*, 2010). Algumas das proteínas que precisam do ferro para seu funcionamento são: a hemoglobina e mioglobina, importante para o transporte de oxigênio no organismo, citocromas necessárias, tanto para respiração, quanto para desintoxicação, além da aconitase e outras proteínas, utilizadas no metabolismo oxidativo. O metabolismo do ferro é altamente regulado, tanto a nível do organismo, quanto a níveis celulares (HOWER *et al.*, 2009).

Para manter a homeostase do ferro, os mecanismos que regulam a absorção e distribuição, são mais desenvolvidos do que os que regulam a excreção. Nesses processos diversas células, hormônios e proteínas transportadoras, derivadas do ferro estão envolvidas (GROTTO., 2008). Sob condições fisiológicas normais, o ferro é transportado no sangue pela transferrina diférrica (Tf), que também é responsável pelo transporte do ferro entre as células. A Tf pode ser encontrada no plasma sanguíneo, no líquido intersticial, na linfa e no líquido cefalorraquidiano, garantindo que o ferro permaneça solúvel impedindo que participe de reações de oxidação (SILVA *et al.*, 2021).

A transferrina é sintetizada essencialmente no fígado, mas pode ocorrer em outros tecidos como macrófagos, linfócitos e fibroblastos. Os níveis de Tf estão relacionados a taxa metabólica e tamanho corporal, e sua expressão é regulada pela concentração do ferro, sendo estimulada na deficiência de ferro e bloqueada quando está em excesso. A redução da absorção intestinal de ferro reduz a produção de Tf, esgotando a quantidade no plasma (GROTTO, 2008).

Além de ser responsável pelo transporte do ferro e outros minerais no organismo, alguns autores relatam que a Tf pode ter uma importante função antimicrobiana (SANDRINI *et al.*, 2010; AJAYI *et al.*, 2024). O ferro é um nutriente essencial para o crescimento de quase todas as bactérias, assim um ambiente com baixo teor de ferro restringe o crescimento de microrganismos patogênicos. Devido à sua alta afinidade para ligação de ferro, a Tf reduz a concentração de ferro livre no soro, criando assim um ambiente com baixo teor de ferro e pouco propício para a proliferação bacteriana, levando a Tf a ter um papel na imunidade através de um mecanismo de defesa primário e não específico (SANDRINI *et al.*, 2010; AJAYI *et al.*, 2024).

Elementos solúveis que impedem o crescimento de microrganismos facilitam a imunidade humoral intrínseca em casos de inflamação, esse mecanismo é muito

estudado em peixes. Um grupo de pesquisa relatou um aumento na expressão de Tf em truta arco-íris que foram infectadas por bactérias. Em outro experimento, infectaram tilápia com *Streptococcus agalactiae* e foi observado que o ferro era deficiente no soro da tilápia infectada, além de um aumento substancial na regulação da transferrina expressa (AJAYI *et al.*, 2024). Com o uso da espectrometria de massa, pesquisadores da Califórnia e Suécia descreveram as proteínas encontradas na pele de tubarões, dentre elas a *Transferrin-like domain-containing protein* e a *Serotransferrin*, e as classificaram nos grupos biológicos relativos à imunidade e comunicação celular. Estes autores relatam a importância destas proteínas na ativação do sistema imune atribuindo sua presença pelo dos tubarões a um mecanismo de defesa antimicrobiano, já que o ferro é um elemento escasso nas águas marinhas (BACHAR-WIKSTROM *et al.*, 2024).

Sandrini *et al.*, (2010) estudaram a relação entre hormônios do estresse e aumento nos quadros de sepsis ou infecções, principalmente em pessoas hospitalizadas. As catecolaminas, epinefrina, norepinefrina e dopamina, são capazes de formar complexos com Tf e Lf (lactoferrina). Uma vez ligada a dopamina, a Tf não age mais como um carreador de ferro deixando-o disponível para as bactérias, reduzindo significativamente sua ação antimicrobiana.

Não foram identificados estudos correlacionando consumo de proteína e a expressão do gene Tf. Um trabalho em cães avaliou a Tf como um possível marcador do status nutricional, por meio da mensuração das concentrações plasmáticas de Tf em cães desnutridos antes e após o tratamento nutricional. A conclusão deste trabalho sugere que o monitoramento da concentração plasmática de Tf, além da análise de albumina, PC e ECC pode ser útil na avaliação do estado nutricional e prognóstico durante o tratamento nutricional em cães, pois as concentrações plasmáticas de Tf foram significativamente maiores depois da intervenção nutricional, quando comparado ao período anterior. Os autores não atribuíram essa diferença a nenhum nutriente específico (NAKAJIMA *et al.*, 2013).

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é considerado como um dos principais neurotransmissores inibitórios desde sua descoberta, sendo sua principal fonte no cérebro a conversão enzimática de glutamato (YOON *et al.*, 2014, WUHYUN *et al.*, 2023). Por meio de uma enzima expressa em determinados tipos de neurônios, certa concentração de GABA pode ser encontrada em regiões como os astrócitos. Nos astrócitos, o GABA é majoritariamente sintetizado pela descarboxilação do glutamato ou pela degradação da putrescina. A degradação de putrescina é mediada por duas

enzimas oxidativas distintas: monoamina oxidase B (MAO-B) e diamina oxidase (DAO). A MAO-B é expressa sobretudo em astrócitos e em um subconjunto de neurônios serotoninérgicos (WUHYUN *et al.*, 2023)

As monoaminas oxidases (MAOs) que estão localizadas na membrana externa das mitocôndrias são enzimas que catalisam a desaminação oxidativa de aminas biogênicas (CHO *et al.*, 2021). Podem ser classificadas como duas isoenzimas, a MAO-A e a MAO-B, com diferentes especificidades de substrato (CHO *et al.*, 2021). As MAOs desempenham um papel relevante no metabolismo de monoaminas neuroativas, como a dopamina (DA), norepinefrina, serotonina e melatonina. A rápida degradação das monoaminas cerebrais, como dopamina e norepinefrina, é essencial para o bom funcionamento da neurotransmissão sináptica (BORTOLATO *et al.*, 2008). No cérebro de roedor, a degradação de DA é feita principalmente pela MAO A, já a MAO B desempenha um papel importante neste processo em humanos e outros primatas.

Com relação ao sítio de expressão ambas ocorrem na maioria dos tecidos e órgãos periféricos, a MAO A é predominante em fibroblastos e tecido placentário, enquanto a MAO B é a única isoforma presente em plaquetas e linfócitos (BORTOLATO *et al.*, 2008; CHO *et al.*, 2021). Por estarem envolvidas no metabolismo de GABA e aminas como a dopamina as MAOs são citadas em estudo relacionados a doenças cognitivas como o Parkinson (CHO *et al.*, 2021, WUHYUN *et al.*, 2023)

No presente trabalho a proteína *amine oxidase*, expressa pelo gene MOAB (Tabelas 08 e 09) e parte da função molecular *Aliphatic Amine Oxidase Activity*, tem participação nas rotas metabólicas, *Dopamine Metabolism*, *Degradation of GABA* e *Overlap Between Signal Transduction Pathways Contributing to LMNA Laminopathies* (Tabela 10). A proteína *amine oxidase* apresentou maior abundância após o consumo da dieta com maior teor de proteína. Estes achados são interessantes pois não corroboram com um estudo feito em humanos, no qual foi visto que houve uma redução significativa na expressão de MAOB plaquetária após o consumo de uma dieta com teores elevados de proteína consumida por 3 semanas. Entretanto o estudo não descreve a razão na redução desta expressão com o consumo de proteína (ZELLNER *et al.*, 2011).

O *pathway Immune Response Lectin Induced Complement* apresentou elevada significância (FDR=2,12E-02) nas análises de enriquecimento. O gene C1S que codifica a proteína *Complement C1s* foi relacionado a outro gene envolvido nesta via metabólica, o gene C8G que codifica a proteína *Complement C8 gamma chain* (Tabela

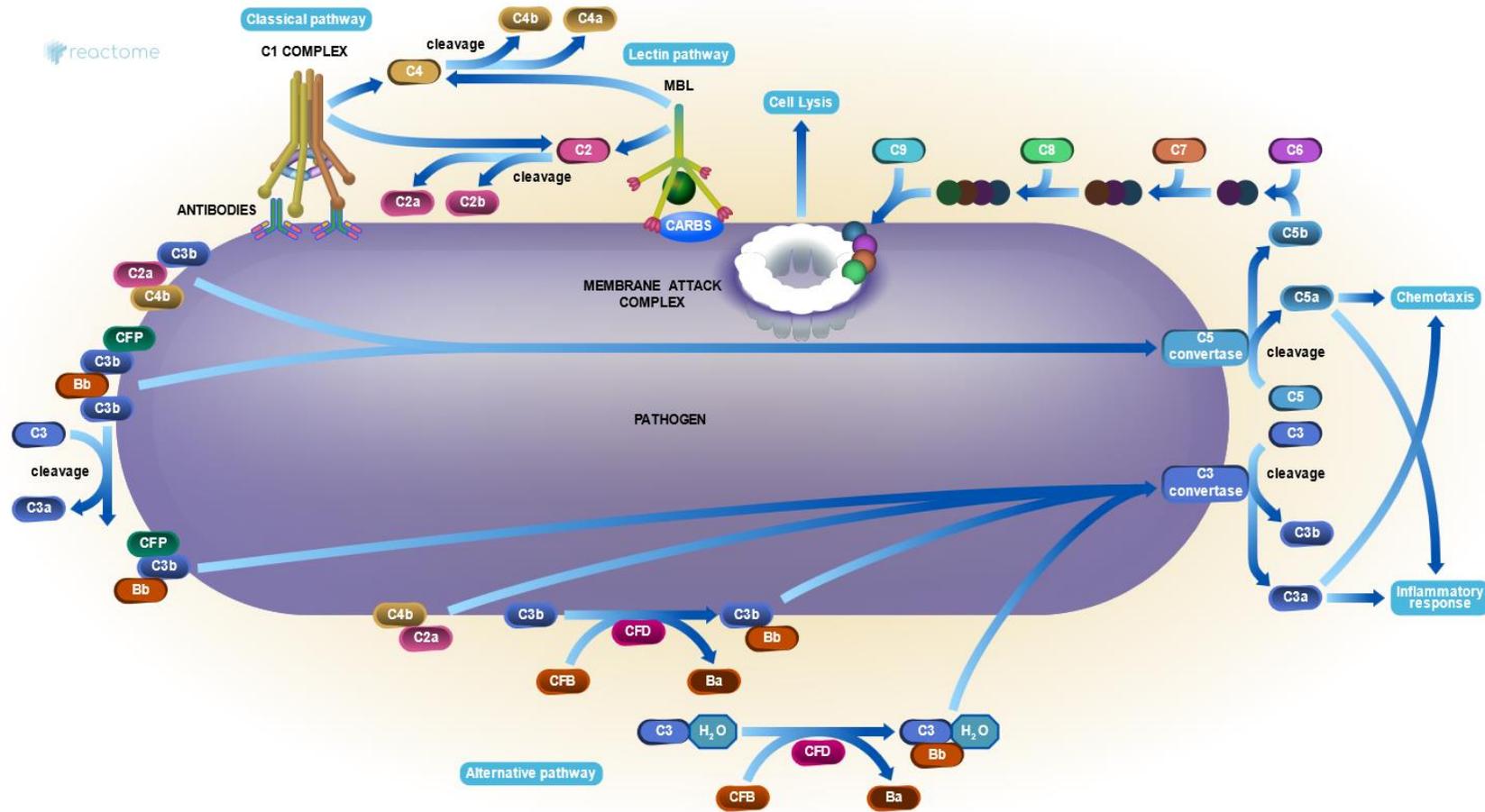
11). O sistema complemento consiste em uma cascata enzimática composta por um conjunto de proteínas do sangue e da superfície celular que auxiliam os anticorpos na eliminação de patógenos de um organismo. O sistema complemento tem quatro funções principais, incluindo lise de organismos infecciosos, ativação de inflamação, opsonização e depuração imunológica. O sistema complemento contém 30 proteínas diferentes, incluindo proteínas séricas, proteínas serosas e receptores de membrana celular. As proteínas do sistema complemento circulam na corrente sanguínea em estado inativo, sendo uma parte importante do sistema imunológico inato.

Quando acionada, a cascata do complemento gera enzimaticamente moléculas ativas (como C3/C5 convertases) e efetores biológicos: opsoninas (C3b, C3d e C4b), anafilatoxinas (C3a e C5a) e C5b, que inicia a montagem do complexo de ataque à membrana lítica (MAC). Três ramos levam à ativação do complemento: as vias clássicas; a via da lectina e a via alternativa (KANG *et al.*, 2009; RICKLIN *et al.*, 2010). A via clássica do complemento é desencadeada quando o complexo anticorpo-antígeno interage com o complexo C1, que consiste em C1q, duas moléculas de C1r e duas moléculas de C1s. O complexo C1 cliva C2 e C4, que então formam a C3 convertase (C4b2a). C3 é então clivado pela C3 convertase e forma C5 convertase em associação com C4b e C2a. A geração da C5 convertase é o fim da via clássica. A via da lectina é estimulada quando a lectina ligadora de manose (MBL) se liga a resíduos de manose na superfície do patógeno. As serina proteases associadas à MBL, MASP-1 e MASP-2, são ativadas e clivam C4 e C2, que então formam a C3 convertase como na via clássica, são vias muito semelhantes. A via alternativa é ativada espontaneamente pela hidrólise do grupo tioéster de C3 para dar C3(H₂O). Essas três vias tem uma via terminal em comum, chamada de cascata complemento terminal, que leva a formação do complexo lítico de membrana (CLM), como pode ser visto na figura 02 (XIE *et al.*, 2020). O CLM é formado após a ativação de C5, C6, C7, C8 e C9, após sua formação, insere-se na membrana alvo, causando alterações na estrutura e função da membrana celular, levando a saída de material citoplasmático e entrada de líquido e sais, levando ao rompimento das membranas por lise osmótica.

No presente estudo as proteínas C1s e C8G, associadas aos processos biológicos, *Complement Activation Classical Pathway e Innate Immune Response* (Tabela 10), apresentaram maior abundância após o consumo do tratamento com menor teor de proteína. A alimentação tem papéis amplos e específicos na regulação das funções imunológicas. A proteína sempre foi considerada um nutriente importante

para manutenção do sistema imune, sendo o esperado uma maior abundância de proteínas relacionadas a esse sistema após o consumo do tratamento com o teor de proteína maior. Uma possível explicação para os achados do estudo é que, o consumo de carboidratos de alto índice glicêmico pode levar ao aumento da formação de produtos de glicação avançada (VAN DER LUGT *et al.*, 2018), aumento de proteínas pró-inflamatórias, e uma resposta imunológica desregulada. Além disso, sabe-se que polissacarídeos e complexos polissacarídeo-proteína desempenham papéis específicos no aumento ou ativação das respostas imunológicas dos macrófagos e o sistema complemento, sendo que a dieta com o menor teor de proteína, teve maior teor de amido (FABREGAT *et al.*, 2023).

Figura 02. Diagrama com as principais vias de ativação do sistema complemento, vias clássica, da lectina e alternativa.



Fonte: Reactome. Citation Accessed on Tue Oct 17 2023.

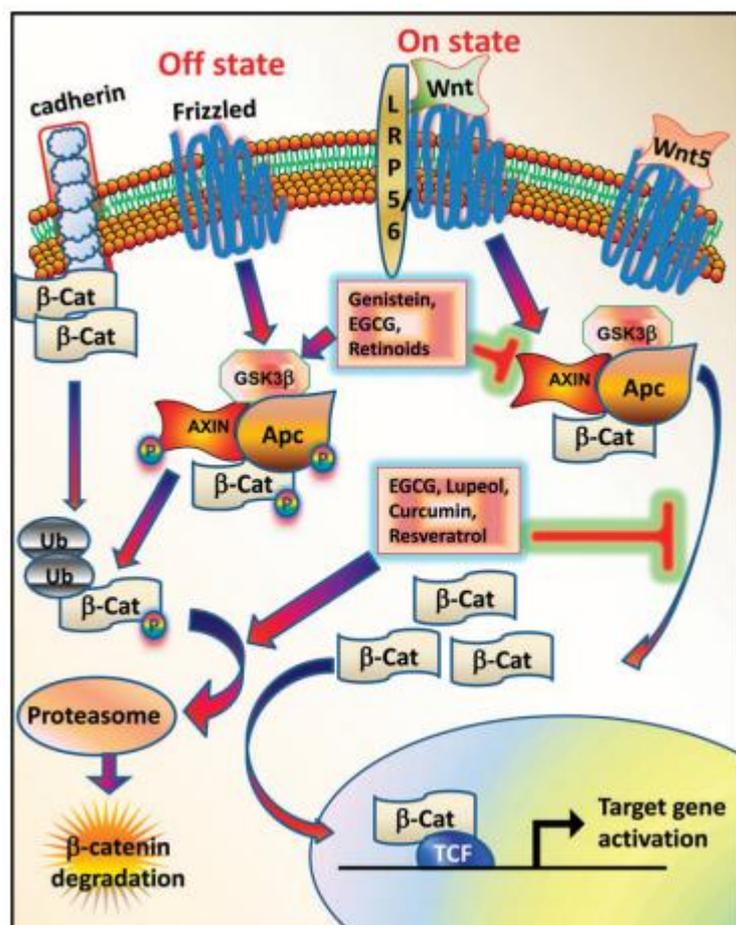
A proteína *APC regulator of WNT signaling pathway* (Adenomatosis Polyposis Coli Tumor Suppressor), expressa pelo gene APC (Tabela 08), apresentou maior abundância nos cães que consumiram a dieta P 23. Essa proteína participa da via metabólica *Overlap Between Signal Transduction Pathways Contributing to LMNA Laminopathies* e *Regulation of Wnt/ B-catenin Signaling by Small Molecule Compounds* (Tabela 11). Com relação a sua função biológica está presente na via *Cytoplasmic Microtubule* e com relação a função molecular, tem papel na *Protein Kinase Regulator Activity* (Tabela 10). Acredita-se que a proteína APC tenha diferentes funções, algumas ainda não bem esclarecidas, porém, sabe-se que é um importante regulador do turnover da β -catetina (KIMELMAN & XU., 2006). A β -catetina é um componente essencial da via *Wnt/ β -catenin*, sendo importante para o desenvolvimento e homeostase de diversos tecidos (BROUSSARD *et al.*, 2009).

Em humanos e ratos as proteínas *Wnt* (Wingless/Integration) são um grupo de 19 glicoproteínas, que através de uma via metabólica regulam diversos processos celulares, tais como, determinação do destino celular durante o desenvolvimento embrionário, proliferação de células, controle da divisão celular assimétrica, apoptose e homeostase tecidual. Existem pelo menos três vias *Wnt* diferentes: a via canônica, a via da polaridade celular planar (PCP) e a via *Wnt/Ca²⁺*. Na via canônica de *Wnt*, o seu principal efeito é na ligação do *Wnt* ao seu receptor celular e a estabilização do β -catetina citoplasmática (KIMELMAN & XU., 2006).

Essa via metabólica é bastante descrita em publicações relacionadas ao desenvolvimento de tumores, como melanoma, câncer de colorretal e no fígado, pois acredita-se que a desregulamentação da sinalização da via *Wnt/ β -catetina* está relacionada a gênese de vários tipos de câncer (BROUSSARD *et al.*, 2009; TARAPORE *et al.*, 2011). Normalmente os níveis de β -catetina no citoplasma são mantidos baixos, através da regulação contínua do proteossoma, por meio do complexo de degradação. Fazem parte deste complexo de degradação as proteínas, APC, Axina, Casein Kinase 1 α (CKI α) e glycogen synthase kinase 3 β (GSK3 β). Após a ativação da via canônica de *Wnt*, a β -catetina citoplasmática não é mais fosforilada pelo complexo de degradação, possibilitando seu acúmulo no citoplasma. A β -catetina pode se deslocar para o interior do núcleo celular, onde se liga aos fatores de transcrição *T-cell specific trasncription factor/lymphid enhancer-binding factor-1* (TCF/LEF1). Essa ligação da β -catetina com TCF/LEF1 ativam a transcrição de genes alvo da via da célula específica

do tecido que faz parte. Na figura 03, podemos ver a ativação (“on state”) da via Wnt/ β -catetina, com a ligação da glicoproteína WNT no receptor celular e o estado inativo “off state” no qual o complexo de degradação é ativo (MOON, 2005; BROUSSARD *et al.*, 2009; TARAPORE *et al.*, 2011).

Figura 03. Via Wnt/ β -catetina



Fonte: Adaptado de Tarapore *et al.*, 2011

Após pesquisa por estudos que demonstrassem alguma correlação entre a nutrição e a expressão da proteína APC, foram encontradas pesquisas sobre o efeito de compostos naturais na prevenção de doenças neoplásicas e neurodegenerativas, além de suplementação de fibra e consequente modulação de inflamação na mucosa retal (MALCOMSON *et al.*, 2021, TARAPORE *et al.*, 2011; SFERRAZZA *et al.*, 2019). Alguns dos compostos citados são: curcumina, quercetina, berberina e ginsenosídeos, por serem moduladores da sinalização Wnt/ β -catetina e como possíveis candidatos para o desenvolvimento de medicamentos para o câncer (SFERRAZZA *et al.*, 2019). Já outro

estudo em humanos saudáveis, suplementados com amido resistente e/ou polidextrose e placebo por 50 dias, avaliou a relação entre o potencial inflamatório de dieta e a expressão de compostos da via Wnt/b-catenina. Como resultado, viram que os genes FOSL1 e WNT11, foram mais expressos nos indivíduos que apresentaram maior grau de inflamação. Os demais compostos, como a proteína APC não foi afetado pelo grau de inflamação, diferente do que foi visto em uma pesquisa feita em ratos, na qual, a inflamação induzida por dietas ricas em gordura, foi associada a regulação negativa do gene APC em tecidos do colón retal (MALCOMSON *et al.*, 2021).

O crescimento populacional humano e dos animais, sejam de produção ou companhia, levam a uma maior demanda por alimento, sendo a proteína um nutriente essencial para a vida, deve estar presente na dieta. Além de assegurarmos a oferta de proteína adequada, temos que pensar no meio ambiente e os impactos que a produção, consumo e excreção podem gerar. O teor apropriado de proteína e o perfil de AA para um cão adulto saudável é tema de muitos estudos, que utilizam diversas metodologias, os resultados deste trabalho contribuem para o entendimento dos efeitos de dietas com teores proteicos diferentes, bem como o metabolismo de AA plasmáticos e urinários e perfil proteico no soro de cães adultos saudáveis. Mediante esses resultados vemos que ainda há um longo caminho a se percorrer principalmente, na área das ciências “ômicas” e seu uso nas pesquisas de nutrição de cães e gatos.

8. CONCLUSÃO

Com os dados deste estudo, conclui-se que não há diferença significativa nas análises de composição corporal, perfil de aminoácidos plasmático e urinário e de proteoma no soro de cães adultos saudáveis após ingestão de alimentos com 23 ou 30% de proteína bruta.

9. REFERÊNCIAS

- AAFCO. (2020) Official Publication. Association of American Feed Control Officials Inc., West Lafayette, IN.
- ACUFF, H.L., DANTON, A.N., DHAKAL, J., KIPROTICH, S., ALDRICH, G., 2021. Sustainability and Pet Food: Is There a Role for Veterinarians? *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.* 51, 563–581. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2021.01.010>
- ALEXANDRATOS, NIKOS; BRUINSMA, JELLE. *World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision.* 2012.
- ALBERTS, BRUCE et al. *Biologia molecular da célula.* Artmed Editora, 2010.
- ALMEIDA, A.M., ALI, S.A., CECILIANI, F., ECKERSALL, P.D., HERNÁNDEZ-CASTELLANO, L.E., HAN, R., HODNIK, J.J., JASWAL, S., LIPPOLIS, J.D., MCLAUGHLIN, M., MILLER, I., MOHANTY, A.K., MRLJAK, V., NALLY, J.E., NANNI, P., PLOWMAN, J.E., POLETI, M.D., RIBEIRO, D.M., RODRIGUES, P., ROSCHITZKI, B., SCHLAPBACH, R., STARIČ, J., YANG, Y., ZACHUT, M., 2021. Domestic animal proteomics in the 21st century: A global retrospective and viewpoint analysis. *J. Proteomics* 241. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2021.104220>
- ALMEIDA, A.M., BASSOLS, A., BENDIXEN, E., BHIDE, M., CECILIANI, F., CRISTOBAL, S., ECKERSALL, P.D., HOLLUNG, K., LISACEK, F., MAZZUCHELLI, G., MCLAUGHLIN, M., MILLER, I., NALLY, J.E., PLOWMAN, J., RENAUT, J., RODRIGUES, P., RONCADA, P., STARIC, J., TURK, R., 2014. Animal board invited review: Advances in proteomics for animal and food sciences. *Animal* 9, 1–17. <https://doi.org/10.1017/S1751731114002602>
- AOAC, (2010) *Official Methods of Analysis*, 16th ed. Association of Analytical Chemists, Washington, DC, USA.
- BARBOSA, E.B., VIDOTTO, A., POLACHINI, G.M., HENRIQUE, T., TROVÓ DE MARQUI, A.B., TAJARA, E.H., 2012. Proteômica: metodologias e aplicações no estudo de doenças humanas. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 58, 366–375. <https://doi.org/10.1590/s0104-42302012000300019>
- BERNERS-LEE, M., KENNELLY, C., WATSON, R., HEWITT, C.N., 2018. Current global food production is sufficient to meet human nutritional needs in 2050 provided there is radical societal adaptation. *Elementa* 6. <https://doi.org/10.1525/elementa.310>
- BILIĆ, P., KULEŠ, J., GALAN, A., GOMES DE PONTES, L., GUILLEMIN, N., HORVATIĆ, A., FESTA SABES, A., MRLJAK, V., ECKERSALL, P.D., 2018.

- Proteomics in Veterinary Medicine and Animal Science: Neglected Scientific Opportunities with Immediate Impact. *Proteomics* 18, 1–7. <https://doi.org/10.1002/pmic.201800047>
- BORTOLATO, Marco; CHEN, Kevin; SHIH, Jean C. Monoamine oxidase inactivation: from pathophysiology to therapeutics. *Advanced drug delivery reviews*, v. 60, n. 13-14, p. 1527-1533, 2008.
- BRINGEL, M., JORGE, P.K., FRANCISCO, P.A., LOWE, C., SABINO-SILVA, R., COLOMBINI-ISHIKIRIAMA, B.L., MACHADO, M.A.D.A.M., SIQUEIRA, W.L., 2020. Salivary proteomic profile of dogs with and without dental calculus. *BMC Vet. Res.* 16, 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02514-0>
- BROUSSARD, Cedric et al. Proteomic analysis of b-catenin activation in mouse liver by DIGE analysis identifies glucose metabolism as a new target of the Wnt pathway. *Proteomics*, v. 9, p. 3889-3900, 2009.
- BRÖER, Stefan; BRÖER, Angelika. Amino acid homeostasis and signalling in mammalian cells and organisms. *Biochemical Journal*, v. 474, n. 12, p. 1935-1963, 2017.
- BRÖER, Stefan; GAUTHIER-COLES, Gregory. Amino acid homeostasis in mammalian cells with a focus on amino acid transport. *The Journal of nutrition*, v. 152, n. 1, p. 16-28, 2022.
- BRUNETTO, Marcio Antonio et al. Evaluation of Serum and Urine Amino Acids in Dogs with Chronic Kidney Disease and Healthy Dogs Fed a Renal Diet. **Metabolites**, v. 11, n. 12, p. 844, 2021.
- BUENO, Y; MUÑOZ, G. SÁEZ, R. T. Implementation of simple techniques for removal majority proteins from blood plasma and its posterior analysis by bi-dimensional (2D). *Rev. Colomb. Quím.*, v. 40, n.2, p.:131-148, 2011
- CASSIDY, E.S., WEST, P.C., GERBER, J.S., FOLEY, J.A., 2013. Redefining agricultural yields: From tonnes to people nourished per hectare. *Environ. Res. Lett.* 8. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/8/3/034015>
- CECILIANI, F., ECKERSALL, D., BURCHMORE, R., LECCHI, C., 2014. Proteomics in Veterinary Medicine: Applications and Trends in Disease Pathogenesis and Diagnostics. *Vet. Pathol.* 51, 351–362. <https://doi.org/10.1177/0300985813502819>
- CERQUETELLA, M., ROSSI, G., SPATERNA, A., TESEI, B., GAVAZZA, A., PENGO, G., PUCCIARELLI, S., SCORTICHINI, L., SAGRATINI, G., RICCIUTELLI, M.,

- MARCHEGIANI, A., VINCENZETTI, S., 2019. Fecal Proteomic Analysis in Healthy Dogs and in Dogs Suffering from Food Responsive Diarrhea. *Sci. World J.* 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/2742401>
- CHO, HYUN-U. et al. Redefining differential roles of MAO-A in dopamine degradation and MAO-B in tonic GABA synthesis. *Experimental & Molecular Medicine*, v. 53, n. 7, p. 1148-1158, 2021.
- CINQUEPALMI, V., MONNO, R., FUMAROLA, L., VENTRELLA, G., CALIA, C., GRECO, M.F., DE VITO, D., SOLEO, L., 2013. Environmental contamination by dog's faeces: A public health problem? *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10, 72–84. <https://doi.org/10.3390/ijerph10010072>
- DAI, W., CHEN, Q., WANG, Q., WHITE, R.R., LIU, J., LIU, H., 2017. Complementary transcriptomic and proteomic analyses reveal regulatory mechanisms of milk protein production in dairy cows consuming different forages. *Sci. Rep.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.1038/srep44234>
- DAY, M.J., 2010. Feature: One health: The small animal dimension. *Vet. Rec.* 167, 847–849. <https://doi.org/10.1136/vr.c6492>
- DJISALOV, M., KNEŽIĆ, T., PODUNAVAC, I., ŽIVOJEVIĆ, K., RADONIC, V., KNEŽEVIĆ, N., BOBRINETSKIY, I., GADJANSKI, I., 2021. Cultivating multidisciplinary: Manufacturing and sensing challenges in cultured meat production. *Biology (Basel)*. 10. <https://doi.org/10.3390/biology10030204>
- DOHERTY, M.K., BEYNON, R.J., 2006. Protein turnover on the scale of the proteome. *Expert Rev. Proteomics* 3, 97–110. <https://doi.org/10.1586/14789450.3.1.97>
- ELANGO, Rajavel; BALL, Ronald O.; PENCHARZ, Paul B. Recent advances in determining protein and amino acid requirements in humans. *British Journal of Nutrition*, v. 108, n. S2, p. S22-S30, 2012.
- EPHRAIM, E., COCHRANE, C.Y., JEWELL, D.E., 2020. Varying protein levels influence metabolomics and the gut microbiome in healthy adult dogs. *Toxins (Basel)*. 12, 1–16. <https://doi.org/10.3390/toxins12080517>
- FEDIAF - The European Pet Food Industry Federation. Nutritional Guidelines for complete and complementary pet food for cats and dogs. The European Pet Food Industry Federation, Bruxelles, 2021
- FERNANDES, M., ROSA, N., ESTEVES, E., CORREIA, M. J., ARRAIS, J., RIBEIRO, P., & BARROS, M. (2016). CanisOme—The protein signatures of *Canis lupus familiaris* diseases. *Journal of proteomics*, 136, 193-201

- FABREGAT A, SIDIROPOULOS K, VITERI G, MARIN-GARCIA P, PING P, STEIN L, D'EUSTACHIO P, HERMJAKOB H. Reactome diagram viewer: data structures and strategies to boost performance. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2018 Apr;34(7) 1208-1214. doi: 10.1093/bioinformatics/btx752. PubMed PMID: 29186351. PubMed Central PMCID: PMC6030826
- GALDOS-RIVEROS, ALVARO CARLOS et al. Proteômica: novas fronteiras na pesquisa clínica. *Enciclopédia Biosfera*, v. 6, n. 11, 2010.
- GANESH, V., HETTIARACHCHY, N.S., 2012. Nutriproteomics: A promising tool to link diet and diseases in nutritional research. *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics* 1824, 1107–1117. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.06.006>
- GHODASARA, P., SADOWSKI, P., SATAKE, N., KOPP, S., MILLS, P.C., 2017. Clinical veterinary proteomics: Techniques and approaches to decipher the animal plasma proteome. *Vet. J.* 230, 6–12. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.10.022>
- GODFRAY, H. Charles J. et al. Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *science*, v. 327, n. 5967, p. 812-818, 2010.
- GONZÁLEZ-AROSTEGUI, Luis Guillermo et al. Proteomics in dogs: a systematic review. *Research in Veterinary Science*, v. 143, p. 107-114, 2022.
- GROSS, K. L.; Yamka, R. M.; Khoo, C.; Friesesn, K. G. Macronutrients. In: HAND, M. S.; THATCHER, C. D.; REMILLARD, R. L.; ROUDEBUSCH P.; NOVOTNY, B. J. (Ed.). *Small Animal Clinical Nutrition*. 5. ed. Kansas: Mark Morris Institute, 2010. p. 49-105.
- GROTTO, Helena ZW. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. *Revista Brasileira de Hematologia e hemoterapia*, v. 30, p. 390-397, 2008.
- GYGI, S.P., ROCHON, Y., FRANZA, B.R., AEBERSOLD, R., 1999. Correlation between Protein and mRNA Abundance in Yeast. *Mol. Cell. Biol.* 19, 1720–1730. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.3.1720>
- HENTZE, MATTHIAS W.; MUCKENTHALER, MARTINA U.; ANDREWS, NANCY C. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *cell*, v. 117, n. 3, p. 285-297, 2004.
- HUMBERT, B., BLEIS, P., MARTIN, L., DUMON, H., DARMAUN, D., NGUYEN, P., 2001. Effects of dietary protein restriction and amino acids deficiency on protein metabolism in dogs. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl)*. 85, 255–262. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2001.00324.x>

- HUMBERT, BERNARD, LE BACQUER, O., NGUYEN, P., DUMON, H., DARMAUN, D., 2001. Protein restriction and dexamethasone as a model of protein hypercatabolism in dogs: Effect of glutamine on leucine turnover. *Metabolism*. 50, 293–298. <https://doi.org/10.1053/meta.2001.21018>
- JEUSETTE, I., GRECO, D., AQUINO, F., DETILLEUX, J., PETERSON, M., ROMANO, V., TORRE, C., 2010. Effect of breed on body composition and comparison between various methods to estimate body composition in dogs. *Res. Vet. Sci.* 88, 227–232. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.07.009>
- JIANG, L.; HE, L.; FOUNTOULAKIS, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J. Chrom.* v.1023, p.: 317-332, 2004.
- JIANG, Yang et al. Mice lacking neutral amino acid transporter B0AT1 (Slc6a19) have elevated levels of FGF21 and GLP-1 and improved glycaemic control. *Molecular metabolism*, v. 4, n. 5, p. 406-417, 2015.
- KALHAN, Satish C. et al. Metabolic and genomic response to dietary isocaloric protein restriction in the rat. *Journal of Biological Chemistry*, v. 286, n. 7, p. 5266-5277, 2011.
- KATHRANI, Aarti et al. Alterations in serum amino acid concentrations in dogs with protein-losing enteropathy. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 32, n. 3, p. 1026-1032, 2018.
- KEUSCH, G.T., 2006. What do -omics mean for the science and policy of the nutritional sciences? *Am. J. Clin. Nutr.* 83, 520–522. <https://doi.org/10.1093/ajcn/83.2.520s>
- KIMELMAN, D.; XU, W. β -Catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective. *Oncogene*, v. 25, n. 57, p. 7482-7491, 2006.
- KOH, Wuhyun et al. GABA tone regulation and its cognitive functions in the brain. *Nature Reviews Neuroscience*, v. 24, n. 9, p. 523-539, 2023.
- KUSSMANN, M., PANCHAUD, A., AFFOLTER, M., 2010. Proteomics in nutrition: Status quo and outlook for biomarkers and bioactives. *J. Proteome Res.* 9, 4876–4887. <https://doi.org/10.1021/pr1004339>
- LAFLAMME, Dorothy P.; HANNAH, Steven S. Increased dietary protein promotes fat loss and reduces loss of lean body mass during weight loss in cats. *Int J Appl Res Vet Med*, v. 3, n. 2, p. 62-68, 2005.
- LAFLAMME, D. P., 2008. Pet Food Safety: Dietary Protein. *Top. Companion Anim. Med.* 23, 154–157. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2008.04.009>

- LAFLAMME, DOROTHY P., 2008. Letter to the Editor: Cats and Carbohydrates. *Top. Companion Anim. Med.* 23, 159–160. <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2008.10.002>
- LI, PENG; WU, GUOYAO. Amino acid nutrition and metabolism in domestic cats and dogs. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1-21, 2023.
- LIPPI, Ilaria et al. Essential and Non-Essential Amino Acids in Dogs at Different Stages of Chronic Kidney Disease. **Veterinary Sciences**, v. 9, n. 7, p. 331, 2022.
- LIPPOLIS, J.D., POWELL, E.J., REINHARDT, T.A., THACKER, T.C., CASAS, E., 2019. Symposium review: Omics in dairy and animal science—Promise, potential, and pitfalls. *J. Dairy Sci.* 102, 4741–4754. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15267>
- LUCENA, S., COELHO, A. V., MUÑOZ-PRIETO, A., ANJO, S.I., MANADAS, B., CAPELA E SILVA, F., LAMY, E., TVARIJONAVICIUTE, A., 2020. Changes in the salivary proteome of beagle dogs after weight loss. *Domest. Anim. Endocrinol.* 72, 106474. <https://doi.org/10.1016/j.domaniend.2020.106474>
- MA, X., TIAN, Z., DENG, D., CUI, Y., QIU, Y., 2018. Effect of Dietary Protein Level on the Expression of Proteins in the Gastrointestinal Tract of Young Pigs. *J. Agric. Food Chem.* 66, 4364–4372. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05655>
- MALCOMSON, Fiona C. et al. Diet-associated inflammation modulates inflammation and WNT signaling in the rectal mucosa, and the response to supplementation with dietary fiber. *Cancer Prevention Research*, v. 14, n. 3, p. 337-346, 2021.
- MANSILLA, W.D., TEMPLEMAN, J.R., FORTENER, L., SHOVELLER, A.K., 2020. Minimum dietary methionine requirements in Miniature Dachshund, Beagle, and Labrador Retriever adult dogs using the indicator amino acid oxidation technique. *J. Anim. Sci.* 98, 1–10. <https://doi.org/10.1093/JAS/SKAA324>
- MARTENS, P., SU, B., DEBLOMME, S., 2019. The ecological paw print of companion dogs and cats. *Bioscience* 69, 467–474. <https://doi.org/10.1093/biosci/biz044>
- MENDONCA, Fernanda et al. Validation of the reduction of days of total faeces collection for apparent digestibility protocol in dogs In: Congress Proceedings 27th Congress of the European Society of Veterinary and Comparative Nutrition. 2023. p. 107-107.
- MILLER, I., PREßLMAYER-HARTLER, A., WAIT, R., HUMMEL, K., SENSI, C., EBERINI, I., RAZZAZI-FAZELI, E., GIANAZZA, E., 2014. In between - Proteomics of dog biological fluids. *J. Proteomics* 106, 30–45. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.04.016>
- MILLER, I., SCHLOSSER, S., PALAZZOLO, L., VERONESI, M.C., EBERINI, I.,

- GIANAZZA, E., 2020. Some more about dogs: Proteomics of neglected biological fluids. *J. Proteomics* 218. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.103724>
- MILSOM, Judith P.; MORGAN, Marsha Y.; SHERLOCK, Sheila. Factors affecting plasma amino acid concentrations in control subjects. *Metabolism*, v. 28, n. 4, p. 313-319, 1979.
- NAKAJIMA, Mayumi et al. Plasma transferrin concentration as a nutritional marker in malnourished dogs with nutritional treatment. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 76, n. 4, p. 539-543, 2014.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL et al. Nutrient requirements of dogs and cats. National Academies Press, 2006.
- NÄSSL, ANNA-MARIA ET AL. Amino acid absorption and homeostasis in mice lacking the intestinal peptide transporter PEPT1. *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*, v. 301, n. 1, p. G128-G137, 2011.
- NELSON, DAVID L.; COX, MICHAEL M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger-7*. Artmed Editora, 2018.
- OBERBAUER, ANITA M.; LARSEN, JENNIFER A. Amino acids in dog nutrition and health. *Amino Acids in Nutrition and Health: Amino Acids in the Nutrition of Companion, Zoo and Farm Animals*, p. 199-216, 2021.
- O'NEILL, D.W., FANNING, A.L., LAMB, W.F., STEINBERGER, J.K., 2018. A good life for all within planetary boundaries. *Nat. Sustain.* 1, 88–95. <https://doi.org/10.1038/s41893-018-0021-4>
- ONU – ORGANIZAÇÃO DAS NAÇÕES UNIDAS. População mundial deve chegar a 9,7 bilhões de pessoas em 2050, diz relatório da ONU 2019. Disponível em: <https://brasil.un.org/pt-br/83427-popula%C3%A7%C3%A3o-mundial-deve-chegar-97-bilh%C3%B5es-de-pessoas-em-2050-diz-relat%C3%B3rio-da-onu>
Acesso em: 15/04/2021
- PAßLACK, N., NÖBAUER, K., HUMMEL, K., RAZZAZI-FAZELI, E., BELIK, V., & ZENTEK, J. (2022). A Pilot Study on the Urine Proteome of Cats Fed a High-Protein Complete Diet, Supplemented with or without Arginine, Ornithine or Zeolite. *Veterinary Sciences*, 9(12), 654.
- PANAGIOTOU, G., NIELSEN, J., 2009. Nutritional systems biology: Definitions and approaches. *Annu. Rev. Nutr.* 29, 329–339. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-080508-141138>
- PANDEY, A., MANN, M., INTERACTION, P., DENMARK, S., M, D.-O., PROTANA, A.S.,

2000. genes and genomes 405.
- PARISI, G., TULLI, F., FORTINA, R., MARINO, R., BANI, P., DALLE ZOTTE, A., DE ANGELI, A., PICCOLO, G., PINOTTI, L., SCHIAVONE, A., TEROVA, G., PRANDINI, A., GASCO, L., RONCARATI, A., DANIELI, P.P., 2020. Protein hunger of the feed sector: the alternatives offered by the plant world. *Ital. J. Anim. Sci.* 19, 1205–1227. <https://doi.org/10.1080/1828051X.2020.1827993>
- PARKER, VALERIE J.; FASCETTI, ANDREA J.; KLAMER, BRETT G. Amino acid status in dogs with protein-losing nephropathy. *Journal of veterinary internal medicine*, v. 33, n. 2, p. 680-685, 2019.
- PORSANI, M.Y.H., TEIXEIRA, F.A., OLIVEIRA, V.V., PEDRINELLI, V., DIAS, R.A., GERMAN, A.J., BRUNETTO, M.A., 2020. Prevalence of canine obesity in the city of São Paulo, Brazil. *Sci. Rep.* 10, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-70937-8>
- RIBEIRO, L.B., DE ARRUDA, A.M.V., PEREIRA, E.S., KONIECZNAK, P., TONELLO, C.L., 2008. Technique of indicator amino acid oxidation. *Semin. Agrar.* 29, 973–982. <https://doi.org/10.5433/1679-0359.2008v29n4p973>
- SANTAROSSA, AMANDA; PARR, JACQUELINE M.; VERBRUGGHE, ADRONIE. The importance of assessing body composition of dogs and cats and methods available for use in clinical practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 251, n. 5, p. 521-529, 2017.
- SANS, P., COMBRIS, P., 2015. World meat consumption patterns: An overview of the last fifty years (1961-2011). *Meat Sci.* 109, 106–111. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2015.05.012>
- SCRIMSHAW, Nevin; YOUNG, Vernon. Adaptation to low protein and energy intakes. *Human Organization*, v. 48, n. 1, p. 20-30, 1989.
- SFERRAZZA, Gianluca et al. Nature-derived compounds modulating Wnt/ β -catenin pathway: A preventive and therapeutic opportunity in neoplastic diseases. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, v. 10, n. 10, p. 1814-1834, 2020.
- SILVA, André MN et al. Human transferrin: An inorganic biochemistry perspective. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 449, p. 214186, 2021.
- SOUZA, L. DE L., RHODEN, S.A., PAMPHILE, J.A., 2014. A importância das ômicas como ferramentas Para o estudo da prospecção de Microrganismos: perspectivas e desafios. *Rev. UNINGÁ* 18, 16–21.
- SUTHERLAND, K.A.K., MANSILLA, W.D., FORTENER, L., SHOVELLER, A.K., 2020.

- Lysine requirements in small, medium, and large breed adult dogs using the indicator amino acid oxidation technique. *Transl. Anim. Sci.* 4, 1–10. <https://doi.org/10.1093/tas/txaa082>
- SWANSON, K.S., CARTER, R.A., YOUNT, T.P., ARETZ, J., BUFF, P.R., 2013. Nutritional sustainability of pet foods. *Adv. Nutr.* 4, 141–150. <https://doi.org/10.3945/an.112.003335>
- TAMBURINO, L., BRAVO, G., CLOUGH, Y., NICHOLAS, K.A., 2020. From population to production: 50 years of scientific literature on how to feed the world. *Glob. Food Sec.* 24. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2019.100346>
- TIAN, X., ENGEL, B.A., QIAN, H., HUA, E., SUN, S., WANG, Y., 2021. Will reaching the maximum achievable yield potential meet future global food demand? *J. Clean. Prod.* 294, 126285. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.126285>
- TIAN, Z., MA, X., DENG, D., CUI, Y., CHEN, W., 2019. Influence of Nitrogen Levels on Nutrient Transporters and Regulators of Protein Synthesis in Small Intestinal Enterocytes of Piglets. *J. Agric. Food Chem.* 67, 2782–2793. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b06712>
- WAGENMAKERS, ANTON J.M., 1999. Tracers to investigate protein and amino acid metabolism in human subjects. *Proc. Nutr. Soc.* 58, 987–1000. <https://doi.org/10.1017/S0029665199001305>
- WAKSHLAG, J.J., BARR, S.C., ORDWAY, G.A., KALLFELZ, F.A., FLAHERTY, C.E., CHRISTENSEN, B.W., SHEPARD, L.A., NYDAM, D. V., DAVENPORT, G.M., 2003. Effect of dietary protein on lean body wasting in dogs: Correlation between loss of lean mass and markers of proteasome-dependent proteolysis. *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)* 87, 408–420. <https://doi.org/10.1046/j.0931-2439.2003.00452.x>
- WANG, J., LI, D., DANGOTT, L.J., WU, G., 2006. Recent Advances in Nutritional Sciences Proteomics and Its Role in. *J. Chromatogr.* 1759–1762.
- WASINGER, V.C., CORDWELL, S.J., POLJAK, A., YAN, J.X., GOOLEY, A.A., WILKINS, M.R., DUNCAN, M.W., HARRIS, R., WILLIAMS, K.L., HUMPHERY-SMITH, I., 1995. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* 16, 1090–1094. <https://doi.org/10.1002/elps.11501601185>
- WILLIAMS, C.C., CUMMINS, K.A., HAYEK, M.G., DAVENPORT, G.M., 2001. Effects of dietary protein on whole-body protein turnover and endocrine function in young-

- adult and aging dogs. *J. Anim. Sci.* 79, 3128–3136.
<https://doi.org/10.2527/2001.79123128x>
- WU, Guoyao. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. ***Amino acids***, v. 37, p. 1-17, 2009.
- YAMAMOTO, S., Ohta, Y., Hasegawa, E., Hashida, S., Kaneko, Y., Mizutani, S., Ong, B.H.E., Naganobu, K., Torisu, S., 2019. Usefulness of Urinary Creatinine/Urea Nitrogen Ratio as Indicator of Body Protein Catabolism in Dogs Fed Low Protein Diets. *Front. Vet. Sci.* 6. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00449>
- VAN DER LUGT, Timme et al. Dietary advanced glycation endproducts induce an inflammatory response in human macrophages in vitro. *Nutrients*, v. 10, n. 12, p. 1868, 2018.
- XIE, Catherine B.; JANE-WIT, Dan; POBER, Jordan S. Complement membrane attack complex: new roles, mechanisms of action, and therapeutic targets. *The American Journal of Pathology*, v. 190, n. 6, p. 1138-1150, 2020.
- ZELLNER, Maria et al. A proteomics study reveals a predominant change in MaoB expression in platelets of healthy volunteers after high protein meat diet: relationship to the methylation cycle. *Journal of Neural Transmission*, v. 118, p. 653-662, 2011.