

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**SUPLEMENTAÇÃO DE ANTIOXIDANTE A BASE DE ALGAS EM DIETAS
PARA CÃES CONTENDO NÍVEIS ELEVADOS DE ÁCIDOS GRAXOS
SATURADOS OU INSATURADOS**

GABRIEL FARIA ESTIVALLET PACHECO
Zootecnista/UFSM
Mestre em Zootecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do grau de Doutor em
Zootecnia
Área de concentração Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil
Março de 2018

CIP - Catalogação na Publicação

Faria Estivallet Pacheco, Gabriel

SUPLEMENTAÇÃO DE ANTIOXIDANTE A BASE DE ALGAS EM DIETAS PARA CÃES CONTENDO NÍVEIS ELEVADOS DE ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS OU INSATURADOS / Gabriel Faria Estivallet Pacheco. -- 2018.

91 f.

Orientador: Luciano Trevizan.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2018.

1. ácidos graxos essenciais. 2. estresse oxidativo. 3. farinha de algas. 4. radicais livres.
I. Trevizan, Luciano, orient. II. Título.

Gabriel Faria Estivallet Pacheco
Mestre em Zootecnia

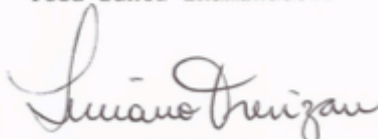
TESE

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

DOUTOR EM ZOOTECNIA

Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovada em: 28.03.2018
Pela Banca Examinadora



LUCIANO TREVIZAN
PPG Zootecnia/UFRGS
Orientador

Homologado em: 02/05/2018
Por



DANILO PEDRO STREIT JR.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia

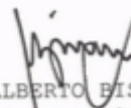
Alexandre de Mello Kessler
UFRGS



Ananda Portella Félix
UFPR



Rosana Claudio Silva Ogoshi
Uniarp



CARLOS ALBERTO BISSANI
Diretor da Faculdade de Agronomia

“You are the storyteller of your own life, and you can create your own legend or not.” – Isabel Allende

DEDICO

À minha esposa **Gabriela Da Ros de Araújo**. Os anos difíceis de trabalho, sacrifícios durante o doutorado sanduíche e frustrações só foram possíveis de suportar por causa dela.

Aos meus pais **Carlos Virgílio Estivallet Pacheco** (*in memoriam*) e **Simone Margarida Faria Estivallet Pacheco** (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha esposa **Gabriela Da Ros de Araújo** pelo amor incondicional, atenção, carinho, amizade e, principalmente, pela paciência ao longo de todos estes anos. Sem o seu apoio esta caminhada seria, sem dúvida alguma, ainda mais difícil.

Ao meu pai **Carlos Virgílio Estivallet Pacheco**, minha referência e meu alicerce, um agradecimento mais do que especial por toda educação e valores éticos e morais a mim ensinado. Com ele aprendi a ver nas coisas mais simples o verdadeiro sentido da vida.

A minha segunda família, **Luiz Araújo, Olívia Da Ros, Tiago Luís Da Ros de Araújo e Giovanna Rocha Nunes**, pessoas maravilhosas que a vida colocou em meu caminho e que possuem a capacidade de transmitir muita energia positiva e paz.

Ao meu orientador professor **Dr. Luciano Trevizan** pela oportunidade, amizade, confiança e paciência. Por ter me transmitido parte do seu vasto conhecimento na área de nutrição de cães e gatos, por me estimular a buscar cada vez mais conhecimento e a dar sempre o melhor de mim, enfim, por ter contribuído diretamente para o meu desenvolvimento profissional e pessoal ao longo destes 7 anos de UFRGS.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida no Brasil e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudo concedida para realização do doutorado sanduiche na Alemanha.

Aos docentes e técnicos administrativos do programa de Pós-Graduação em Zootecnia pelo suporte, em especial a secretária Ione Borcelli Gonçalves, um exemplo de profissional.

Aos colegas estagiários, mestrandos e doutorandos do Laboratório de ensino Zootécnico (LEZO) pelos anos de convívio e pelo valioso auxílio na condução dos experimentos.

À minha amiga **Geruza Silveira Machado** pela amizade, um dos ingredientes mais importantes na receita da vida, e pela parceria em todas as atividades que desempenhamos desde a graduação em Santa Maria até o Doutorado em Porto Alegre.

À **Mariana Scheraiber** pela atenção e companhia nos cafés de fim de tarde durante o doutorado sanduiche. Uma parceria que tornou a estadia em Berlim ainda mais agradável.

Ao Professor **Dr. Jürgen Zentek** por me receber no Instituto de nutrição animal da Freie Universität Berlin, pela atenção e oportunidade de conhecer mais sobre os estudos avançados em nutrição de cães e gatos que vem desenvolvendo.

À empresa Nutribaur e ao amigo Zootecnista **Dr. Fábio Ritter Marx** pelo suporte na produção das dietas experimentais.

Agradeço a todas as pessoas que participaram de minha trajetória acadêmica e que de certa forma contribuíram para o meu desenvolvimento.

Vielen Dank!

SUPLEMENTAÇÃO DE ANTIOXIDANTE A BASE DE ALGAS EM DIETAS PARA CÃES CONTENDO NÍVEIS ELEVADOS DE ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS OU INSATURADOS¹

Autor: M. Sc. Gabriel Faria Estivallet Pacheco

Orientador: Prof. Dr. Luciano Trevizan

RESUMO

O presente estudo avaliou as alterações dos marcadores de estresse oxidativo em cães adultos alimentados com dietas com altos níveis de ácidos graxos (AG) saturados ou insaturado, suplementadas ou não com antioxidante natural à base de algas. Doze cães Beagle adultos saudáveis (6 machos e 6 fêmeas, 2 anos de idade, $11,2 \pm 1,92$ kg PV) foram distribuídos em dois blocos inteiramente casualizados e alimentados com 4 dietas experimentais revestidas com 2 fontes lipídicas: saturadas (13% de sebo bovino) ou insaturadas (13% de óleo de soja enriquecido com DHA), suplementadas ou não com 500 mg de antioxidantes naturais à base de algas (AOX) por 4 semanas, intercalados com um período de adaptação de 4 semanas. Amostras de sangue foram coletadas nos dias 0, 15 e 30 de cada bloco. Glutaciona peroxidase (GSH-Px), superóxido dismutase (SOD), grupo sulfidril, carbonilação de proteínas (PC), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e potencial antioxidante reativo total (TRAP) foram avaliados no soro. Enquanto GSH-Px, SOD, glutaciona S-transferase (GST), catalase (CAT), grupo sulfidril e TBARS foram medidos nos eritrócitos. Não houve diferença significativa na maioria dos marcadores oxidativos avaliados. Em contraste, a atividade de GST nos eritrócitos foi maior nos animais que consumiram as dietas revestidas com sebo bovino em comparação com animais que consumiram dietas revestidas com óleo de soja enriquecida com DHA ($P < 0,05$). O soro dos animais alimentados com as dietas suplementadas com AOX apresentaram maiores valores de TRAP ($P < 0,05$). Os dados demonstraram que as concentrações de ácidos graxos insaturados utilizados nas dietas para cães adultos não foram suficientes para causar grandes alterações no estado oxidativo. Não foi possível avaliar a eficiência do antioxidante natural em manter o equilíbrio oxidativo dos animais, pois parece que o organismo não foi desafiado pelas dietas ricas em AG insaturados. Isso sugere que cães como descendentes de carnívoros podem ter alguma proteção natural contra a oxidação.

Palavras-chave: ácidos graxos essenciais, estresse oxidativo, farinha de algas, radicais livres

¹ Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (90p.), Março de 2018.

SUPPLEMENTATION OF ANTIOXIDANT BASED ON ALGAE IN DIETS FOR DOGS CONTAINING HIGH LEVELS OF SATURATED OR UNSATURATED FATTY ACIDS¹

Author: M. Sc. Gabriel Faria Estivallet Pacheco

Advisor: Prof. Dr. Luciano Trevisan

ABSTRACT

The present study evaluated the alterations of the oxidative stress markers in adult dogs fed with high levels of saturated or unsaturated fatty acids, supplemented or not with natural algae based antioxidant. Twelve healthy adult Beagle dogs (6 males and 6 females, 2 years old, 11.2 ± 1.92 kg BW), were distributed in 2 completely randomized blocks and fed with 4 experimental diets coated with 2 lipid sources: saturated (13% bovine tallow) or unsaturated (13% soybean oil enriched with DHA), supplemented or not with 500 mg of algae-based natural antioxidant (AOX) for 4 weeks, intercalated with a 4 week adaptation period. Blood samples were collected on days 0, 15 and 30 of each block. Glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), sulfhydryl group, protein carbonylation (PC), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and total reactive antioxidant potential (TRAP) were evaluated in serum. While GSH-Px, SOD, glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), sulfhydryl group and TBARS were measured in erythrocytes. There was no significant difference in most of the oxidative markers evaluated. In contrast, GST activity in erythrocytes was greater in the animals that consumed the diets coated with bovine tallow compared to animals that consumed diets coated with soybean oil enriched with DHA ($P < 0.05$). Serum from animals fed diets supplemented with AOX presented greater TRAP values ($P < 0.05$). The data demonstrate that the concentrations of unsaturated fatty acids used in the diets for adult dogs were not sufficient to cause large changes in the oxidative status. It was not possible to evaluate the efficiency of the natural antioxidant in maintaining the oxidative balance of the animals once seems like the body was not challenged by the unsaturated diets. It suggests that dogs descended from carrion carnivore dogs may have some natural protection against oxidation.

Key words: algae meal, essential fatty acids, free radicals, oxidative stress

¹ Doctoral thesis in Animal Science – Faculdade de Agronomia, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil (90 p.), March of 2018.

Sumário

CAPÍTULO I	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1. Lipídios: fontes, funções e metabolismo	16
2.2. Lipídios de membrana	20
2.3. Proteínas de membrana	21
2.4. Radicais livres, espécies reativas e estresse oxidativo	22
2.5. Peroxidação lipídica.....	24
2.6. Oxidação da proteína	26
2.7. Antioxidantes	26
3. HIPÓTESES E OBJETIVOS	32
CAPÍTULO II	33
Effect of the consumption of polyunsaturated fatty acids on the oxidative status of adult dogs	Erro! Indicador não definido.
ABSTRACT	Erro! Indicador não definido.
INTRODUCTION	Erro! Indicador não definido.
MATERIAL AND METHODS.....	Erro! Indicador não definido.
RESULTS	41
DISCUSSION	42
Implications.....	Erro! Indicador não definido.
Literature cited.....	48
CAPÍTULO III	57
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
APÊNDICES	68
VITA.....	90

RELAÇÃO DE TABELAS

		Página
CAPÍTULO I		
Tabela 1.	Principais ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados presentes nos alimentos.	16
Tabela 2.	Espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio.	23
CAPÍTULO II		
Tabela 1.	Composição da dieta basal	51
Tabela 2.	Composição química analisada da dieta basal e das dietas experimentais contendo óleo de soja + farinha de microalgas ou sebo bovino, com ou sem antioxidante natural a base de algas	52
Tabela 3.	Composição de ácidos graxos das dietas experimentais contendo óleo de soja + farinha de microalga ou sebo bovino	53
Tabela 4.	Parâmetros oxidativos no soro em cães alimentados com dietas insaturadas, insaturadas com antioxidante, saturada e saturada com antioxidante.	55
Tabela 5.	Parâmetros oxidativos na hemácia em cães alimentados com dietas insaturadas, insaturadas com antioxidante, saturada e saturada com antioxidante.	56

RELAÇÃO DE FIGURAS**CAPÍTULO I**

- Figura 1. Visão geral do metabolismo dos PUFA n-6 e n-3 e produção dos eicosanoides.
- Figura 2. Produção de radicais livres (RL) de oxigênio, nitrogênio e outras espécies reativas em células de mamíferos.

Página**17****23**

RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

AA	Aminoácido
ARA	Ácido araquidônico
AAFCCO	Association of American Feed Control Officials
AG	Ácidos graxos
AGE	Ácidos graxos essenciais
ALA	Ácido α -linolênico
AS	Ácido estearidônico
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COX	Ciclooxigenase
DGLA	Ácido di-homo gama-linolênico
DHA	Ácido docosahexaenóico
DPA	Ácido docosapentaenóico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPA	Eicosapentaenóico
ERCI	Espécie reativa ao cloro
ERN	Espécie reativa ao nitrogênio
ERO	Espécie reativa ao oxigênio
FEDIAF	Federação Europeia das Indústrias de Pet Food (<i>The European Pet Food Industry Federation</i>)
GLA	Ácido gama-linolênico
GSH-Px	Glutathiona peroxidase
GR	Glutathiona redutase
GSH	Glutathiona
GST	Glutathiona S-transferase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HETE	Hidroxeicosatetraenoico
HPETE	Hidroxiperoxidoeicosatetraenoico
LA	Ácido linoleico
LO	Lipoxigenase
LTB	Leucotrieno B
NO[•]	Óxido nítrico
NO₂[•]	Dióxido de nitrogênio
O₂⁻	Superóxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
NOS	Óxido nítrico sintase
PGE	Prostaglandina E
Prx	Peroxirredoxina
SePP	Selenoproteína P
SOD	Superóxido dismutase

TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRAP	Potencial antioxidante reativo total
TRs	Tiorredoxina redutase

CAPÍTULO I

1. INTRODUÇÃO

As publicações dos primeiros esboços do genoma canino (Lindblad-Toh *et al.*, 2005) e do felino (Pontius *et al.*, 2007) expandiram consideravelmente as possibilidades de estudar os efeitos que os nutrientes têm sobre a saúde e o desenvolvimento de doenças em cães e gatos. Com os avanços das pesquisas na área de nutrição animal, a indústria passou a destacar em suas embalagens a incorporação de ingredientes funcionais como probióticos, prebióticos, ácidos graxos poli-insaturados (PUFA), minerais quelatados e componentes naturais com ação antioxidante, todos com o objetivo de agregar valor aos seus produtos e torná-los mais competitivos e atrativos aos tutores.

A inclusão de PUFA da família ômega 3 (n-3), principalmente os ácidos eicosapentaenóico (EPA, 20:5n-3) e docosahexaenóico (DHA, 22:6n-3), tem se destacado nos últimos anos em resposta aos potenciais benefícios para saúde dos animais. Desta forma, são incorporados nas dietas ou suplementados em cápsulas de forma preventiva ou como tratamento auxiliar para diversas enfermidades, especialmente as de natureza inflamatória (Lenox & Bauer, 2013). De modo semelhante, componentes naturais com ação antioxidante como o ácido ascórbico, o selênio, a farinha de algas, as leveduras e os produtos da fermentação do *Aspergillus niger* têm sido incluídos em dietas para animais de companhia com o intuito de garantir o equilíbrio oxidativo biológico (Ogoshi *et al.*, 2016).

A relação entre os PUFA ingeridos e o balanço do mecanismo antioxidante do organismo é importante para a manutenção da saúde de cães e contribui significativamente com o aumento da expectativa de vida dos animais. Neste sentido, os alimentos passaram a exercer papel fundamental à saúde e à qualidade de vida dos animais e deixaram de ser considerados, pelos tutores e por profissionais da área, apenas como fontes de nutrientes.

As pesquisas com n-3 contribuíram para o aumento dos níveis de PUFA nos alimentos comerciais para animais de companhia. No entanto, poucos estudos avaliaram os efeitos adversos que a suplementação excessiva destes ácidos graxos (AG) pode gerar no *status* oxidativo dos animais, especialmente quando os níveis de n-3 são elevados no alimento (Hall *et al.*, 2003; LeBlanc *et al.*, 2005). As proteínas e os lipídios de membrana, por exemplo, são altamente suscetíveis ao processo oxidativo e as substâncias oxidantes prejudicam a manutenção das estruturas celulares, suas funções e a fluidez das membranas. O consumo de alimentos contendo ingredientes com potencial antioxidante pode minimizar os danos oxidativos e melhorar os sistemas de defesa antioxidante.

Assim, esta tese foi dividida em 3 capítulos: O capítulo 1 aborda as teorias relacionadas a estrutura, função e composição dos ácidos graxo na membrana celular, estresse oxidativo e funções dos antioxidantes. O capítulo 2 inclui um estudo com quatro dietas em que se avaliou o efeito de duas fontes lipídicas, sebo bovino (dieta saturada) e uma mistura de óleo de soja com farinha de microalgas como fonte de DHA (dieta insaturada), suplementadas ou não com uma mistura comercial de antioxidante natural a base de algas, sobre a atividade de enzimas e outros componentes formados em situações de estresse oxidativo e o capítulo 3 apresenta as considerações finais da tese.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Lipídios: fontes, funções e metabolismo

Os lipídios desempenham papéis importantes na nutrição de cães e gatos. São os nutrientes mais energeticamente densos, provendo aproximadamente 2,25 vezes mais energia por grama de produto do que carboidratos e proteínas. Além disso, os lipídios fornecem ácidos graxos essenciais (AGE), compõem a estrutura da membrana que envolve as células e as organelas, são precursores de substâncias bioativas, como os eicosanoides, agem como carreadores que permitem a absorção das vitaminas lipossolúveis e aumentam a palatabilidade dos alimentos.

Os alimentos para animais de companhia geralmente contêm mais de uma fonte de lipídio. Estas fontes são provenientes de ingredientes de origem animal (sebo bovino, gordura de frango e óleo de peixe), vegetal (óleo de soja, milho, girassol, linhaça, canola, cártamo e algas) ou ainda, da mistura de ambas. Assim, os lipídios presentes nos alimentos disponibilizam para os animais uma gama de AG, tais como: os AG saturados (SFA, sem ligações duplas), os monoinsaturados (MUFA, contém uma ligação dupla) ou os poli-insaturados (PUFA, contém mais do que duas ligações duplas) (Tabela 1).

Tabela 1. Principais ácidos graxos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados presentes nos alimentos.

Nº de C	Fórmula	Nomenclatura IUPAC	Nomenclatura usual	PM (g/mol)
Ácidos graxos saturados				
2	C ₂ H ₄ O ₂	Ác. etanóico	Ác. acético	60,05
4	C ₄ H ₈ O ₂	Ác. butanóico	Ác. butírico	88,18
6	C ₆ H ₁₂ O ₂	Ác. hexanóico	Ác. caproico	116,16
8	C ₈ H ₁₆ O ₂	Ác. octanóico	Ác. caprílico	144,21
10	C ₁₀ H ₂₀ O ₂	Ác. decanóico	Ác. cáprico	172,26
12	C ₁₂ H ₂₄ O ₂	Ác. dodecanóico	Ác. láurico	200,31
14	C ₁₄ H ₂₈ O ₂	Ác. tetradecanóico	Ác. mirístico	228,31
16	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	Ác. hexadecanóico	Ác. palmítico	256,42
18	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	Ác. octadecanóico	Ác. esteárico	284,47
20	C ₂₀ H ₄₀ O ₂	Ác. eicosapentanóico	Ác. araquídico	312,52
Ácidos graxos monoinsaturados				
16	C ₁₆ H ₃₀ O ₂	Ác. <i>cis</i> 9-hexadecenóico	Ác. palmitoleico	254,4
18	C ₁₈ H ₃₄ O ₂	Ác. <i>cis</i> 9-octadecenóico	Ác. oleico	282,45
20	C ₂₀ H ₃₈ O ₂	Ác. <i>cis</i> 9-icosenóico	-	310,50
Ácidos graxos poli-insaturados				
18	C ₁₈ H ₃₂ O ₂	Ác. <i>cis</i> 9,12-octadecadienóico	Ác. linoleico	280,44
18	C ₁₈ H ₃₀ O ₂	Ác. <i>cis</i> 9,12,15-octadecatrienóico	Ác. linolênico	278,42
20	C ₂₀ H ₃₂ O ₂	Ác. <i>cis</i> 5,8,11,14-eicosatetraenóico	Ác. araquidônico	310,5

20	$C_{20}H_{30}O_2$	Ác. <i>cis</i> 5,8,11,14,17-eicosapentaenóico	Ác. eicosapentaenóico	302,5
22	$C_{22}H_{32}O_2$	Ác. <i>cis</i> 4,7,10,13,16,19-docosahexaenóico	Ác. docosahexaenóico	328,5

C= número de carbonos; PM= peso molecular (Adaptado de Sant'Ana, 2016)

Dos PUFA fazem parte o ômega 3 (n-3) e o ômega 6 (n-6). Estes AG são classificados de acordo com o local onde se encontra a primeira dupla ligação a partir do metil terminal da molécula. Os AG n-6 e n-3 são nutrientes essenciais para o crescimento adequado e para prevenção de doenças em mamíferos (Biagi *et al.*, 2004). Estes AG são chamados de “essenciais”, pois não são sintetizados em quantidades suficientes pelos animais devido à deficiência de enzimas necessárias para sua síntese e, portanto, devem ser incorporados nas dietas a fim de suprir sua demanda (Case *et al.*, 2011). Para este efeito, fazem parte o ácido linoleico (AL, 18:2 n-6) e o ácido α -linolênico (ALA, 18:3 n-3), que apesar de ser menos requerido como AGE em relação ao AL, serve como substrato para síntese de EPA e DHA, dois ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa (PUFA) importantes para manutenção da saúde em cães (NRC, 2006).

Os AGE com 18 carbonos podem ser metabolizados pelos animais e convertidos em AG com 20 e 22 carbonos através da inserção de ligações duplas na cadeia acil (dessaturação) e pelo aumento no comprimento da cadeia carbonada conhecida como alongação. Desta forma, o AL pode ser convertido via ácido γ -linolênico (GLA, 18:3n-6) e ácido di-homo- γ -linolênico (DGLA, 20:3n-6) em ácido araquidônico (ARA, 20:4n-6) e o ALA pode ser convertido em EPA (20:5n-3), ácido docosapentaenóico (DPA, 22:5n-3) e DHA (22:6n-3) (Figura 1).

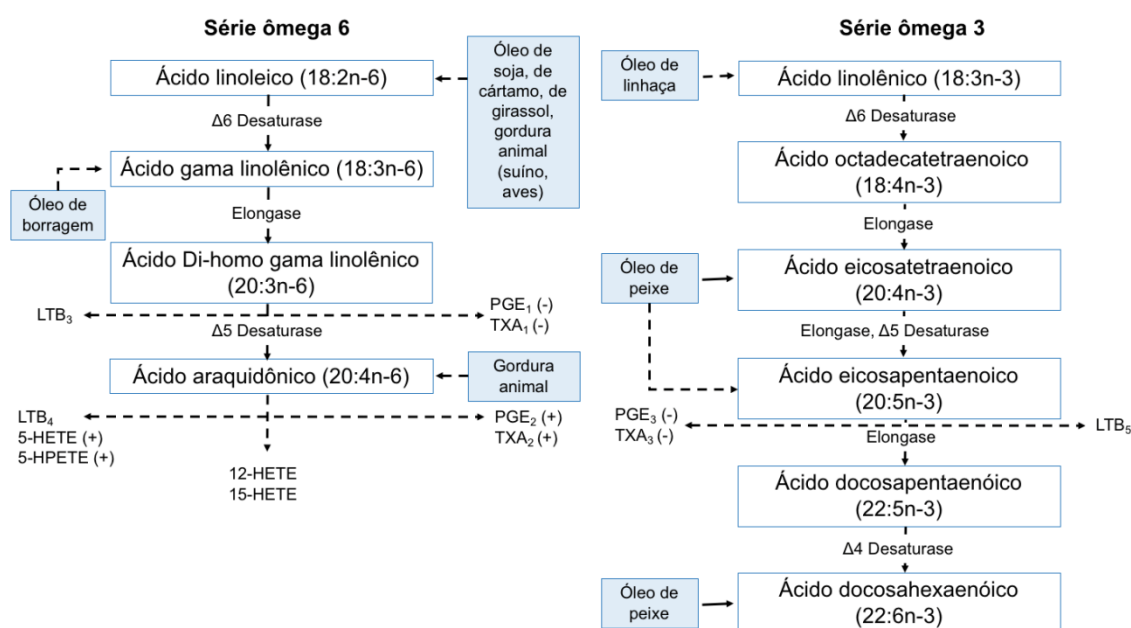


Figura 1. Visão geral do metabolismo dos PUFA n-6 e n-3 e produção dos eicosanoides. HETE = Hidroxieicosatetraenóico; HPETE = Hidroxiperoxidoeicosatetraenóico; PGE = Prostaglandina E; LTB = Leucotrieno B; TXA = Tromboxano A; (+) = pró-inflamatório; (-) = anti-inflamatório (Adaptado de Zentek, 2016)

A escolha da fonte lipídica mais apropriada para formulação dos alimentos para cães dependerá de fatores como: disponibilidade do ingrediente, digestibilidade, conteúdo de AGE, palatabilidade, suscetibilidade à oxidação e preço. O ponto de fusão é outro fator que deve ser considerado, principalmente nos casos em que a fábrica não dispõe de equipamentos de infusão a vácuo para o recobrimento do óleo ou da gordura. Fontes com baixo ponto de fusão, ou seja, líquidas em temperatura ambiente, não se fixam adequadamente aos *kibbles* e se perdem no processo. Marx *et al.* (2015), verificaram que a perda do óleo de soja após o recobrimento dos *kibbles* se refletiu diretamente no percentual de extrato etéreo dos alimentos quando comparado com os alimentos recobertos com sebo bovino, o qual possui maior ponto de fusão e apresentou melhor fixação aos *kibbles*.

Os óleos vegetais são boas fontes de AL e de ALA. Entretanto, as concentrações de EPA e DHA são inexistentes nestes ingredientes. Estes PUFA são encontrados geralmente no óleo de peixe, no óleo de *krill* e nas algas marinhas. Atualmente, o óleo de peixe é o ingrediente mais usado em alimentos para animais de companhia como fonte de EPA e DHA. A concentração destes AG, entretanto, depende diretamente da espécie e do tipo de alimento ao qual o animal foi submetido. A variabilidade na composição química deste ingrediente, principalmente quanto a sua concentração de EPA e DHA, pode acarretar em diferentes efeitos na resposta imunológica (NRC, 2006; Hall *et al.*, 2011). Além disso, o óleo de peixe pode conter contaminantes como metais pesados, dioxinas e resíduos de antibióticos que afetam negativamente a saúde dos animais (Svensson *et al.*, 1991; Alix, 2015).

Estudos recentes propõem que as algas marinhas podem ser consideradas como fonte alternativa de EPA e DHA em substituição ao óleo de peixe. No entanto, apesar de serem ricas em PUFA e não conterem possíveis contaminantes encontrados nos óleos de peixe, elas representam uma fonte relativamente nova na nutrição animal e poucos estudos foram realizados para comprovar seus potenciais benefícios à saúde de cães e gatos (Ogoshi *et al.*, 2016; Hadley *et al.*, 2017).

Além da concentração de PUFA, a presença de componentes antioxidantes, capazes de prevenir o desenvolvimento e a progressão de enfermidades resultantes do estresse oxidativo e a concentração de taurina, presente em espécies de algas marinhas como as *Mazaella spp.* (4,11mg/g MS), *Porphyra spp.* (1,22mg/g MS) e *Chondracanthus spp.* (6,28 mg/g MS) (Rocha *et al.*, 2007; McCuske *et al.*, 2014), têm chamado a atenção para a inclusão deste ingrediente em alimentos para animais de companhia. O desenvolvimento de pesquisas com o objetivo de avaliar fontes alternativas, sustentáveis e seguras de AGE se justificam pela importância que os PUFA representam para o *status* da saúde humana e animal.

Independentemente da fonte, os PUFA n-3 são muitas vezes suplementados ou incluídos em alimentos para animais de companhia com o objetivo de tratar preventivamente diversas doenças, especialmente as de

natureza inflamatória (LeBlanc *et al.*, 2005; Lenox & Bauer, 2013). Apesar disso, não está claro no meio científico se os benefícios advindos do n-3 são provenientes dos seus níveis e do tipo, ou mesmo da relação entre os PUFA n-6:n-3 presentes nos alimentos. Alguns estudos sugerem que os benefícios dos PUFA ocorrem, pelo menos em parte, através da incorporação destes AG nas membranas celulares, as quais levam a alterações nas propriedades das membranas e na produção de diferentes mediadores celulares (Wander *et al.*, 1997; Hall *et al.*, 2006).

Estudos em cães observaram que quantidades menores de mediadores inflamatórios foram produzidas quando a relação de n-6:n-3 foi mantida entre 10:1 e 5:1, em comparação com dietas ricas em n-6, em que a relação n-6:n-3 pode atingir mais de 100:1, aumentando a produção de mediadores pró-inflamatórios (Vaughn *et al.*, 1994; Purushothaman *et al.*, 2011). Por esta razão, ao formular dietas para animais de companhia, o tipo e a quantidade de AG presentes nos ingredientes devem ser levados em consideração, de modo a garantir uma proporção adequada e balanceada de n-6 e n-3 no alimento.

Hall *et al.* (2006) observaram que cães alimentados com dietas ricas em n-3 apresentaram concentrações plasmáticas maiores de n-3 totais, EPA e DHA em relação aos animais que consumiram dietas ricas em n-6. Este estudo também demonstrou que o nível de n-3 presente na dieta foi mais importante do que a relação n-6:n-3 para manutenção do perfil de PUFA no plasma.

A relação n-6:n-3 total é usada extensivamente pela indústria de alimentos para animais de companhia devido ao fato de o AL e do ALA competirem pelas mesmas enzimas que alongam e dessaturam estes AG. Esta relação, no entanto, deve ser considerada com cautela, pois, de modo geral, o cálculo para se determinar a concentração do n-3 considera o n-3 total (ALA, EPA, DHA, etc), sem discriminar suas proporções. O uso do n-3 total não é bioequivalente a concentração de EPA e DHA, por que a conversão de ALA em EPA e DHA é ineficiente em cães e o efeito biológico do ALA é diferente do efeito dos PUFA n-3 (Dunbar *et al.*, 2002; LeBlanc *et al.*, 2005; Lenox & Bauer, 2013).

Waldron *et al.* (2012) observaram que as dietas contendo óleo de linhaça e óleo de peixe resultaram no enriquecimento de PUFA n-3. Neste estudo, houve a conversão do ALA em EPA e posteriormente a elongação para DPA. No entanto, a conversão de DPA para DHA não se mostrou eficiente e os níveis plasmáticos de DHA permaneceram inalterados nos cães. Este estudo reforça a hipótese da limitação do metabolismo de PUFA n-3 em cães e reflete a ineficiência do fígado de cães adultos em converter DPA em DHA (Bauer *et al.*, 1998; Dunbar *et al.*, 2010). Além disso, reforça o debate sobre a possibilidade do ALA ser realmente considerado como bom precursor de PUFA n-3 ou se é necessário a suplementação de EPA e DHA nos alimentos para animais de companhia.

A maior parte do DHA é produzido em tecidos neurológicos (Purushotham *et al.*, 2011) e talvez por este motivo os níveis plasmáticos encontrados no estudo de Waldron *et al.* (2012) permaneceram baixos. Pawlosky *et al.* (1994), conduziram um estudo em gatos e observaram que o tecido cerebral realiza parte substancial da conversão de DPA em DHA. Por outro lado, Alvarez *et al.* (1994) observaram em cães que a síntese de DHA na retina foi similar a síntese realizada no fígado. Desta forma, torna-se confuso o entendimento do

metabolismo de DHA, pois contradiz a ineficiência apontada por Bauer *et al.* (1998) e Dunbar *et al.* (2010).

Estudos em cães sugerem que a suplementação de PUFA n-3 tem efeito benéfico em animais com dermatite atópica (Olivry *et al.*, 2001), câncer (Ogilvie *et al.*, 2000), doença cardíaca (Billman, *et al.*, 1999), insuficiência renal crônica (Biagi *et al.*, 2004) e doenças inflamatórias (Hall *et al.*, 2005). Entretanto, efeitos adversos como alteração das funções plaquetárias, distúrbios gastrointestinais, retardo no processo de cicatrização, peroxidação lipídica, ganho de peso, alterações na funcionalidade do sistema imune, efeitos no controle glicêmico e sensibilidade à insulina, também têm sido associados com a suplementação excessiva de n-3 (Hall, 1996; Wander *et al.*, 1997; Lenox & Bauer, 2013).

Uma pesquisa *survey* com diversas marcas de alimentos comerciais apresentou variações no total de n-3 e n-6 consumidos por cães a partir dos alimentos (16 – 283 mg/kg e 168 – 938 mg/kg de peso corporal por dia, respectivamente) (Roudebush *et al.*, 1997; Roudebush *et al.*, 2001). Da mesma forma, EPA e DHA variam largamente em diferentes condições, mas tipicamente entre 50 e 220 mg/kg de peso corporal por dia (Lenox & Bauer, 2013). A variabilidade na concentração destes AG causa diferentes respostas fisiológicas nos animais que deve ser melhor investigada.

2.2. Lipídios de membrana

Os lipídios são moléculas que desempenham uma variedade de funções estruturais e biológicas. O papel primário dos lipídios é compor a membrana das células e das organelas. As membranas são constituídas por dupla camada lipídica, onde aproximadamente 75% dos lipídios são fosfolipídios (Dowhan *et al.*, 2015). Os PUFA n-3 e n-6 dietéticos são incorporados na membrana fosfolipídica de todas as células e organelas e podem assim desempenhar papéis fundamentais na produção de citocinas, nos processos inflamatórios, no sistema imune e na interação célula-célula (Wander *et al.*, 1997; Basiouni *et al.*, 2012).

A membrana fosfolipídica não somente separa o conteúdo celular do ambiente externo, como também, compartimentaliza a célula e fornece o meio apropriado para realização de importantes processos bioquímicos (Gurr *et al.*, 2002). Os AG garantem o correto ambiente para o desempenho das funções das proteínas de membrana, mantendo a fluidez da membrana e a regulação dos sinais celulares, da expressão gênica e das funções celulares (Calder, 2009).

Cada um dos AGE desempenha papéis importantes na membrana celular e no sistema imune. A composição dos AG na membrana celular varia com o tipo de célula e entre as espécies, mas também é largamente afetada pela composição dos AG presentes nos alimentos consumidos pelos animais (Lund *et al.*, 1999). Estudos em cães têm evidenciado que o consumo de ingredientes ricos em EPA e DHA, por exemplo, resulta na incorporação destes AG na membrana em substituição parcial do ARA (Stoeckel *et al.* 2011; Basiouni *et al.*, 2012; Lenox & Bauer, 2013). Esta mudança estrutural modula as propriedades fisiológicas da membrana celular, levando a redução da produção de eicosanoides pró-inflamatórios e consecutivo aumento dos eicosanoides anti-inflamatórios.

De acordo com Calder *et al.* (1990) e Calder *et al.* (1994), de 15 a 20% do total de AG presentes na membrana celular estão na forma de ARA, enquanto que as concentrações de EPA e de DHA possuem níveis reduzidos. Stoeckel *et al.* (2011) observaram que a participação de ARA na composição da membrana fosfolipídica de Beagle sem suplementação de EPA e DHA é de 29,5%. Entretanto, este valor pode variar ainda entre as diferentes raças (Purushothaman *et al.*, 2011).

Waldron *et al.* (2012) observaram que mesmo quando a relação n-6:n-3 foi idêntica entre os alimentos, aqueles que consumiram óleo de peixe incorporaram mais EPA (10,17 mol%) e DHA (6,71 mol%) do que aqueles que consumiram alimento composto por óleo de linhaça (4,42 mol% e 0,36%, respectivamente). Este resultado reforça a tese de que as fontes e a composição de n-3 são mais importantes do que a relação entre n-6:n-3 quando se deseja alcançar o máximo de enriquecimento de EPA e de DHA na membrana celular.

A proporção de EPA e de DHA na membrana fosfolipídica aumenta significativamente na primeira semana e alcança o pico, aparentemente, após 8 semanas de consumo (Stoeckel *et al.*, 2011). Entretanto, a incorporação destes PUFA na membranas é variável. Judé *et al.* (2007), por exemplo, não alcançaram uma estabilidade clara na concentração de EPA e de DHA em cães após 8 semanas de suplementação com óleo de peixe. A diferença na incorporação de EPA e de DHA na membrana celular encontrada por Stoeckel *et al.* (2011) e Judé *et al.* (2007) pode ser justificada pela interferência das dietas consumidas antes do início do estudo ou ainda, pela composição, fonte, proporção e concentração dos AG de cada alimento.

A substituição do ARA por EPA e DHA na composição da membrana leva ao decréscimo da síntese de eicosanóides pró-inflamatórios, derivados do ARA, e no aumento da produção de eicosanóides menos inflamatórios ou anti-inflamatórios proveniente do EPA e do DHA (Hall *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2006). O aumento de EPA e de DHA no plasma estimula a produção de leucotrienos B₅ (LTB₅) pelos neutrófilos e, consecutivamente, aumenta a relação entre LTB₅:LTB₄ (Hall *et al.*, 2005; Waldron *et al.*, 2012).

Na membrana celular o ARA é metabolizado pela 5-lipoxigenase para se obter o leucotrieno A₄ (LTA₄) o qual é convertido a LTB₄ pela LTA₄-hidrolase. A produção de LTB₄ reflete a concentração de ARA no plasma (Hall *et al.*, 2004). Embora estudos tenham demonstrado que cães possuem a capacidade de sintetizar ARA a partir do AL, Hall *et al.* (2005) observaram que a inclusão do óleo de milho na dieta de Beagle elevou a concentração plasmática de AL, mas não teve efeito significativo sobre a concentração de ARA e da produção de LTB₄.

2.3. Proteínas de membrana

As proteínas de membrana desempenham papéis centrais e essenciais na maioria dos processos metabólicos. Elas são as moléculas mais funcionais presentes nas membranas e constituem enzimas, bombas e canais transportadores, componentes estruturais e receptores para diversas moléculas. A partir delas é possível a entrada e saída de íons e de pequenas moléculas nas células, bem como, o transporte de moléculas maiores que não podem atravessar a bicamada lipídica de forma passiva (Murray & Weil, 2015).

As funções das proteínas estão baseadas em duas características principais. A primeira é a capacidade das proteínas se ligarem de forma específica a outras moléculas e a segunda é devido ao fato de que as proteínas podem alterar sua forma e, consecutivamente, suas propriedades de ligação e funções. A assimetria das membranas é atribuída, em partes, a distribuição irregular das proteínas que a compõem (Murray & Weil, 2015).

As proteínas de membrana são classificadas em integrais ou periféricas. Embora sua distribuição varie de acordo com o tipo de célula, a maior parte das proteínas presentes nas membranas biológicas pertence a classe das proteínas integrais. Isto significa que elas interagem extensivamente com os fosfolípidos de membrana (Murray & Weil, 2015).

As proteínas periféricas, por outro lado, interagem com a superfície de membrana e são encontradas parcialmente inseridas na bicamada lipídica, onde desempenham funções específicas nas células e nas organelas. A interação dos aminoácidos hidrofóbicos é importante para estabilização da interação entre as proteínas e os lípidos das membranas biológicas (Murray & Weil, 2015).

2.4. Radicais livres, espécies reativas e estresse oxidativo

O termo radical livre é usado para designar átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados em sua camada mais externa. Esta característica os torna muito instáveis energeticamente, altamente reativos e com capacidade de combinar-se de forma inespecífica com moléculas que compõem a estrutura celular (Gilbert, 2000; Fang *et al.*, 2002; Garcez *et al.*, 2004).

O esquema de produção de radicais livres equivale a iniciação de uma reação em cadeia que demanda a presença de agentes geradores de espécies reativas (ER) ao oxigênio (ERO), ao nitrogênio (ERN) e ao cloro (ERCI), ou ainda, de metais de transição como o ferro (Fe), cobre (Cu) e manganês (Mn) (Figura 2; Tabela 2). A produção de radicais livres e de outras ER não radicalares no organismo é parte integrante do metabolismo e é resultado de processos fisiológicos que ocorrem nas mitocôndrias, no citoplasma e nas membranas.

Além de participarem ativamente na geração de energia, é reconhecido que inúmeros processos biológicos são dependentes da geração de radicais livres, tais como: transdução de sinais, transcrição gênica, regulação da atividade guanilato-ciclase solúvel, produção de sais biliares, fagocitose e mediação de resposta imune (Fang *et al.*, 2002). Por outro lado, a geração de radicais livres também é crítica, pois eles dão início a depleção de antioxidantes no plasma, são responsáveis pela deterioração de biomoléculas como lípidos, proteínas, aminoácidos e DNA (com quebras das fitas e modificação das bases) e pela redução da longevidade dos animais (Hall, 1996; Fang *et al.*, 2002; Lenox & Bauer, 2013).

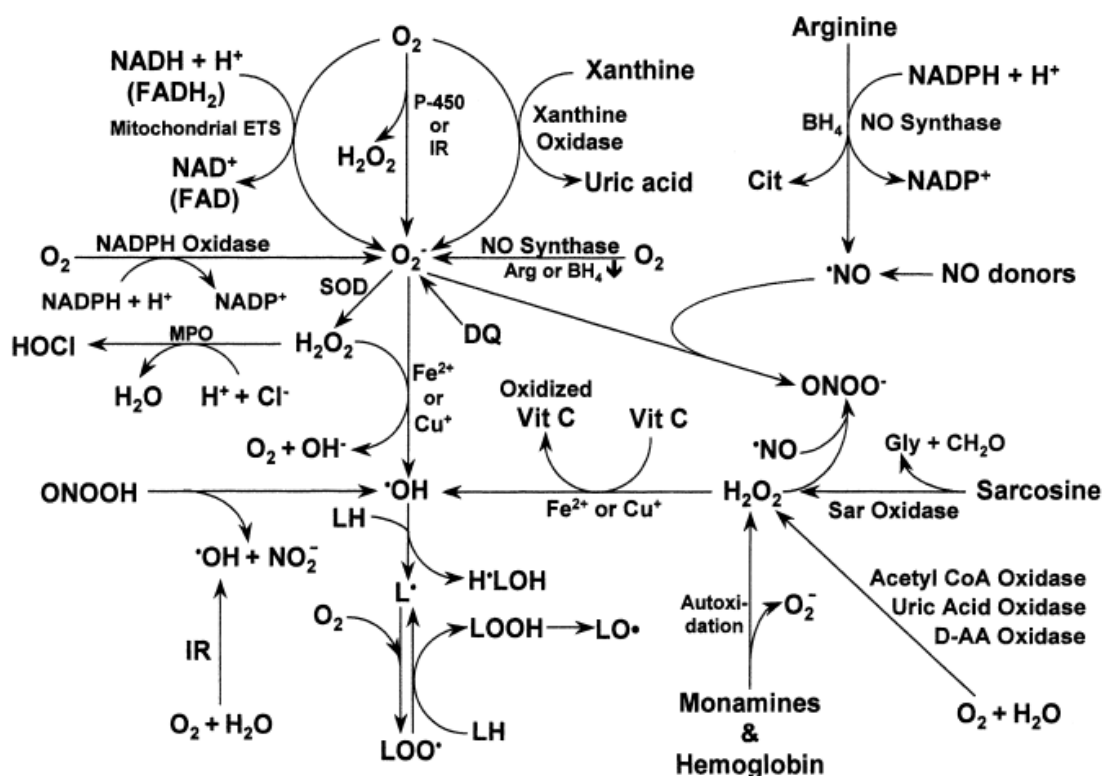


Figura 2. Produção de radicais livres (RL) de oxigênio, nitrogênio e outras espécies reativas em células de mamíferos. AA, amino ácido; Arg, L-arginina; BH₄, (6R)-5,6,7,8,-tetrahydro-L-biopterina; CH₂O, formaldeído; Cit, L-citrulina; DQ, diquat; ETS, sistema de transporte de elétrons; FAD, flavina adenina dinucleotídeo (oxidada); FADH₂, flavina adenina dinucleotídeo (reduzida); Gly, glicina; H₂O₂, peróxido de hidrogênio; HOCl, ácido hipocloroso; H·LOH, radical alcoxila de lipídio; IR, radiação ionizante; L·, radical lipídico; LH, lipídio (ácido graxo poli-insaturado); LO·, radical alcoxila de lipídio; LOO·, radical peróxido de lipídio; LOOH, hidroperóxido de lipídio; MPO, mieloperoxidase; NAD⁺, nicotinamida adenina dinucleotídeo (oxidada); NADH, nicotinamida adenina dinucleotídeo (reduzida); NADP⁺, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (oxidada); NADPH, nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (reduzida); ·NO, óxido de nitrogênio; O₂⁻, ânion radical superóxido; ·OH, radical oxidrila; ONOO⁻, peroxinitrito; P-450, citocromo P-450; PDG, glutaminase fosfato-dependente; Sar, Sarcosina; SOD, superóxido dismutase; Vit C, vitamina C; Vit E, vitamina E (α-tocoferol) (Fang *et al.*, 2002).

Tabela 2. Espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio

Espécies radicais	Espécies não radicais
Reativas ao oxigênio	
Hidroxila (OH·)	Oxigênio singlet (¹ O ₂)
Superóxido (O ₂ ⁻)	Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)
Hidroperoxila (HOO·)	Ácido hipocloroso (HOCl)
Alcoxila (RO·)	
Peroxila (ROO·)	
Peroxinitrito (ONOO·)	
Reativas ao nitrogênio	
Óxido nítrico (NO·)	Ácido nitroso (HNO ₂)
Dióxido de nitrogênio (NO ₂ ·)	Trióxido de dinitrogênio (N ₂ O ₃)
	Tetróxido de dinitrogênio (N ₂ O ₄)

Íon nitrila (NO_2^+)
 Cátion nitrosônio (NO^+)
 Ânion nitroxila (NO^-)
 Peroxinitrito (ONOO^-)
 Alquil peroxinitrito (ROONO)
 Nitril clorido (NO_2Cl)

Em condições fisiológicas normais, os sistemas antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos são capazes de manter o equilíbrio entre a geração e a eliminação dos radicais livres e das ER no organismo. Entretanto, quando a geração de ER ultrapassa a capacidade de reparo das defesas antioxidantes, instaura-se um estado conhecido como estresse oxidativo. Esta condição é inevitável no meio aeróbio, pois o processo de produção de energia (ATP) não é 100% eficiente. Estima-se que entre 1 – 4% do oxigênio consumido é convertido em O_2^- e H_2O_2 na cadeia respiratória, principal fonte de radicais livres.

A geração de ER a partir do oxigênio ocorre devido a sucessiva adição de elétrons em sua molécula durante a produção de ATP. A produção exacerbada de ERO pode induzir a formação de produtos da peroxidação lipídica e da oxidação de proteínas. Dentre os componentes celulares mais afetados pelo estresse oxidativo, possivelmente a membrana que envolve a célula e as organelas, tais como mitocôndrias, retículo endoplasmático, peroxissomas, entre outro, sejam as mais suscetíveis a oxidação. Estas membranas apresentam estrutura bilipídica, compostas principalmente por PUFA, proteínas e açúcares sensíveis a oxidação (Vasconcelo *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo tem gerado bastante interesse no meio científico pelas evidências do seu papel sobre o processo de envelhecimento, transformação e morte celular, contribuindo fundamentalmente para o desenvolvimento de inúmeras doenças em animais de companhia. Para conter estes efeitos, tem sido sugerido a suplementação nutricional de componentes antioxidantes capazes de aumentar a capacidade antioxidante e suprimir a geração e os efeitos negativos das ER e dos radicais livres (Hall *et al.*, 2005; Hall *et al.*, 2006).

2.5. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é caracterizada como uma cascata de eventos bioquímicos resultantes da ação das ER sobre os PUFA das membranas celulares, gerando principalmente radicais alquila (L^*), alcoxila (LO^*) e peroxila (LOO^*) (Lima & Abdalla, 2001). O processo de peroxidação é dividido em três etapas: iniciação, propagação e terminação. A fase de iniciação ocorre com a abstração de um átomo de hidrogênio do grupo metileno alílico do PUFA pela ER, deixando um elétron desemparelhado no carbono. Em seguida, ocorre a etapa de propagação em que o carbono radical L^* reage com uma molécula de oxigênio (O_2) e forma o radical LOO^* , o qual reage com H^* abstraído de outra molécula de AG da membrana e forma o hidroperóxido de lipídio (LOOH).

A terceira e última etapa da peroxidação lipídica é a terminação. Esta fase instala-se quando os componentes oxidáveis forem completamente consumidos e só existirem radicais livres no meio. Os elétrons desemparelhados dos radicais

livres interagem entre si e se estabilizam com o pareamento de seus elétrons solitários e interrupção da reação em cadeia.

Embora os ácidos graxos saturados e os monoinsaturados não sofram peroxidação, os PUFA AL, ARA, ALA, EPA e DHA são altamente suscetíveis a sofrerem peroxidação devido a quantidade de insaturações presentes em suas moléculas (Lenox & Bauer, 2013; Davies & Guo, 2013). Assim, as membranas fosfolipídicas que envolvem as células e as organelas são muito sensíveis a ação dos radicais livres, podendo desencadear reações de auto-oxidação, com formação de novos radicais LOOH.

A peroxidação das membranas gera consigo alterações estruturais, sobre tudo perda da elasticidade. A fluidez da membrana plasmática está intimamente relacionada com a presença das cadeias insaturadas dos fosfolipídios, das proteínas transportadoras e do colesterol. O sistema de transporte, inclusive a bomba de Na^+K^+ /ATPásica, se desestabiliza, não funciona adequadamente e perde a seletividade para entrada e saída de nutrientes e componentes tóxicos para a célula. Além disso, pode ocorrer expansão de líquidos intracelulares com risco de ruptura da membrana e subsequente apoptose celular.

Apesar da importância dos PUFA n-3 para a saúde dos animais, poucos estudos em animais de companhia avaliaram o efeito do consumo de níveis elevados de n-3 sobre a peroxidação da membrana fosfolipídica. Além disso, os estudos disponíveis na literatura apresentam resultados conflitantes que dificultam sua interpretação.

Wander *et al.* (1997), por exemplo, observaram aumento nos níveis de coprodutos da peroxidação lipídica e redução nos níveis de α -tocoferol plasmático quando alimentaram cães com dietas contendo óleo de peixe com relação n-6:n-3 de 1,4:1 em comparação aos animais que consumiram dietas com relação 31:1. Por outro lado, LeBlanc *et al.* (2005) não encontraram nenhuma alteração na concentração de coprodutos da oxidação lipídica no plasma após alimentar cães com dietas contendo 1,75 g de EPA/kg e 2,2 g de DHA/kg de alimento durante 12 semanas, independente da suplementação ou não de vitamina E.

Embora no estudo de Wander *et al.* (1997) não se tenha observado efeitos clínicos adversos à peroxidação lipídica, ela pode ter se manifestado como deficiência de vitamina E. A capacidade antioxidante da vitamina E (especialmente α -tocoferol) é devida a aptidão de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres, bloqueando a propagação em cadeia e prevenindo os danos oxidativos aos PUFA presentes nas membranas (NRC, 2006; FEDIAF, 2016).

Um dos efeitos adversos de alimentos ricos em n-3 é que estes AG podem se acumular nos tecidos tornando-os mais suscetíveis a peroxidação lipídica, especialmente se o processo oxidativo comprometer os mecanismos antioxidantes do organismo. Portanto, níveis adequados de antioxidantes em dietas enriquecidas com n-3 devem ser fornecidos para prevenir a peroxidação lipídica nos tecidos. Caso contrário, a membrana fosfolipídica torna-se vulnerável aos efeitos negativos dos radicais livres, com geração de coprodutos da peroxidação e formação de lipofuscina (Hall, 1996; Wander *et al.*, 1997).

A vitamina E está presente em pequenas quantidades na maioria dos tecidos e é incorporada na membrana fosfolipídica como importante

antioxidante. As necessidades de vitamina E estão associadas ao nível de consumo de PUFA e a presença de outros antioxidantes no alimento (FEDIAF, 2016). Estudos em cães sugerem que o consumo elevado de EPA e DHA pode gerar deficiência de vitamina E, devido ao aumento das insaturações na membrana fosfolipídica e a necessidade de combater a oxidação pelos radicais livres (Wander *et al.*, 1997; LeBlanc *et al.*, 2005). Entretanto, Kearns *et al.* (1999) não observaram nenhuma influência da suplementação de n-3 sobre o *status* do α -tocoferol sérico em cães jovens e idosos.

2.6. Oxidação da proteína

As proteínas de membrana são suscetíveis a modificações químicas pela interação com radicais livres. De acordo com Vasconcelos *et al.* (2007), o primeiro passo para oxidação das proteínas é a formação de um radical pela extração do H[•] centrado no carbono α da ligação peptídica. Embora muitas das cadeias laterais não sejam afetadas pelo estresse oxidativo, outras são extremamente sensíveis a ação das ERO e das ERN (Houglund *et al.*, 2013). As proteínas celulares possuidoras de grupos sulfidríla são as mais suscetíveis a transformar-se em radicais livres.

Após o processo de extração do H[•], as cadeias laterais de aminoácidos são fragmentadas e oxidadas, gerando compostos carbonilados a partir da prolina, arginina e lisina. As reações de terminação interrompem a cadeia e alteram a conformação da proteína. A mudança estrutural afeta as funções de receptores, enzimas, anticorpos e proteínas transportadoras. Sob estresse oxidativo os resíduos de cisteína podem ser oxidados a dissulfeto ou ácido cisteico, que são tóxicos para cães. Da mesma forma, a metionina pode ser oxidada a sulfóxido ou sulfona.

De acordo com Bender (2015), o dano oxidativo aos resíduos de tirosina da proteína pode levar a formação de dihidroxifenilalanina, um precursor da dopamina, o qual sofre reações não enzimáticas e conduz a produção de radicais livres citotóxicos. As modificações químicas nos aminoácidos das proteínas, como resultado direto das reações com radicais livres ou com seus subprodutos, levam ao não reconhecimento da própria proteína pelo sistema imunológico. Como resultado, o organismo produz anticorpos para combater esta nova molécula que acaba por também reagir com proteínas normais, iniciando muitas vezes doenças autoimunes.

2.7. Antioxidantes

Os antioxidantes são definidos como qualquer substância que quando presente em baixa concentração, comparada ao substrato oxidável, regenera o substrato ou previne a oxidação do mesmo de forma eficiente (Sies & Stahl, 1995; Zicker *et al.*, 2006). Os substratos oxidáveis variam desde componentes orgânicos presentes nos alimentos, até tecidos vivos como, proteínas, carboidratos, lipídios e DNA. Desta maneira, os antioxidantes podem preservar a integridade estrutural e funcional das células e garantir o *status* oxidativo do organismo.

Para minimizar os efeitos negativos do estresse oxidativo, o organismo possui basicamente dois sistemas de defesa antioxidante, o sistema enzimático (endógeno) e o não enzimático (exógeno). Ambos sistemas possuem

capacidade de combater radicais livres e ER, minimizando os efeitos deletérios (Fang *et al.*, 2002). O mecanismo de ação dos antioxidantes é extremamente variável. Inicialmente, podem impedir a formação de ER, interceptar radicais gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas, aumentar a produção de antioxidantes endógenos e, em alguns casos, podem reparar lesões causadas pelos radicais.

Vale ressaltar, que os componentes antioxidantes ao doarem seus elétrons para um radical livre, o estabilizam, mas se tornam, eles próprios, uma ER. Estas ER, porém, são mais estáveis e impedem que as reações em cadeia se propaguem. Dentro desta perspectiva, temos como exemplo, a vitamina E que ao doar um elétron para o radical livre, torna-se um radical tocoferoxil. Por este motivo, recomenda-se que a suplementação de vitamina E seja considerada com cautela, pois o excesso dela no organismo pode gerar uma situação pró-oxidante, caso ela não seja reduzida novamente (Pearson *et al.*, 2006). Isso ocorre devido ao fato de que a vitamina E possui um *turnover* baixo e o processo de eliminação é lento, podendo se acumular no organismo como radical tocoferoxil. Essa é uma das razões pela qual a vitamina E deve trabalhar em conjunto com a vitamina C, que é responsável pela regeneração da vitamina E para sua forma reduzida.

A detoxificação das ER do organismo depende da sincronização dos mecanismos antioxidantes dos sistemas enzimáticos e não enzimáticos que atuam de forma cooperativa (Figura 2). Sob este contexto, os alimentos para animais de companhia possuem papel fundamental nesta sincronização, tendo em vista que são responsáveis pelo fornecimento de componentes com capacidade antioxidante para os animais.

2.7.1. Enzimáticos

O sistema enzimático contribui para a manutenção da homeostase e é considerado como a primeira linha de defesa antioxidante do organismo. Este sistema é composto, principalmente, pelas enzimas glutathiona peroxidase (GSH-Px), peroxirredoxina (Prx), catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona redutase (GR), que protegem os compartimentos celulares contra a ação das ER (Molavian *et al.*, 2015). Estas enzimas neutralizam ou minimizam os efeitos deletérios do excesso de ERO e ERN produzidos no metabolismo celular, doando ou recebendo elétrons.

2.7.1.1. Superóxido dismutase (SOD)

A SOD é uma metaloenzima abundante em células aeróbias e tem como principal função a dismutação do radical superóxido (O_2^-) a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que é menos reativo e pode ser degradado a H_2O e O_2 por outras enzimas com propriedades antioxidantes, como a GSH-Px e a CAT (Borella & Varela, 2004). A dismutação do O_2^- pelo SOD é relatada na literatura como defesa primária do organismo por que ela previne o acúmulo deste radical a partir da cadeia respiratória. De acordo com Fridovich (1995), a taxa de dismutação induzida pelo SOD é aproximadamente 10^4 vezes maior do que a dismutação química.

Atualmente, quatro tipos de SOD estão bioquimicamente caracterizadas (SODCu/Zn; SODMn; ECSOD e SODFe) (Borella & Varela, 2004). Destas, as

mais relevantes são a SODCu/Zn, localizada no citosol, nos lisossomas, núcleo e entre as membranas interna e externa da mitocôndria e a SODMn, localizada especificamente na mitocôndria.

2.7.1.2. Catalase (CAT)

A CAT é uma ferrihemoenzima encontrada em pequenas porções na mitocôndria, nos cloroplastos, no retículo endoplasmático e mais intensamente nos peroxissomas, principal organela responsável pela desintoxicação celular e pela oxidação dos PUFA. Em células eucarióticas, foram identificados dois tipos de catalases, uma citosólica e outra peroxissomal codificadas pelo gene CTT1 e CTA1, respectivamente (Spevak *et al.*, 1986). Ambas catalases possuem como principal função a dismutação do H_2O_2 em água e oxigênio molecular.

O papel da CAT na eliminação do H_2O_2 é de fundamental importância para a estabilidade oxidativa, pois este peróxido pode gerar radical hidroxila (OH^{\cdot}) a partir das reações de Fenton e de Haber-Weiss, contra o qual não há sistema enzimático capaz de neutralizar. Assim, enzimas capazes de decompor o H_2O_2 , como a CAT e a GSH-Px, são fundamentais. Por apresentar um k_m maior do que o da GSH-Px, a CAT atua em locais com concentrações elevadas de H_2O_2 enquanto que a GSH-Px age sobre baixas concentrações.

A atividade da CAT depende do órgão e do tecido onde é formada. Nos animais, as maiores concentrações estão presentes no fígado e nos rins. Assim, alguns órgãos como coração, pulmões e cérebro, estão mais suscetíveis a sofrerem os danos causados pela produção de ERO. Estes órgãos não possuem peroxissomas e por isso, contém baixa concentração de CAT (Borella & Varela, 2004).

2.7.1.3. Glutationa peroxidase (GSH-Px)

As peroxidases são enzimas que usam redutores celulares para inativar peróxidos (Borella & Varela, 2004). Em mamíferos, as principais peroxidases são dependentes de glutatona e, junto com a atividade das tioredoxinas redutases (TRs), estão envolvidas com uma variedade de enzimas-chaves, fatores de transcrição e receptores (Molavian *et al.*, 2015). Já foram identificadas sete formas de GSH-Px, das quais quatro são selênio-dependente e com ação antioxidante.

A GSH-Px 1 ou citosólica está presente no citosol de todas as células do corpo e sua função é catalisar ou reduzir H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos livres em H_2O e álcool. A GSH-Px 2 ou gastrintestinal está disponível especificamente no trato gastrintestinal e no fígado. Esta GSH-Px protege o trato gastrintestinal dos efeitos dos hidroperóxidos que passam por ele ao longo do processo digestório. A GSH-Px 3 ou plasmática – encontrada no plasma dos mamíferos, serve de barreira antioxidante para o sangue e protege as células endoteliais dos danos oxidativos e a GSH-Px 4 ou fosfolípido hidroperóxido atua sobre os peróxidos de resíduos de ácidos graxos nas membranas e nas lipoproteínas.

O papel primário da GSH-Px é atuar na defesa do organismo contra os efeitos deletérios do estresse oxidativo. Estas enzimas catalisam a redução do H_2O_2 e do hidroperóxido orgânico, os quais reagem com o grupo selenol do centro ativo da selenocisteína (Zicker *et al.*, 2006). A GSH-Px funciona como um

antioxidante intracitoplasmático que protege a membrana celular pela desativação da peroxidação lipídica.

2.7.2. Não enzimáticos

O sistema não enzimático corresponde a moléculas com capacidade antioxidante produzidas *in vivo* (glutathiona, ácido úrico e ubiquinona) ou obtidas a partir dos alimentos, classificadas como naturais (arginina, taurina, selênio, zinco, vitamina E, vitamina C, vitamina A e polifenóis) ou sintéticas (BHT, BHA, TBHQ e etoxiquim). De modo geral, os antioxidantes sintéticos são empregados com o intuito de garantir a conservação dos óleos e das gorduras presentes nos ingredientes e alimentos para animais de companhia. Entretanto, apesar de serem incluídos na lista de substâncias “geralmente aceitas como seguras”, alguns estudos têm relacionado estes componentes com o desenvolvimento de tumores (Hilton, 1989). Por este motivo, muitos tutores passaram a buscar dietas isentas de antioxidantes sintéticos.

Este cenário, contribuiu para que os antioxidantes naturais ganhassem cada vez mais espaço no mercado. Além dos componentes tradicionalmente incluídos em alimentos para animais de companhia, ingredientes alternativos como extratos vegetais e espécies de algas (*Spirulina máxima* e *Schizochytrium sp.*) também têm chamado atenção por sua capacidade antioxidantes baseada, principalmente nos ácidos fenólicos e flavonóides.

Selênio (Se)

O Se está presente em pequenas quantidades em todas as células e tecidos dos animais, principalmente no fígado, nos rins e no músculo (NRC, 2006). A extensão a qual o Se é absorvido a partir do trato gastrintestinal e sua retenção e distribuição no corpo depende da espécie animal, forma química e quantidade presente nos ingredientes. O conteúdo de Se varia largamente entre as fontes de origem vegetal e animal. Nem sempre os ingredientes mais ricos neste mineral são aqueles que oferecem maior biodisponibilidade. As formas orgânicas como selenometionina e selenocisteína são mais eficientemente absorvidas do que as formas inorgânicas como selenito e selenato (Bopp *et al.*, 1982).

O Se exerce papéis fundamentais no organismo como ação anticarcinogênica, potencialização do sistema imunológico, participação na conversão de T₄ em T₃, detoxificação do organismo contra metais pesados e xenobióticos, estabilização do metabolismo do ácido araquidônico e favorecimento da síntese de metionina a partir da homocisteína (Waters *et al.*, 2003; Donadio *et al.*, 2016). Entretanto, a principal função biológica do Se está associada ao equilíbrio antioxidante com a sua incorporação nas selenoproteínas, principalmente, GSH-Px, tioredoxina redutase (TRs) e selenoproteína P (SePP), as quais inativam os efeitos adversos dos radicais livres nas células.

A SePP, por exemplo, é uma proteína plasmática de origem hepática, que atua como antioxidante extracelular associada ao endotélio vascular (Donadio *et al.*, 2016). Esta selenoproteína reduz o peroxinitrito (ONOO⁻) formado a partir da oxidação do óxido nítrico (NO^{*}). Outro exemplo de ação antioxidante desempenhado pelo Se é baseado na inter-relação que o Se possui com a

vitamina E. O átomo de Se é ligado covalentemente aos resíduos de cisteína nas enzima GSH-Px e atua sinergicamente com a vitamina E como antioxidante natural na proteção do organismo. O Se, através da GSH-Px, funciona como antioxidante intracitoplasmático enquanto que a vitamina E desempenha maior papel como antioxidante intramembrana. Desta forma, muitas vezes o Se age como um poupador de vitamina E (NRC, 2006).

De acordo com Zelst *et al.* (2016), o fornecimento de níveis reduzidos de selênio via dieta acarretam em concentrações menores deste elemento mineral no organismo e, por conseguinte, menor produção de GSH-Px, tornando as células e os tecidos mais suscetíveis aos efeitos deletérios dos radicais livres.

Farinha de algas *Schizochytrium sp.*

Algas marinhas representam importante fonte de PUFA n-3. De acordo com Hadley *et al.* (2017), as algas *Schizochytrium sp.* apresentam aproximadamente 20% do seu peso seco como DHA. A concentração deste PUFA pode atingir mais de 50% no óleo após sua extração e refinamento, fazendo deste ingrediente uma fonte rica neste nutriente. Além disso, as algas marinhas exibem também vasto espectro de propriedades biológicas benéficas, incluindo: antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antimicrobiana e atividade antidiabética (Shanura Fernando *et al.*, 2016).

O papel antioxidante das algas começou a ser investigado no Japão a partir da busca por aditivos substitutos ao BHT e ao BHA que apresentavam potencial carcinogênico (Rocha *et al.*, 2007). Os pesquisadores desejavam entender o mecanismo pelo qual as algas secas, mesmo contendo mais de 30% dos AG totais na forma de PUFA, conseguiam manter-se estocadas por longos períodos de tempo sem sofrerem danos oxidativos. Muitos estudos subsequentes foram realizados e se observou que as algas possuem intensa atividade antioxidante. Parte desta atividade antioxidante é garantida pelos fosfolípidios (fosfatidiletanolamina e fosfatilinosítido), carotenóides (fucoxantina, astaxantina e luteína) e componentes fenólicos (ácido gálico, protocatequinas, ácido cafeico, entre outros) presentes em sua estrutura.

O consumo de alimentos ricos em componentes bioativos e antioxidantes tem sido relatado como promotor de saúde pela minimização dos danos causados pelo estresse oxidativo. Sachindra *et al.* (2007), por exemplo, observaram aumento na eliminação de radicais livres e do oxigênio *singlet* pelos carotenóides e pelas fucoxantinas presentes nas algas marinhas. Estes componentes exibiram atividade antioxidante comparáveis as observadas no α -tocoferol. Por esta razão, as características observadas em espécies de microalgas despertaram o interesse de pesquisadores e de empresas para inclusão deste ingrediente na alimentação humana. Similarmente, a extensão desta prática também é observada em alimentos para animais de companhia.

Recentemente, Ogoshi *et al.* (2016), avaliaram a capacidade antioxidante de uma mistura comercial a base de algas para gatos nos níveis de 0, 250, 500 e 750 mg/kg de dieta. Os animais foram submetidos a estresse por meio da presença de cães próximos ao recinto experimental. Os autores observaram que a suplementação com 500 e 750 mg do antioxidante/kg de dieta atenuou o estresse nos gatos pelo aumento da pressão parcial do dióxido de carbono (pCO_2).

Ácido ascórbico (vitamina C)

Apesar da vitamina C não ser um nutriente essencial para cães, ela é importante em vários processos metabólicos. A maioria dos animais e das plantas conseguem sintetizar o ácido ascórbico a partir da glicose (NRC, 2006). Entretanto, a taxa da síntese de vitamina C no fígado de cães é menor do que em outras espécies animais e suas necessidades de vitamina C podem exceder a capacidade de síntese em situações de estresse (NRC, 2006; Hesta *et al.*, 2009).

Nos alimentos para animais de companhia, o ácido ascórbico é facilmente destruído por processos oxidativos quando exposto a alta temperatura, iluminação, enzimas e minerais como ferro e cobre (Case *et al.*, 2011). Apesar de não ser essencial para cães, a suplementação com ácido ascórbico pode aumentar a estabilidade de nutrientes, como a vitamina E, e proteger os tecidos contra os danos causados pelo estresse oxidativo. Após a oxidação da vitamina E ao radical tocoferoxil, o ácido ascórbico atua como agente redutor e doa um elétron para o radical tocoferoxil, reduzindo-o à sua forma original. O ácido ascórbico atua eficientemente sobre o $O_2^{\cdot-}$, o H_2O_2 , o HOCl, a OH^{\cdot} e a LOO^{\cdot} .

Kronfeld & Donoghue (1988) relataram que as concentrações plasmáticas de vitamina C diminuem em cães de trenó que realizam exercícios de resistência intensa e que a suplementação com vitamina C beneficia os cães alimentados com dietas ricas em gordura. Heaton *et al.* (2002), verificaram que a inclusão de componentes antioxidantes (vitamina C, vitamina E, taurina, luteína, licopeno e β -caroteno), em alimentos para cães, aumenta a concentração plasmática da atividade antioxidante, reduz os danos sofridos pelo DNA e melhora a resposta vacinal. Por outro lado, Hesta *et al.*, (2009) demonstraram que quando níveis adequados de vitamina E foram fornecidos aos cães, a suplementação de vitamina C não apresentou nenhuma mudança clara na capacidade antioxidante. Da mesma forma, Marshall *et al.* (2002) observaram que a administração de vitamina C para galgos em exercício não afetou a concentração de vitamina E circulante, TBARS, como marcador oxidativo, e a capacidade antioxidante total.

3. HIPÓTESES E OBJETIVOS

Hipóteses:

1. O consumo de dietas ricas em ácidos graxos poli-insaturados produz um maior desafio redox para o tecido.
2. O aumento do desafio oxidativo no tecido, instituído pela maior presença de ácidos graxos poli-insaturados, há o aumento da perda de grupos sulfidríla e a formação de derivados carbonila
3. O consumo de antioxidante natural a base de alga, via dieta, preserva o *status* oxidativo tecidual quando cães consomem uma dieta poli-insaturada.

Objetivo

Este estudo avaliou os efeitos de dietas contendo sebo bovino (saturadas) ou óleo de soja enriquecido com DHA (insaturada), suplementadas ou não com antioxidante natural a base de algas sobre os fatores bioquímicos que medem a oxidação tecidual no soro e nos eritrócitos.

CAPÍTULO II

Effect of the consumption of polyunsaturated fatty acids on the oxidative status of adult dogs

Este capítulo é apresentado de acordo com as normas de publicação do
JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE

Running head: Dietary PUFA and oxidative status in dogs

**Effects of the consumption of polyunsaturated fatty acids on the oxidative status of
adult dogs¹**

**Gabriel F. E. Pacheco^{2*} Rafael C. Bortolin[†] Paloma R. Chaves[‡] José C. F. Moreira[‡]
Alexandre M. Kessler^{*} and Luciano Trevizan^{*}**

^{*} Department of Animal Science, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, 91540-000, Brazil

[†] Department of Civil and Environmental Engineering, Universidad de La Costa, Calle 58 # 55-66, CP 080002, Barranquilla, Atlántico, Colombia

[‡] Department of Biochemistry - Institute of Basic Health Sciences of the Federal University of Rio Grande do Sul, 90035-003, Brazil

ABSTRACT: The present study evaluated the alterations of the oxidative stress markers in adult dogs fed with high levels of polyunsaturated fatty acids from the mixture of soybean oil enriched with docosahexaenoic acid (DHA) and supplemented with a natural algae-based antioxidant. Twelve healthy adult (2 years old) Beagle dogs (6 males and 6 females, 11.20 ± 1.92 kg body weight), were distributed in 2 completely randomized blocks and fed with 4 experimental diets coated with 2 lipid sources: saturated (13% bovine tallow) or unsaturated (13% soybean oil enriched with DHA), supplemented or not with 500 mg of algae-based natural antioxidant (AOX) for 4 wk,

¹ The authors are grateful for the financial support provided by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasília - Brazil)

² Corresponding author: gfpacheco@hotmail.com

intercalated with a 4 wk adaptation period. Blood samples were collected on days 0, 15, and 30 of each block. Glutathione peroxidase (GSH-Px), superoxide dismutase (SOD), sulfhydryl group (SH), protein carbonylation, thiobarbituric acid reactive substances (TBARS), and total reactive antioxidant potential (TRAP) were evaluated in the serum, while GSH-Px, SOD, glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT), SH, and TBARS were measured in erythrocytes. There was no significant difference in most of the oxidative markers evaluated. In contrast, GST activity in erythrocytes was greater in the animals that consumed the diets coated with bovine tallow compared to animals that consumed diets coated with soybean oil enriched with DHA ($P < 0.05$). Serum from animals fed on diets supplemented with AOX presented greater TRAP values ($P < 0.05$). These data demonstrate that the concentrations of unsaturated fatty acids used in the diets for dogs were not sufficient to cause large changes in the oxidative status. It was not possible to evaluate the efficiency of the natural antioxidant in maintaining the oxidative balance of the animals as it appears that the oxidative status of the dogs was not challenged by the unsaturated diets. Our findings also suggests that dogs, as descendants from carrion carnivores, may have some natural protection against oxidation.

Key words: algal meal, canines, free radicals, lipid oxidation, oxidative stress, polyunsaturated fatty acids

INTRODUCTION

Ingredients rich in polyunsaturated fatty acids (PUFA) omega-3 (n-3) have been added to diets for pets due to their beneficial health potential for the animals (Hall et al., 2011; Hadley et al., 2017). However, experimental data that show the effect of such

additions on the oxidative status in dogs, are scarce (Hall et al., 2003; LeBlanc et al., 2005). Algae meal is rich in n-3 fatty acids, especially eicosapentaenoic acid (**EPA**) and docosahexaenoic acid (**DHA**). When consumed, EPA and DHA accumulate in the cell membrane and play a key role in membrane structure and cellular functions (Calder, 2012). Because they have a high number of double bonds in their molecules, PUFA are highly susceptible to peroxidation. Thus, it is recommended to include adequate concentrations of antioxidants in the diets to reduce the vulnerability of the cell membrane to the action of free radicals and nitrogen reactive species (**NRS**) and reactive oxygen species (**ROS**) (Wander et al., 1997). The imbalance between the production of free radicals and the ability of the body's antioxidant systems to eliminate them is known as oxidative stress. The inclusion of natural ingredients with antioxidant properties has been investigated in companion animals (Salas et al., 2008; Ogoshi et al., 2016), mainly because supplementation with synthetic antioxidants, such as butylated hydroxytoluene (**BHT**) and butylated hydroxyanisole (**BHA**), has been perceived as unwanted by the owners. The present study evaluated the alterations of the oxidative stress markers in adult dogs fed with high levels of unsaturated fatty acids from the mixture of soybean oil enriched with DHA supplemented with natural algae-based antioxidant. Our hypothesis is that diets with greater concentrations of PUFA may require greater amount of tissue antioxidants in order to preserve the stability of the cell membranes.

MATERIALS AND METHODS

All procedures performed on the dogs were approved by the ethics committee of the Federal University of Rio Grande do Sul prior to the commencement of the

experimental period, protocol number 29989, and were conducted according to ethical and animal welfare standards.

Experimental design and animals

Twelve, healthy, adult (aged 2 years old) Beagle dogs [6 males and 6 females, 11.20 ± 1.92 kg body weight (**BW**)], with a body condition score of 3.40 ± 0.23 based on a 5-point scale (Case et al., 2011), were used in a randomized block design with 4 treatments and 2 blocks during the 8 wk study period. Each block included a 4 wk adaptation phase in which all dogs received the same extruded commercial diet (Topi Dog, Nutribarrasul Alimentos Pet Ltda, Rio Grande do Sul, Brazil), free of long chain polyunsaturated fatty acids (**PUFACL**) derived from fish oil. This period was used to standardize the oxidative status of the animals. After the adaptation period, the dogs were fed the experimental diets. The dogs were individually allocated in metabolic cages ($0.80 \times 0.70 \times 0.90$ m) equipped with feeders and drinkers in an air-conditioned room with a temperature of 24°C and photoperiod control (14 h light: 10 h dark). The dogs were fed to maintain BW during the experiment. The BW was measured once a week and the amount of food was often adjusted when the BW decreased or increased by > 0.05 kg. The amounts supplied were initially calculated based on the metabolizable energy content, which was estimated from the chemical composition of the diet, to meet the energy requirement recommended by NRC (2006) for the maintenance of dogs. The dogs were fed twice a day (0800 h and 1800 h) and had ad libitum access to fresh water throughout the experimental period.

Prior to the experiment, all dogs were vaccinated and evaluated with complete blood count and biochemical profiles, parasitological tests, and clinical examinations to ensure their health.

Experimental diets

The basal diet was produced by Nutribarrasul Alimentos Pet Ltda (Rio Grande do Sul, Brazil) (Table 1) and designed to be supplemented with one of two lipid sources: 13 g of bovine tallow or 13 g of soybean oil enriched with DHA (All-G-Rich, CCAP 4087/2; Alltech Inc., Nicholasville, KY)/100 g of basal diet. Four experimental diets were prepared using each of the lipid sources, supplemented or not supplemented with 500 mg of an algae-based natural antioxidant (Economase, Alltech Inc. Araucária, Brazil)/kg diet: 1) soybean oil enriched with DHA (**UNS**, unsaturated fatty acid), 2) soybean oil enriched with DHA and the natural algae-based antioxidant (**UNS AOX**, unsaturated fatty acid + Economase), 3) bovine tallow (**SAT**, fatty acid saturated fat), or 4) saturated fatty acid with the natural algae-based antioxidant (**SAT AOX**; saturated fatty acids + Economase) (Table 2). This level of AOX supplementation has been seen to have a beneficial effect on cats (Ogoshi et al., 2016). All diets were formulated to guarantee the nutritional and energetic needs of adult dogs (FEDIAF, 2016).

Blood collection

Blood samples were collected on days 0, 15, and 30 of each experimental block. After 12 h nocturnal fasting, blood samples were obtained by venous puncture of the cephalic vein using two vacutainer tubes: one containing EDTA for collection of erythrocytes and one without EDTA for serum collection (final concentration, 1.5 g/L for each tube). The erythrocytes and serum were extracted by centrifugation at $3000 \times g$ for 10 min and stored at -80°C for subsequent analyzes. The erythrocytes were used to analyze the sulfhydryl group (**SH**), the enzymes catalase activity (**CAT**), glutathione peroxidase activity (**GSH-Px**), superoxide dismutase activity (**SOD**), glutathione S-transferase activity (**GST**) and thiobarbituric acid reactive substances (**TBARS**), while

the SH, protein carbonylation (**PC**), GSH-Px activity and SOD enzymes activity, TBARS, and the total reactive antioxidant potential (**TRAP**) were analyzed in the serum.

Quantification of antioxidant enzymatic activity

The activity of SOD (EC 1.15.1.1) in the erythrocytes was determined by the quantification of the adrenaline auto-oxidation inhibition in a spectrophotometer at 480 nm, as previously described by Misra and Fridovich (1972). The same protocol was used to determine the extracellular activity of CuZn-SOD (**EC-SOD**) in the serum samples. Results are reported as the unit of SOD/mg protein. The activity of blood CAT (EC 1.11.1.6) was determined by measuring the rate of H₂O₂ decomposition from the absorbance reading in a spectrophotometer at 240 nm (Aebi, 1984). The CAT activity is expressed as units of CAT/mg protein. The activity of GSH-Px (EC 1.11.1.9) was determined by measuring the oxidation rate of NADPH in a spectrophotometer at 340 nm, as previously described by Wendel (1981). GSH-Px activity was expressed as the unit: (nmol NADPH oxidized/min)/mg protein.

Measurement of non-enzymatic antioxidant defenses

The TRAP test was used as an indicator of plasma non-enzymatic antioxidant capacity based on the peroxy radical [generated by AAPH solution, 2,2'-azobis (2-amidino propane), with luminol] extracted from the components of the serum sample (Lissi et al., 1992). The reading was taken by chemiluminescence emission. Briefly, the AAPH solution was prepared and the luminol (system) was added. The first reading was only taken after a period of 2 h during which the system stabilized. Readings took 60 min to complete after the addition of each sample. The results were transformed into percentages and the area under the curve (**AUC**) was calculated by GraphPad software

(San Diego, CA, USA) as described by Dresch et al. (2009). When the AUC of the sample was lower than that of the system, the sample had a higher antioxidant capacity.

Quantification of sulfhydryl group

The oxidative status of the thiol group was analyzed to quantify the total reduced SH in the sample (Ellman, 1959). Briefly, to measure total SH content, an aliquot of 100 µg of sample (erythrocyte or serum) was diluted in phosphate buffered saline and 10 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid and read in the spectrophotometer at 412 nm after 60 min of incubation at 25°C.

Protein carbonylation

Oxidative damage to serum protein was measured by quantification of the carbonyl group, based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH) (Levine et al., 1990). The protein was precipitated by the addition of 10% trichloroacetic acid and was re-solubilized in DNPH. The absorbance was then read in a spectrophotometer at 370 nm. The results are presented as nmol of carbonyl/mg protein.

Lipid peroxidation

The TBARS test was used as an indicator of plasma lipid peroxidation, which is widely accepted as a method to measure the lipid redox status, as previously described by Draper and Hadley (1990). The TBARS consisted of the reaction of the final product of lipid peroxidation, malondialdehyde (MDA) with thiobarbituric acid (TBA, 4,6-dihydroxypyrimidine-2-thiol) under heating and low pH. The TBARS were determined at 532 nm and expressed as nmol/mg lipid.

Statistical analysis

All data were analyzed by analysis of variance (ANOVA) using the statistical package SAS University Edition. Contrasts were used to evaluate the effect of lipid

sources and natural algae antioxidant supplementation (UNS vs. SAT and AOX vs. without AOX). The data were subjected to a normality test. Values that did not show normal distribution were transformed using log and square root. The statistical model used the degree of saturation, block, and treatment. The values of $P < 0.05$ were considered significant.

RESULTS

The dogs consumed diets enriched with 13% bovine tallow or with 13% soybean oil enriched with DHA without any evidence of refusal or any digestive disorder. All animals consumed 100% of the daily allocated feed and maintained body weight and body condition score throughout the experimental period. Throughout the experimental period, the dogs weighed (mean \pm standard deviation) 12.0 ± 1.42 , 12.0 ± 2.10 , 11.0 ± 2.40 , and 11.0 ± 1.43 kg for UNS, UNS AOX, SAT, and SAT AOX experiments, respectively. The body condition score was also stable throughout the study, with mean values of 3.5, 3.7, 3.4, and 3.3 for UNS treatments; UNS AOX; SAT and SAT AOX, respectively, with score 3 being the ideal on the 5-point scale that was used (Case et al., 2011).

Lipid oxidation

There was no evidence of lipid peroxidation in dogs in any of the treatments. The value of TBARS in serum and erythrocytes did not differ significantly between the four treatments, nor within each treatment over the experimental period (Table 4 and Table 5).

Enzymatic antioxidant activity in erythrocyte and serum

The antioxidant activity of GSH-Px and SOD enzymes showed no significant difference between serum and erythrocyte treatments regardless of the lipid source used in the diet and the presence or absence of AOX. No change in CAT activity was observed in erythrocytes of dogs fed any of the treatments. On the other hand, GST activity increased ($P < 0.05$) in the erythrocytes of the animals fed with diets coated in sebum compared to the animals fed diets coated with soybean oil enriched with DHA (Table 5).

Non-enzymatic antioxidant defense in red cells and serum

Substances such as polyphenols, vitamin E, vitamin C, glutathione, taurine, and reduced SH have chemical characteristics that directly affect the antioxidant balance of serum and tissues. Although the level of each of these components was not determined in the experimental diets, we observed a drop ($P < 0.05$) in the free radical scavenging potential, which was detected in sera from dogs supplemented with AOX, as determined by the TRAP test.

Protein oxidation

The level of protein oxidation, measured by the quantification of the carbonyl group in the serum and by the thiol content in the serum protein and erythrocytes, did not change during the experimental period. No effect of treatments was observed at any of the evaluated times.

DISCUSSION

Lipids are an indispensable source of nutrients for carnivores. In addition to providing essential fatty acids, they contribute to the higher energy value and improved

palatability of a diet. Lipids can be sourced from the composition present in the ingredients or by the addition of animal or vegetable fat.

In general, trends for the development of high-quality diets are associated with high fat content as an energy source. This increases the final digestibility of the diets, since the utilization of this portion is extremely high in dogs (Marx et al., 2017). The lipid sources incorporated into the diets are protected against oxidation by the inclusion of antioxidants during the production process. Usually artificial antioxidants like BHA, BHT, propyl gallate, among others, are added to maintain the stability of the product and, apparently, to protect the components of the diet. However, our concern is associated with how this process affects the oxidation status of the animals that consume the products. According to several studies, lipid tissue concentration is modulated by food concentration (Hall et al., 2006; Waldron et al., 2012). Because it increases the amount of PUFA in the diet, it must affect the fatty acids profile of the tissues.

With the advent of increased lipid composition of dietary energy, mainly in the form of PUFA, it is assumed that the tissue concentration is altered in a similar way to the diet concentration. This factor can be challenging or even deleterious to the oxidative balance of tissues since polyunsaturated fatty acids are recognized to be more susceptible to oxidation.

Previous studies have investigated numerous effects of n-3 fatty acid supplementation on the health of dogs and cats and the observed results are conflicting. Although some studies suggest that n-3 supplementation is beneficial to animal health (Ogilvie et al., 2000; Mueller et al., 2004; Mueller et al., 2005), its excess has been seen to cause adverse effects (Wander et al., 1997; Lenox and Bauer, 2013). This

discrepancy between the results is justified, in part, by the scarcity of data on efficient levels of health maintenance and the maximum level of possible supplementation for pet animals.

Recently, Lenox and Bauer (2013) published a review on the potential adverse effects of n-3 supplementation for companion animals, highlighting the risks related to the excessive consumption of PUFA on the platelet functions, gastrointestinal, healing time, potential exposure to toxins and excess nutrients, weight gain, alterations in immunological functions, and lipid peroxidation, evidencing that supplementation may negatively affect the animal's health.

It is known that PUFA-rich diets such as n-6 and n-3 have the potential to increase the peroxidation of cells and tissues (Hall, 1996). Due to the number of double bonds, PUFA incorporated into cell membranes and organelles, such as mitochondria, endoplasmic reticulum, and peroxisomes, are particularly vulnerable to attacks by free radicals and reactive species. Evidence of increased lipid peroxidation has been found in studies with humans and animals consuming diets supplemented with n-3 (LeBlanc et al., 2005)

The generation of reactive species from oxygen occurs due to the successive addition of electrons in its molecule during the production of ATP in the respiratory chain. When in excess, ROS and NRS suppress the body's antioxidant capacity and induce the formation of lipid peroxidation and protein oxidation products. When this imbalance occurs, oxidative stress is established, which can cause damage to DNA, RNA, lipids, and proteins.

The oxidation rate rises in response to increased consumption of oxidized lipids, the presence of pro-oxidant components in food, deterioration of PUFA, and the low

consumption of exogenous antioxidants (Delles et al., 2014). According to NRC (2006) and FEDIAF (2016), supplementation of exogenous antioxidants is necessary to avoid vitamin E deficiency when PUFA consumption is high. However, establishing adequate levels of vitamin E intake to avoid animal deficiencies and preventing cell membrane peroxidation is very difficult given the variability of vitamin E and PUFA concentrations in the experimental diets used in each study.

LeBlanc et al. (2005), for example, did not observe changes in plasma concentrations of oxidated co-products or vitamin E deficiency after 12 wk of supplementation with fish oil for young dogs [n-6: n-3 ratio = 3.4:1, EPA = 1.75 g/kg of diet and DHA = 2.2 g/kg of diet in dry matter (**DM**)], and did not find any evidence of oxidative damage in dogs in any of the treatments.

In contrast, Wander et al. (1997) found a difference in the plasma concentration of vitamin E when evaluating the effect of different n-6: n-3 (31:1, 5.4:1 and 1.4:1) relationships in elderly dogs. Dogs who consumed diets with n-6: n-3 ratio of 1.4: 1 had 20% lower plasma vitamin E concentrations than dogs that consumed diets with 31: 1 ratio, as well as a greater number of lipid peroxidation products in plasma and urine.

Although in our study we did not measure the serum concentration of vitamin E in dogs, we observed that the level of fat present in the treatments was not enough to cause changes in the oxidative stability of the Beagle specimen, or that these dogs are adaptable to the consumption of levels of PUFA via diet. The diets contained approximately 20% of acid hydrolyzed fat (**AHF**), of which approximately 60% were in the form of PUFA in treatments with soybean oil enriched with DHA and 18% for treatments with bovine tallow (Table 3). This AHF concentration is much greater than the minimum recommendation in the FEDIAF (2016) for adult dogs (5% in DM).

However, it is within the values recommended by NRC (2006) for dogs in maintenance (4–33% in DM).

Although Wander et al. (1997) reported increased lipid peroxidation in dogs supplemented with fish oil, we did not observe oxidative changes in serum and erythrocytes of dogs fed soybean oil enriched with DHA. TBARS are based on the thiobarbituric acid reaction of the hydroperoxide decomposition products and in the present study, no difference was observed between the treatments.

Likewise, serum and erythrocyte activity of SOD and GSH-Px and CAT in erythrocytes were not modified with the greatest amount of PUFA in UNS and UNS AOX treatments. This result was surprising, since the consumption of PUFA-rich foods was expected to raise antioxidant enzyme activities in response to increased oxidative stress.

The greater activity of GST observed in the erythrocytes of dogs that consumed saturated fat-coated foods may be an adaptive response to the production of toxic compounds derived from saturated fatty acids. The GST plays an important role in the defense against oxidative stress (Goto et al., 2009) and in the elimination of cellular xenobiotics and carcinogenic compounds (Aliya et al., 2003).

In a comparative study between elderly and young dogs, Kil et al. (2010) observed an increase in the expression of the glutathione S-transferase pi 1 gene (*GSTP1*), responsible for the synthesis of GST, in elderly dogs that consumed foods rich in saturated fatty acids. To our knowledge, however, no studies have been conducted to evaluate the effect of saturated fatty acid consumption on GST activity in dog erythrocytes. Hence, further studies are needed to explore the mechanisms regulating the level of GST activity in response to the consumption of saturated fatty acids.

Another unexpected result was the greater antioxidant capacity present in the serum of the animals that consumed foods without supplementation of the natural antioxidant in relation to the animals that consumed diets with antioxidant supplementation (i.e., AOX treatments) ($P < 0.05$).

Evaluation of the antioxidant capacity of the ingredients is often hampered by the inability to induce oxidative stress in animals. This is due to the fact that it is necessary to promote large changes to the extent that it is sufficient to induce measurable changes in oxidative markers, while ensuring that the protocol is compatible with animal welfare (Ferreira et al., 2014).

In our study, dogs were subjected to PUFA-rich diets to modify oxidative stress markers, but it appears that the concentration used was insufficient to cause an imbalance between reactive species generation and elimination by the antioxidant defense systems of the animals. The reason for this observation is that the NRC (2006) cites diets with more than 50% of fatty acids in DM and therefore, perhaps, dogs are resistant to high consumption of PUFA.

Implications

The inclusion of high amounts of PUFA in dog diets has been questioned for the possibility of causing adverse effects such as lipid peroxidation. However, the present study showed that the consumption of foods that include 13% soybean oil enriched with DHA as a source of PUFA did not alter the oxidative status of dogs under maintenance. Likely, other factors and mechanisms that have not been well studied, such as alterations in gene expression, act on the oxidative equilibrium of the body when high amounts of PUFA are consumed via the diet, and hence, further studies are needed.

LITERATURE CITED

- Aebi, H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105:121–126. doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3.
- Aliya, S., P. Reddanna, and K. Thyagaraju. 2003. Does glutathione S-transferase Pi (GST-Pi) a marker protein for cancer? *Mol. Cell Biochem.* 253:319–327. doi.org/10.1023/A:1026036521852.
- Calder, P. C. 2012. Mechanisms of action of (n-3) fatty acids. *J. Nutr.* 592S–599S. doi.org/10.3945/jn.111.155259.
- Case, L. P., L. Daristotle, M. G. Hayek, and M. F. Raasch. 2011. *Canine and feline nutrition: A resource for companion animal professional.* 3rd ed., Mosby Elsevier, Missouri.
- Delles, R. M., Y. L. Xiong, A. D. True, T. Ao, and K. A. Dawson. 2014. Dietary antioxidant supplementation enhances lipid and protein oxidative stability of chicken broiler meat through promotion of antioxidant enzymes activity. *Poult. Sci.* 93:1561–1570. doi.org/10.3382/ps.2013-03682.
- Draper, H. H., and M. Hadley. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186:421–431. doi.org/10.1016/0076-6879(90)86135-I.
- Dresch, M. T., S. B. Rossato, V. D. Kappel, R. Biegelmeyer, M. L. M. Hoff, and P. Mayorga. 2009. Optimization and validation of an alternative method to evaluated total reactive antioxidant potential. *Anal. Biochem.* 385:107–114. doi.org/10.1016/j.ab.2008.10.036.
- Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.* 82:70–77. doi.org/10.1016/0003-9861(59)90090-6.
- FEDIAF, Federação Europeia das Indústrias de Pet Food. 2016. *Nutritional Guidelines.* Bruxelles. 1–100.
- Ferreira, C. S., R. S. Vasconcellos, R. S. Pedreira, F. L. Silva, F. C. Sá, F. S. A. Kroll, A. P. J. Maria, K. S. Venturini, and A. C. Carciofi. 2014. Alterations to oxidative stress markers in dogs after a short-term stress during transport. *J. Nutr. Sci.* 3(27):1–5. doi.org/10.1017/jns.2014.47.
- Goto, S., M. Kawakatsu, S. Izumi, Y. Urata, K. Kageyama, Y. Ihara, T. Koji, and T. Kondo. 2009. Glutathione S-transferase pi localizes in mitochondria and protects against oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 46:1392–1403. doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.02.025.
- Hadley, K. B., J. E. Bauer, and N. W. Milgram. 2017. The oil-rich alga *Schizochytrium* sp. as a dietary source of docosahexaenoic acid improves shape discrimination learning associated with visual processing in a canine model of senescence. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 118:10–18. doi.org/10.1016/j.plefa.2017.01.011.
- Hall, J. A. 1996. Potential adverse effects a long-term consumption of (n-3) fatty acids. *Compend. Contin. Educ. Pract. Vet.* 18(8):879–895.

- Hall, J. A., R. A. Picton, M. M. Skinner, D. E. Jewell, and R. C. Wander. 2006. The (n-3) fatty acid dose, independent of the (n-6) to (n-3) fatty acid ratio, affects the plasma fatty acid profile of normal dogs. *J. Nutr.* 136:2338–2344. doi.org/10.1093/jn/136.9.2338.
- Hall, J. A., K. A. Tooley, J. L. Gradin, D. E. Jewell, and R. C. Wander. 2003. Effects of dietary n-6 and n-3 fatty acids and vitamin E on the immune response of healthy geriatric dogs. *Am. J. Vet. Res.* 64:762–772. doi.org/10.2460/ajvr.2003.64.762.
- Hall, J. A., R. M. Chinn, W. R. Vorachek, M. E. Gorman, J. L. Greitl, D. K. Joshi, and D. E. Jewell. 2011. Influence of dietary antioxidants and fatty acids on neutrophil mediated bacterial killing and gene expression in healthy Beagles. *Vet. Immunol Immunopathol.* 139:271–228. doi.org/10.1016/j.vetimm.2010.10.020.
- Kil, D. Y., B. M. V. Boler, C. J. Apanavicius, L. B. Schook, and K. S. Swanson. 2010. Age and diet affect gene expression profiles in canine liver tissue. *PLoS One.* 5(10): e13319:1–12. doi.org/10.1371/journal.pone.0013319.
- LeBlanc, C. J., J. E. Bauer, G. Hosgood, and G. E. Mauldin. 2005. Effect of dietary fish oil and vitamin E supplementation on hematologic and serum biochemical analytes and oxidative status in young dogs. *Vet. Ther.* 6:325–340.
- Lenox, C. E., and J. E. Bauer. 2013. Potential adverse effects of omega-3 fatty acids in dogs and cats. *J. Vet. Intern. Med.* 27:217–226. doi.org/10.1111/jvim.12033.
- Levine, R. J., D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A. G. Lenz, B. W. Ahn, S. Shaltiel, and E. R. Stadtman. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified protein. *Methods Enzymol.* 186:464–478. doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H.
- Lissi, F., C. Pascual, and M. D. Del Castillo. 1992. Luminol luminescence induced by 2,2'-Azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. *Free Radic. Res. Commun.* 17:299–311. doi.org/10.3109/10715769209079523.
- Marx, F. R., L. Trevizan, F. M. O. B. Saad, K. G. Lisenko, J. S. Reis, and A. M. Kessler. 2017. Endogenous fat loss and true total tract digestibility of poultry fat in adult dogs. *J. Anim. Sci.* 95:2928–2935. doi.org/10.2527/jas.2017.1393.
- Misra, H. P., and I. Fridovich. 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Biol. Chem.* 247:3170–3175.
- Mueller, R. S., K. V. Fieseler, M. J. Fettman, S. Zabel, R. A. W. Rosychuk, G. K. Ogilvie, and T. L. Greenwalt. 2004. Effect of omega-3 fatty acids on canine atopic dermatitis. *J. Small Anim. Pract.* 45:293–297. doi.org/10.1111/j.1748-5827.2004.tb00238.x.
- Mueller, R. S., M. J. Fettman, K. Richardson, R. A. Hansen, A. Miller, J. Magowitz, and G. K. Ogilvie. 2005. Plasma and skin concentrations of polyunsaturated fatty acids before and after supplementation with n-3 fatty acids in dogs with atopic dermatitis. *Am. J. Vet. Res.* 66:868–873. doi.org/10.2460/ajvr.2005.66.868.
- NRC. 2006. Nutrient requirement of dogs and cats. Natl. Acad. Press., Washington, DC.

- Ogilvie, G. K., M. J. Fettman, C. H. Mallinckrodt, J. A. Walton, R. A. Hansen, D. J. Davenport, K. L. Gross, K. L. Richardson, Q. Rogers, and M. S. Hand. 2000. Effect of fish oil, arginine, and doxorubicin chemotherapy on remission and survival time for dogs with lymphoma: a double-blind, randomized placebo-controlled study. *Cancer*, 88:1916–1928. doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(20000415)88:8<1916:: AID-CNCR22>3.0.CO;2-F.
- Ogoshi, R. C. S., M. G. Zangeronimo, J. S. Reis, R. V. Souza, T. M. Gonçalves, K. G. Lisenko, I. O. Alves, K. W. Silva, J. França, and F. M. O. B. Saad. 2016. Equilíbrio acidobásico, parâmetros urinários e sanguíneos de gatos induzidos ao estresse e suplementados com compostos antioxidantes. (In Portuguese) *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 68(5):1121–1128. doi.org/10.1590/1678-4162-7966.
- Salas, A., F. Subirada, M. Pérez-Enciso, F. Blanch, I. Jeusette, V. Romano, and C. Torre. 2008. Plant polyphenol intake alters gene expression in canine leukocytes. *J. Nutrigenet. Nutrigenomics.* 2:43–52. doi.org/10.1159/000200018.
- Waldron, M. K. M. K. Hannah, and J. E. Bauer. 2012. Plasma Phospholipid Fatty Acid and Ex Vivo Neutrophil Responses are Differentially Altered in Dogs Fed Fish- and Linseed-Oil Containing Diets at the Same n-6:n-3 Fatty Acid Ratio. *Lipids.* 47:425–434. doi.org/10.1007/s11745-012-3652-7.
- Wander, R. C., J. A. Hall, J. L. Gradin, S. H. Du, and D. E. Jewell. 1997. The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. *J. Nutr.* 127:1198–1205. doi.org/10.1093/jn/127.6.1198.
- Wendel, A. 1981. Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol.* 77:325–333.

Table 1. Basal diet composition ¹

Item	Amount, g/kg natural base
Poultry byproduct meal	295.00
Corn grain	269.00
Broken rice	158.00
Full-fat rice bran	95.00
Meat meal 45% CP	58.00
Wheat bran	52.80
Corn gluten 60% CP	52.80
Caramel dye	8.45
Salt	5.28
Premix mineral and vitamin ²	4.22
Yucca extract	0.32

¹ The basal diet was reduced in total lipids and the formula was designed to be supplemented with beef tallow or soybean oil + microalgae meal (All-G Rich, CCAP 4087/2; Alltech Inc., Nicholasville, KY) at the level of 13 g/100 g diet. The diets were prepared by Nutribarrasul Alimentos Pet Ltda., Barra do Ribeiro, Rio Grande do Sul, Brazil.

² The mineral-vitamin premix added assured per kg of diet: vitamin A, 7,000 IU; vitamin B1, 2 mg; vitamin B12, 25 g; riboflavin, 4 mg; pyridoxine, 2 mg; vitamin D3, 600 IU; vitamin E, 50 IU; vitamin K3, 1 mg; niacin, 30 mg; folic acid, 0.2 mg; pantothenic acid, 10 mg; biotin, 0.03 mg; cobalt, 10 mg; copper, 7 mg; iron, 80 mg; iodine, 1.5 mg; manganese, 5 mg; selenium, 0.2 mg; zinc, 100 mg; butylated hydroxytoluene, 150 mg.

Table 2. Chemical composition of basal diet and experimental diets containing soybean oil + microalgae or bovine tallow flour, with or without algae-based natural antioxidant, DM basis¹

Item	Diets ²				
	Basal	UNS	UNS AOX	SAT	SAT AOX
Dry matter, %	92.10	93.60	94.20	94.70	94.00
Crude protein, %	23.70	26.20	26.20	26.20	26.00
Ash, %	6.77	7.22	7.24	7.09	7.10
Acid hydrolyzed fat, %	18.20	20.10	19.00	20.90	21.10
Crude fiber, %	2.87	3.63	3.47	2.34	2.35
Gross energy, kcal/g	5,188.00	5,379.00	5,361.00	5,351.00	5,355.00

¹The composition of the diet was determined from the analysis of subsamples collected throughout the experiment. Accuracy was assured by adequate replication with acceptance of the mean value of 5% between samples.

²UNS = diet with unsaturated fatty acid (soybean oil + microalgae flour); UNS AOX = diet with unsaturated fatty acid with algae-based antioxidant (Economase); SAT = diet with saturated fatty acid (bovine tallow); SAT AOX = diet with fatty acid saturated with antioxidant based on algae (Economase).

Table 3. Fatty acid composition of experimental diets containing soybean oil + microalgae (UNS) or bovine tallow (SAT)¹

Fatty acids	g FA/100 g of dietary FA	
	UNS	SAT
C4:0	0.02	0.05
C6:0	0.05	0.11
C8:0	0.03	0.09
C10:0	0.04	0.11
C11:0	0.09	0.30
C12:0	0.04	0.13
C13:0	0.10	0.35
C14:0	0.79	3.92
C15:0	0.18	0.68
C16:0	23.3	37.9
C17:0	0.33	0.08
C18:0	8.99	25.2
C20:0	0.67	0.38
C22:0	0.11	0.11
C24:0	0.24	0.10
∑ Saturated ²	35.0	69.5
C14:1(n-5)	0.04	Nd
C16:1(n-7)	1.43	5.02
C17:1(n-7c)	0.12	0.81
C18:1(n-9t)	0.29	3.33
C18:1(n-9c)	2.06	1.96
C20:1(n-9c11)	0.36	0.39
C22:1(n-9)	0.05	0.11
C24:1(n-9)	0.03	Nd
∑ Monounsaturated ³	4.38	11.6
C18:2(n-6t9t12)	0.81	0.12
C18:2(n-6c)	58.2	17.0
C20:2(n-6c)	0.06	0.09
C22:2(n-6c)	0.07	0.09
C18:3(n-6)	0.35	0.20
C18:3(n-3)	0.06	0.80
C20:3(n-3c)	0.56	0.12
C20:4(n-6)	0.16	0.14
C20:5(n-3)	0.31	0.13
C22:6(n-3c)	0.05	Nd
∑ Polyunsaturated ⁴	60.6	18.7
∑ (n-6) AG ⁵	59.6	17.6
∑ (n-3) AG ⁶	1.29	1.18
Ratio (n-6):(n-3)	46.2:1	14.9:1

FA = fatty acids; Nd = not detected (detection limit, 1 ng).

¹Analysis performed by the Integrated Nucleus of Development in Laboratory Analyzes (Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil).

² Sum of saturated fatty acids: 4:0 + 6:0 + 8:0 + 10:0 + 11:0 + 12:0 + 13:0 + 14:0 + 15:0 + 16:0 + 17:0 + 18:0 + 20:0 + 22:0 + 24:0 + 25:0.

³ Sum of monounsaturated fatty acids: 14:1 (n-5) + 16:1 (n-7) + 17:1 (n-7c) + 18:1 (n-9t) + 18:1 (n-9c) + 20:1 (n-9c11) + 22:1 (n-9) + 24:1 (n-9).

⁴ Sum of polyunsaturated fatty acids: 18:2 (n-6t9t12) + 18:2 (n-6c) + 20:2 (n-6c) + 22:2 (n-6c) + 18:3 (n-6) + 18:3 (n-3) + 20:3 (n-3c) + 20:4 (n-6) + 22:6 (n-3c).

⁵ Sum of fatty acids (n-6): 18:2 (n-6t9t12) + 18:2 (n-6c) + 20:2 (n-6c) + 22:2 (n-6c) + 18:3 (n-6) + 20:4 (n-6).

⁶ Sum of fatty acids (n-3): 18:3 (n-3) + 20:3 (n-3c) + 22:6 (n-3c).

Table 4. Oxidative markers in the serum of dogs fed with unsaturated diets (UNS), unsaturated with antioxidant (UNS AOX), saturated (SAT) and saturated with antioxidant (SAT AOX)

Item	Time, d	Diets				SEM	<i>P</i> -value	
		UNS	UNS AOX	SAT	SAT AOX		UNS × SAT	AOX × without AOX
Carbonila, nmol/mg protein	0	68.40	73.30	88.10	61.20	23.70	0.9231	0.7060
	15	40.60	63.10	69.70	85.20	12.60		
	30	77.20	64.90	76.30	27.70	23.70		
Sulfhydryl, μmol/mg protein	0	86.30	63.00	77.20	60.00	9.82	0.6817	0.3908
	15	47.40	79.20	59.20	65.10	11.10		
	30	77.20	61.60	76.10	61.10	11.70		
Glutathione peroxidase GSH-Px, IU/mg protein	0	271.00	327.00	308.00	316.00	45.90	0.5124	0.8585
	15	300.00	336.00	311.00	248.00	38.50		
	30	287.00	293.00	300.00	231.00	40.80		
Superoxide dismutase SOD, IU/mg protein	0	131.00	131.00	141.00	179.00	13.70	0.5755	0.4887
	15	174.00	163.00	169.00	156.00	11.90		
	30	148.00	158.00	139.00	145.00	6.54		
TBARS nmol/mg protein	0	1.37	1.43	1.74	1.76	0.24	0.4023	0.9134
	15	2.17	2.06	2.01	2.34	0.21		
	30	2.13	2.17	2.23	1.99	0.35		
Sulfhydryl TRAP area under the curve	0	55238	73999	52572	78001	9284	0.5107	0.0069
	15	57437	92006	63266	74566	9008		
	30	78732	90438	81670	75237	10135		

IU: international units; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances; TRAP: Total non-enzymatic antioxidant potential

Table 5. Oxidative markers in the erythrocyte of dogs fed with unsaturated diets (UNS), unsaturated with antioxidant (UNS AOX), saturated (SAT) and saturated with antioxidant (SAT AOX)

Item	Time (d)	Diets				SEM	<i>P</i> -value	
		UNS	UNS AOX	SAT	SAT AOX		UNS × SAT	AOX × without AOX
Catalase CAT IU/mg protein	0	3.66	3.08	3.34	3.28	1.54	0.4973	0.6713
	15	3.33	3.03	3.34	3.21	1.62		
	30	3.51	3.60	2.79	2.97	1.26		
Sulfhydryl μmol/mg protein	0	20.00	20.60	20.50	22.6	0.52	0.9367	0.8037
	15	22.40	22.00	23.10	19.5	0.55		
	30	22.50	21.40	20.80	22.0	0.51		
Glutathione peroxidase GSH-Px, IU/mg protein	0	27.10	24.50	24.40	26.2	1.42	0.1292	0.0868
	15	26.30	27.70	24.20	25.7	0.87		
	30	27.30	27.90	24.50	29.3	1.16		
Superoxide dismutase SOD, IU/mg protein	0	0.20	0.19	0.20	0.18	0.10	0.7634	0.7307
	15	0.15	0.16	0.15	0.15	0.10		
	30	0.14	0.16	0.15	0.15	0.10		
TBARS nmol/mg protein	0	37.80	35.40	41.10	39.3	8.09	0.5641	0.8737
	15	38.90	41.10	46.60	43.9	8.44		
	30	35.30	43.10	35.20	35.3	7.33		
Glutathione S-transferase GST, IU/mg protein	0	1.89	2.00	2.80	2.44	0.44	0.0404	0.9577
	15	1.92	2.27	2.40	2.34	0.42		
	30	1.89	1.89	2.58	2.46	0.43		

IU: international units; TBARS: thiobarbituric acid reactive substances

CAPÍTULO III

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A suplementação de PUFA n-3, principalmente EPA e DHA, têm se destacado nos últimos anos no meio científico em resposta aos potenciais benefícios para saúde dos animais de companhia e de humanos. Desta forma, muitas indústrias produtoras de alimentos para animais de companhia passaram a incorporar de forma preventiva ingredientes ricos em PUFA n-3 nas dietas. Entretanto, os dados presentes na literatura quanto aos reais benefícios para saúde são conflitantes, pois também são apresentados efeitos adversos pelo consumo excessivo de n-3.

Por possuírem duplas ligações, os PUFA são mais suscetíveis a sofrerem oxidação pelos radicais livres quando comparado aos ácidos graxos saturados e monoinsaturados. Esta característica impacta diretamente nas funções e no tempo de vida das células. A membrana fosfolipídica que envolve as células e as organelas são compostas basicamente por proteínas e PUFA como EPA, DHA e ARA. Qualquer dano que ocorra nesta estrutura pode gerar alterações no DNA e morte celular. Por esta razão, é recomendada a suplementação de componentes antioxidantes em dietas ricas em PUFA.

Muitos componentes naturais com ação antioxidante têm sido incluídos em dietas para animais de companhia com o intuito de garantir o equilíbrio oxidativo biológico. Entretanto, poucos estudos têm sido realizados nesta área e com poucos resultados demonstrando sua eficiência. Esta pesquisa teve como objetivo fornecer informações sobre o impacto do consumo de dietas ricas em PUFA sobre o equilíbrio oxidativo de cães adultos em manutenção. Ainda foi avaliado o efeito do antioxidante natural a base de algas na manutenção do equilíbrio oxidativo.

A relação entre os PUFA ingeridos e o balanço dos sistemas antioxidante, enzimáticos e não enzimáticos, presentes no organismo são importantes para a manutenção da saúde dos cães e contribui significativamente para o aumento da expectativa de vida dos animais. Embora algumas pesquisas disponíveis na literatura tenham demonstrado aumento dos marcadores de estresse oxidativo em cães com o aumento do consumo de PUFA, este efeito não foi observado no presente estudo. Talvez, a quantidade de gordura não tenha sido suficiente para causar grandes alterações no equilíbrio oxidativo dos animais.

Duas novas hipóteses podem ser sugeridas. A primeira é a de que o sistema de defesa antioxidante dos cães se adapta a concentrações elevadas de gordura ingerida pelos animais, quando a fonte de lipídio é de boa qualidade. A segunda hipótese é que o sistema de defesa antioxidante dos cães garante o equilíbrio oxidativo quando o consumo de PUFA é elevado por um pequeno espaço de tempo e, nesse caso, são necessários estudos mais prolongados.

Estudo avaliando os efeitos da suplementação de níveis elevados de PUFA e de componentes com capacidade antioxidantes em animais saudáveis são escassos e, muitas vezes, de difícil comparação. Conhecer os mecanismos que causam mudanças no equilíbrio oxidativo quando os animais são alimentados com dietas ricas em PUFA pode ser o primeiro passo para uma recomendação mais adequada de n-3 e sem riscos de causar estresse oxidativo aos animais. Os estudos futuros devem focar na investigação dos efeitos da

suplementação de níveis mais elevados de lipídios e de fontes lipídicas oxidadas sobre o equilíbrio oxidativo e o potencial de outros componentes antioxidantes.

REFERÊNCIAS

- ALIX, J. Marine algae may improve cognitive function in older dogs. **Petfood Industry**, Rockford, p. 36-39, 2015.
- ALVAREZ, R. A. et al. Docosapentaenoic acid is converted to docosahexaenoic acid in the retinas of normal and prcd-affected miniature poodle dogs. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, St. Louis, v. 35, n. 2, p. 402-408, 1994.
- ASSIS, A. M. et al. Ω 3-Polyunsaturated fatty acids prevent lipoperoxidation, modulate antioxidant enzymes, and reduce lipid content but do not alter glycogen metabolism in the livers of diabetic rats fed on a high fat thermolyzed diet. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 361, n. 1/2, p. 151-160, 2012.
- BAUER, J. E.; DUNBAR, B. L.; BIGLEY, K. E. Dietary flaxseed in dogs results in differential transport and metabolism of (n-3) polyunsaturated fatty acids. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 128, supl.12, p. 2641S-2644S, 1998.
- BASIOUNI, S. et al. Polyunsaturated fatty acid supplements modulate mast cell membrane microdomain composition. **Cellular Immunology**, Amsterdam, v. 275, n. 1/2, p. 42-46, 2012.
- BENDER, D. A. Free Radicals & Antioxidant Nutrient In: RODWELL, V. W. (Ed.) et al. **HARPER'S illustrated biochemistry**. 30th ed. New York: McGraw-Hill, p. 564-568, 2015.
- BIAGI, G.; MORDENTIA, A.; COCCHI, M. The role of dietary omega-3 and omega-6 essential fatty acids in the nutrition of dogs and cats: a review. **Progress in Nutrition**, Fidenza, v. 6, n. 2, p. 97-107, 2004.
- BILLMAN, G. E.; KANG, J. X.; LEAF, A. Prevention of sudden cardiac death by dietary pure n-3 polyunsaturated fatty acid in dogs. **Circulation**, Dallas, v. 99, n. 18, p. 2452-2457, 1999.
- BOOP, B. A.; SONNERS, R. C.; KESTERSON, J. W. Metabolic fate of selected selenium compounds in laboratory animals and man. **Drug Metabolism Reviews**, London, v. 13, n. 2, p. 271-318, 1982.
- BORELLA, M. L. L.; VARELA, Q. D. Antioxidantes enzimáticos. In: SALVADOR, M.; HENRIQUE, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: ULBRA, p. 35-49, 2004.
- CALDER, P. C. et al. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion

and phagocytosis. **Biochemical Journal**, London, v. 269, n. 3, p. 807-814, 1990.

CALDER, P. C. et al. The incorporation of fatty acids by lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. **Biochemical Journal**, Londres, 300 (Pt 2), p. 509-518, 1994.

CALDER, P. C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 83, supl.6, p. 1505S-1519S, 2006.

CALDER, P. C. Fatty acids and immune function: relevance to inflammatory bowel diseases. **International Reviews of Immunology**, London, v. 28, n. 6, p. 506-534, 2009.

CASE, L. P. et al. Fat requirements. In: CASE, L. P. et al. **Canine and feline nutrition: a resource for companion animal professional**. 3th ed. Maryland Heights: Mosby Elsevier, p. 81-88, 2011.

DAVIES, S. S.; GUO, L. Lipids peroxidation and nitration. In: VILLAMENA, F. A. **Molecular basis of oxidative stress: chemistry, mechanisms, and disease pathogenesis**. Hoboken: John Wiley, p. 49-70, 2013.

DONADIO, J. L. S. et al. Selênio. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 5. ed. Barueri: Manole, p. 761-821, 2016.

DOWHAN, W.; BOGDANOV, M.; MILEYKOVSKAYA, E. Functional roles of lipids in membrane. In: RIDGWAY, N.; MCLEOD, R. (Ed.). **Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes**. 6th ed. Amsterdam: Elsevier, 2015.

DUNBAR, B. L.; BAUER, J. E. Conversion of essential fatty acids by delta 6-desaturase in dog liver microsomes. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 132, n. 6 supl.2, p. 1701S-1703S, 2002.

DUNBAR, B. L.; BIGLEY, K. E.; BAUER, J. E. Early and sustained enrichment of serum n-3 long chain polyunsaturated fatty acids in dogs fed a flaxseed supplemented diet. **Lipids**, Chicago, v. 45, n. 1, p. 1-10, 2010.

FANG, Y, Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, Tarrytown, v. 18, n. 10, p. 872-879, 2002.

FEDIAF - FÉDÉRATION EUROPÉENNE DE L'INDUSTRIE DES ALIMENTS POUR ANIMAUX FAMILIERS. **Complete Pet Food**. Bruxelas, p. 11-25, 2016. Disponível em: <http://www.fediaf.org/self-regulation/nutrition/>. Acesso em: 12 set. 2016

FERREIRA, C. S. et al. Alterations to oxidative stress markers in dogs after short-term stress during transport. **Journal of Nutritional Science**, Cambridge, v. 3, p. 1-5, e27, 2014.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Reviews of Biochemistry**, Palo Alto, v. 64, p. 97-112, 1995.

GARCEZ, M. et al. Radicais livres e espécies reativas. In: SALVADOR, M.; HENRIQUE, J. A. P. **Radicais livres e a resposta celular ao estresse oxidativo**. Canoas: ULBRA, p. 13-33, 2004.

GILBERT, D. L. Fifty years of radical ideas. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 899, p. 1-14, 2000.

GURR, M. I.; HARWOOD, J. L.; FRAYN, K. N. **Lipid biochemistry: an introduction**. 5. ed. Oxford: Blackwell Science, 2002.

HALL, J. A. Potential adverse effects of long-term consumption of (n-3) fatty acids. **Compendium on Continuing Education for the Practising Veterinarian**, Lakewood, v.18, p. 879-895, 1996.

HALL, J. A. et al. Effect of dietary n-6-to-n-3 fatty acid ratio on complete blood and total white blood cell counts, and T-cell subpopulations in aged dogs. **American Journal of Veterinary Research**, Schaumburg, v. 60, n. 3, p. 319-327, 1999.

HALL, J.A.; VAN SAUN, R.J.; WANDER, R.C. Dietary (n-3) fatty acids from Menhaden fish oil alter plasma fatty acids and leukotriene B synthesis in healthy horses. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, Philadelphia, v. 18, n. 6, p. 871-879, 2004.

HALL, J. A. et al. Dietary (n-3) fatty acids alter plasma fatty acids and leukotriene B synthesis by stimulated neutrophils from healthy geriatric Beagles. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 73, n. 5, p. 335-341, 2005.

HALL, J. A. et al. The (n-3) fatty acid dose, independent of the (n-6) to (n-3) fatty acid ratio, affects the plasma fatty acid profile of normal dogs. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 136, n. 9, p. 2338-2344, 2006.

HALL, J. A. et al. Influence of dietary antioxidants and fatty acids on neutrophil mediated bacterial killing and gene expression in healthy Beagles. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 139, n. 2/4, p. 217-228, 2011.

HADLEY, K. B.; BAUER, J. E.; MILGRAM, N. W. The oil-rich alga *Schizochytrium* sp. as a dietary source of docosahexaenoic acid improves shape discrimination learning associated with visual processing in a canine

model of senescence. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 118, p. 10-18, 2017.

HAYES, K. C.; NIELSEN, S. W.; ROUSSEAU JR., J. E. Vitamin E deficiency and fat stress in the dog. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 99, n. 2, p. 196-209, 1968.

HEATON, P. et al. Role of dietary antioxidants to protect against DNA damage in adult dogs. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 132, n. 6 suppl.2, p. 1720S-1724S, 2002.

HESTA, M. et al. The effect of vitamin C supplementation in healthy dogs on antioxidative capacity and immune parameters. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 93, n. 1, p. 26-34, 2009.

HILTON, J. W. Antioxidants: function, types and necessity of inclusion in pet foods. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v. 30, n. 8, p. 682-684, 1989.

HOUGLAND, J. L.; DARLING, J.; FLYNN, S. Protein posttranslational modification. In: VILLAMENA, F. A. **Molecular basis of oxidative stress: chemistry, mechanisms, and disease pathogenesis**. Hoboken: John Wiley, p. 71-92, 2013.

JUDÉ, S. et al. Dietary long-chain n-3 fatty acids modify blood and cardiac phospholipids and reduce protein kinase-C-delta and protein kinase-C-epsilon translocation. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 98, n. 6, p. 1143-1151, 2007.

KEARNS, R. J. et al. Effect of age, breed and dietary omega-6 (n-6) : omega-3 (n-3) fatty acid ratio on immune function, eicosanoid production, and lipid peroxidation in young and aged dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 69, n. 2/4, p. 165-183, 1999.

KRONFELD, D. S.; DONOGHUE, S. A role for vitamin C in work-stressed dogs. In: ANNUAL VETERINARY MEDICAL FORUM, 6. Washington. **Proceedings of the Sixth Annual Veterinary Medical Forum** (Anonymous, ed.) Omnipress, Madison: American College of Veterinary Internal medicine, p. 537-538, 1988.

LEBLANC, C. J. et al. Effect of dietary fish oil and vitamin E supplementation on hematologic and serum biochemical analytes and oxidative status in young dogs. **Veterinary Therapeutics**, Yardley, v. 6, n. 4, p. 325-340, 2005.

LENOX, C. E.; BAUER, J. E. Potential adverse effects of omega-3 fatty acids in dogs and cats. **The Journal Veterinary Internal Medicine**, Malden, v. 27, n. 2, p. 217-226, 2013.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciência Farmacêutica**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LINDBLAD-TOH, K. et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, London, v. 438, n. 7069, p. 803-819, 2005.

LUND, E. K. et al. Effects of dietary fish oil supplementation on the phospholipid composition and fluidity of cell membranes from human volunteers. **Annals of Nutrition and Metabolism**, Basel, v. 43, n. 5, p. 290-300, 1999.

MARX, F. R. et al. Soybean oil and beef tallow in dry extruded diets for adult dogs. **Archives of Animal Nutrition**, Abingdon, v. 69, n. 4, p. 297-309, 2015.

MCCUSKER, S. et al. Amino acid content of selected plant, algae and insect species: a search for alternative protein sources for use in pet foods. **Journal of Nutritional Science**, Cambridge, v. 3, n. 39, p. 1-5, 2014.

MOLAVIAN, H. et al. The synergetic coupling among the cellular antioxidants glutathione peroxidase/ peroxiredoxin and other antioxidants and its effect on the concentration of H₂O₂. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 13620, 2015.

MURRAY, R. K.; WEIL, P. A. Membranes: structure and function. In: RODWELL, V. W. (Ed.) et al. **Harper's illustrated biochemistry**. New York: McGraw-Hill, 2015.

NRC - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of dogs and cats**. Washington: National Academy Press, 2006.

NELSON D. L.; COX, M. M. **Lehninger princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 2006.

NESBITT, G. H.; FREEMAN, L. M.; HANNAH, S. S. Effect of *n*-3 fatty acid ratio and dose on clinical manifestations, plasma fatty acids and inflammatory mediators in dogs with pruritus. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 67-74, 2003.

OGILVIE, G. K. et al. Effect of fish oil, arginine, and doxorubicin chemotherapy on remission and survival time for dogs with lymphoma: a double-blind, randomized placebo-controlled study. **Cancer**, Hoboken, v. 88, n. 8, p. 1916-1928, 2000.

OGOSHI, R. C. S. et al. Equilíbrio acidobásico, parâmetros urinários e sanguíneos de gatos induzidos ao estresse e suplementados com composto antioxidante. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 68, n. 5, p. 1121-1128, 2016.

OLIVRY, T.; MARSELLA, R.; HILLIER, A. The ACVD task force on canine atopic dermatitis (XXIII): are essential fatty acids effective? **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam, v. 81, n. 3/4, p. 347-362, 2001.

PAWLOSZY, R.; BARNES, A.; SALEM, N. Essential fatty-acid metabolism in the feline: relationship between liver and brain production of long-chain polyunsaturated fatty-acids. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 35, n. 11, p. 2032-2040, 1994.

PEARSON, P. et al. The pro-oxidant activity of high-dose vitamin E supplements in vivo. **Biodrugs**, Auckland, v. 20, n. 5, p. 271-273, 2006.

PONTIUS, J. U. et al. Initial sequence and comparative analysis of the cat genome. **Genome Research**, New York, v. 17, n. 11, p. 1675-1689, 2007.

PURUSHOTHAMAN, D. et al. Evaluation of breed effects on n-3 PUFA metabolism with dietary flaxseed oil supplementation in dogs. **British Journal of Nutrition**, Wallingford, v. 106, supl.1, p. S139-S141, 2011.

ROCHA, F. D. et al. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacologia**, Curitiba, v. 17, n. 4, p. 631-639, 2007.

ROUDEBUSH, P., BLOOM, P.B., JEWELL, D.J. Consumption of essential fatty acids in selected commercial dog foods compared to dietary supplements. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ACADEMY OF VETERINARY DERMATOLOGY, 13. Nashville. **13th Proceedings of AAVD/ACVD Meeting**, Nashville: AAVD, p. 10-11, 1997.

ROUDEBUSH, P. Consumption of essential fatty acids in selected commercial dog foods compared to dietary supplementation: an update. In: ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ACADEMY OF VETERINARY DERMATOLOGY, 16. Norfolk. **16th Proceedings of AAVD/ACVD Meeting** Norfolk: AAVD, p. 53-4, 2001.

SANT'ANA, L. S. Biodisponibilidade de lipídios. In: COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 5. ed. Barueri: Manole, p. 229-252, 2016.

SACHINDRA, N. M. et al. Radical scavenging and singlet oxygen quenching activity of marine carotenoid fucoxanthin and its metabolites. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 21, p. 8516-8522, 2007.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 62, n. 6 supl., p. 1315S-1321S, 1995.

SHANURA FERNANDO, I. P. et al. Antioxidant activity of marine algal polyphenolic compounds: a mechanistic approach. **Journal of Medicinal Food**, New Rochelle, v. 19, n. 7, p. 15-628, 2016.

SPEVAK, W. et al. Heme control region of the catalase T gene of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Genetics and Genomics**, Berlin, v. 203, n. 1, p. 73-78, 1986.

STOECKEL, K. et al. Fatty acid patterns of dog erythrocyte membranes after feeding of a fish-oil based DHA-rich supplement with a base diet low in n-3 fatty acids versus a diet containing added n-3 fatty acids. **Acta Veterinaria Scandinavica**, London, p. 53-57, 2011.

SVENSSON, B. G. et al. Exposure to dioxins and dibenzofurans through the consumption of fish. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 324, n. 1, p. 8-12, 1991.

SWANSON, K. S. Using genomic biology to study liver metabolism. **Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition**, Berlin, v. 92, n. 3, p. 246-252, 2008.

TUREK, J. J. et al. Oxidized lipid depresses canine growth, immune function, and bone formation. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, Stoneham, v. 14, n. 1, p. 24-31, 2003.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Revista Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VAUGHN, D. M. et al. Evaluation of effects of dietary n-6 to n-3 fatty acid ratios on leukotriene B synthesis in dog skin and neutrophils. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v. 5, n. 4, p. 163-173, 1994.

WALDRON, M. K.; HANNAH, M. K.; BAUER, J. E. Plasma phospholipid fatty acid and ex vivo neutrophil responses are differentially altered in dogs fed fish- and linseed-oil containing diets at the same n-6:n-3 fatty acid ratio. **Lipids**, Chicago, v. 47, n. 4, p. 425-434, 2012.

WANDER, R. C. et al. The ratio of dietary (n-6) to (n-3) fatty acids influences immune system function, eicosanoid metabolism, lipid peroxidation and vitamin E status in aged dogs. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 127, n. 6, p. 1198-1205, 1997.

WATERS, D. J. et al. Effects of dietary selenium supplementation on DNA damage and apoptosis in canine prostate. **Journal of the National Cancer Institute**, Cary, v. 95, n. 3, p. 237-241, 2003.

WATSON, T. D. Diet and skin disease in dogs and cats. **The Journal of Nutrition**, Rockville, v. 128, supl.12, p. 2783S-2789S, 1998.

ZELST, M. et al. Biomarkers of selenium status in dogs. **BMC Veterinary Research**, London, v. 12, p. 15, 2016.

ZENTEK, J. Energie und nährstoffe: stoffwechsel und bedarf. In: ZENTEK, J. **Ernährung des hundes**: grundlagen, fütterung, diätetik. 8th ed. Stuttgart: Enke Verlag, 2016. p. 62-110.

ZICKER, C. S.; WEDEKIND, K. J.; JEWELL, D. E. Antioxidants in veterinary nutrition. **The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, Philadelphia, v. 36, n. 6, p. 1183-1198, 2006.

APÊNDICES

Apêndice A – Carta de aprovação do Comitê de ética no uso de animais



U F R G S
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética No Uso De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

Número: 29989

Título: Efeito do antioxidante natural (EconomasE®) em dietas para cães adultos contendo níveis crescentes de ácidos graxos insaturados

Vigência: 04/01/2016 à 04/01/2020

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

LUCIANO TREVIZAN - coordenador desde 04/01/2016
ANDREA MACHADO LEAL RIBEIRO - pesquisador desde 04/01/2016
ALEXANDRE DE MELLO KESSLER - pesquisador desde 04/01/2016
DÉBORA ALBERICI EUGÊNIO - Outra Função desde 04/01/2016
Gabriel Faria Estivallet Pacheco - Aluno de Doutorado desde 04/01/2016
Geruza Silveira Machado - Aluno de Doutorado desde 04/01/2016

Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 25/01/2016 - Sala 330 do Anexo I do Prédio da Reitoria - Campus Centro- Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização 12 CÃES Beagles (6 machos e 6 fêmeas), adultos, idade inicial de 1,5 ano provenientes de canil particular credenciado no Kennel Club do Rio Grande do Sul, Canil Guiot d'Bhay, Propriedade de Ana Iria da Silva, de acordo com os preceitos das Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008, o Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), que disciplinam a produção, manutenção e/ou utilização de animais do filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) em atividade de ensino ou pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 3 de Março de 2016

Cristiane Matte

CRISTIANE MATTE
Coordenador da comissão de ética

Apêndice B – Normas para redigir o capítulo III – Publicação no periódico Journal of Animal Science

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS (REVISED 2017)

Journal of Animal Science

The Instructions for Authors, *Journal of Animal Science (JAS)* is divided into 2 sections:

I. Manuscript Preparation, which describes the Style and Form that authors must follow in the preparation of manuscripts; and

II. Policies and Procedures of *JAS*, which describes the mission of *JAS*, contact information, care and use of animals, protection of human subjects, conflict of interest, types of articles published in *JAS*, manuscript submission, copyright policies, review procedures and policies, papers in press, author proofs, and publication charges.

I. MANUSCRIPT PREPARATION (STYLE AND FORM)

The most important thing authors can do as they prepare their manuscripts is to consult a recent issue of *JAS* to see the acceptable format for headings, title page, ABSTRACT, Key words, INTRODUCTION, MATERIALS AND METHODS, RESULTS, DISCUSSION (or combined RESULTS AND DISCUSSION), LITERATURE CITED, and tables and figures (including figure captions). Each of these topics is described in this document. The headings are shown in uppercase letters to illustrate how they should appear in manuscripts. A basic manuscript template in Microsoft Word is available at <http://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/infora>. **Manuscripts that are not consistent with the Instructions for Authors will be immediately rejected.**

General. Manuscripts must be written in English and must use American spelling and usage, as well as standard scientific usage. The following online resources provide detailed information.

- For general style and form, authors should follow that recommended in *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*. 7th ed. Council of Science Editors, Reston, VA.
- For American English spelling and usage, consult Merriam-Webster Online. <http://www.m-w.com/>
- For how to use numbers, refer to Policies Regarding Number Usage later in this document.
- For SI units, the National Institute of Standards and Technology provides a comprehensive guide. <http://physics.nist.gov/cuu/Units/index.html>
- For capitalization and spelling of plants, consult the USDA Plants website. <http://plants.usda.gov>
- For anatomical nomenclature, consult the current *Nomina Anatomica Veterinaria*. www.wavamav.org/Downloads/nav_2012.pdf
- For bacterial nomenclature, consult Approved Lists of Bacterial Names. <http://www.bacterio.net/alintro.html>

Manuscripts should be prepared double-spaced in Microsoft Word, with lines and pages numbered consecutively, using Times New Roman font at 12 points and no less than 2.54-cm (1 inch) margins all around. Special characters (e.g., Greek

and symbols) should be inserted using the symbols palette available in this

font.

Complex equations should be entered using Math- Type (http://www.dessci.com/en/products/mathtype/) or the Word Equation tool within your Word document. Do not insert equations as images; images will need to be re-keyed by hand by layout staff, which may introduce errors.

Tables and figures should be placed in separate sections at the end of the manuscript, and not placed in the text. Manuscripts should be uploaded to Thomson Reuters ScholarOne Manuscripts (formerly called Manuscript Central) using the fewest lines possible to facilitate the review and editing processes.

Manuscripts should contain the following sections in this order.

Title Page. The title page includes a running head (the first word only and any proper nouns capitalized and no more than 45 keystrokes [i.e., characters and spaces; a space is counted as a keystroke]); the title (only the first word and any proper nouns capitalized, as brief as possible, and including the species involved); names of authors (e.g., T. E. Smith; no title, positions, or degrees) and institutions, including the department, city, state or country (all with first letters capitalized), and ZIP or postal code. Author affiliations are footnoted using the symbols *, †, ‡, §, #, ||, and ¶ and are placed below the author names. If a consortium is listed in the byline, a footnoted reference to a website showing the names and affiliations of each member of the consortium should be included in acknowledgements; names and affiliations of each member of the consortium will not be listed on the title page. Superscript numbers are used to reference footnotes on the first page. Acknowledgments, including acknowledgements of consortia, grants, experiment station, or journal series number, are given as a footnote to the title. **Authors disclosing potential or actual conflicts of interest related to**

the research presented in the manuscript should describe this in a footnote with other acknowledgements (for details, see *Conflict of Interest*).

Abstract. ABSTRACT consists of no more than 2,500 keystrokes (characters and spaces) in one paragraph and contains a summary of the pertinent results, with statistical evidence (i.e., *P*-values), in a brief but understandable form, beginning with a clear

statement of the objective and ending with the conclusions, with no references cited. Abbreviations in the abstract that are not in **Standard JAS Abbreviations** must be defined at first use.

Key words. List up to 6 key words or phrases including the species, variables tested, and major response criteria. The first letter of each key word is lowercase, unless it is a proper noun; key words are separated by commas and presented in alphabetical order; and no abbreviations should be used. Because major words in the title are not used for the subject index, which is published in the last issue of each volume of *JAS*, appropriate words from the title should be listed as key words.

Introduction. INTRODUCTION must not exceed 2,000 keystrokes (characters and spaces) and must contain a brief justification for conducting the research, the hypotheses to be tested, and the objective(s). Extensive discussion of relevant literature should be included in DISCUSSION, not in INTRODUCTION.

Materials and Methods. MATERIALS AND METHODS is a required section and must contain a clear description or specific original reference for all biological, analytical, and statistical procedures. All modifications of procedures must be explained. Details, dates of experimental

activities if appropriate, animals (breed, sex, age, body weight, and weighing conditions [i.e., with or without restriction of feed and water]), surgical techniques, measurements, and statistical models should be described clearly and fully. Manufacturer information must be provided at the first mention of each proprietary product used in the research (for details see, **Commercial Products**). Appropriate statistical methods should be used, although the biology should be emphasized. The threshold (e.g., $P < 0.05$) for significance should be stated. A statement of the results of the statistical analysis should justify the interpretations and conclusions. The experimental unit is the smallest unit to which an individual treatment is imposed. Measurements on the same experimental unit over time are not independent and should not be considered as independent experimental units. Provide a validation for assays (e.g., mean and CV for repeated analysis of a sample [both between and within-assay if available] and the sensitivity [minimum amount or concentration detectable]). Also, provide a publication reference for the methods used in kits. Centrifugal force should be provided in $\times g$, not rpm, and duration and temperature of centrifugation must be included. Include volume of blood collected, container used, and amount of preservative or anticoagulant (e.g., 10 μL of heparin).

Results. RESULTS are presented in the form of tables or figures when feasible. The text should explain or elaborate on the tabular data, but numbers should not be repeated within the text. Sufficient data, all with some index of variation attached, including significance level (i.e., P -value), should be presented to allow readers to interpret the results of the experiment. Reporting the P -value is preferred to the use of the terms significant and highly significant, which are more editorial than quantitative descriptions. Thus, the P -value (e.g., $P = 0.042$ or $P < 0.05$) should be presented, thereby allowing readers to decide what to reject. Other probability (alpha) levels may be discussed if properly qualified so that the reader is not misled (e.g., trends in the data).

Discussion. DISCUSSION contains the author's, or authors', interpretations of the results of the study. The presentation should be clear and concise, address biological mechanisms and their significance, and integrate the research findings with the body of previously published literature to provide readers with a broad base on which to evaluate the author's, or authors', interpretations and assertions. Authors may speculate, but they should make it clear that their statements are speculative, rather than factual. A stand-alone DISCUSSION should not refer to any tables or figures, nor should it include P -values, unless citing a P -value from another work. The discussion must be consistent with the data from the research.

Results and Discussion. In *JAS*, authors have the option of combining the results and discussion into one section.

Literature Cited. To be listed in LITERATURE CITED, papers must be published or accepted for publication ("in press"). Personal communications and unpublished data must not be included in LITERATURE CITED. Guidelines and formats for references and citations are described in the Literature Cited Section of this document.

Tables and Figures. Tables and figures must be prepared so they meet the stand-alone criterion; that is, information in a table or figure can be understood without referring to information in the body of the manuscript. Tables and figures shall be placed at the end of the manuscript. Each table and each figure shall be placed on a separate page (separated with section breaks) and identified with table and figure numbers. Author-defined abbreviations must be defined (or redefined) in each table and figure. Manufacturer name and location must be provided for any proprietary product appearing in a table or figure.

Tables must be created using the table feature in MS Word (for instructions, see **Guidelines for Creating Tables Using Microsoft Word** (<http://www.animalsciencepublications.org/>).

les/publications/jas/wordtableguidelines-jas.pdf). Refer to a recent issue of *JAS* for examples of table construction. When possible, tables should be organized to fit across the page (i.e., portrait layout) without running broadside (i.e., landscape). Each column must have a heading (e.g., Item, Ingredient, Trait, Fatty acid). Units (e.g., kg) should be separated from headings by a comma, rather than being shown in parentheses. Limit the data added to the minimum needed for meaningful comparison within the accuracy of the methods. In the body of the table, numerals are used to reference footnotes. Each footnote should begin on a new line. Lowercase, superscript letters are used to indicate significant differences among means within a row or column and to reference footnotes explaining how to interpret the letters.

Figures should follow the **Quality Guidelines for *Journal of Animal Science* (JAS) Figures**

(<http://www.animalsciencepublications.org/les/publications/jas/infora-guidelines-for-figures.pdf>). Figure captions should be typed double-spaced on a separate page. Now that *JAS* is a fully electronic publication, authors are encouraged to use color to enhance figures; there are no additional fees for color figures and images in issues of *JAS*.

Individuals may purchase print-on-demand copies of *JAS* issues from Sheridan Press. Print-on-demand copies will contain gray-scale, rather than color, figures and images. To purchase these, contact Sheridan at *Journal of Animal Science* or American Society of Animal Science, PO Box 465, Hanover, PA 17331 P: 717-632-3535, F: 717-633-8920, E: pubsvc.tsp@sherdan.com.

Appendices. An appendix or appendices are optional and used to provide numerical examples or give extensive detail of analytical procedures. However, if the supplemental material is of interest only to a limited number of *JAS* readers, it should not be included as an appendix. Instead, state that supplemental information is available on request from the

corresponding author; addresses for websites with appropriate supplemental information are acceptable. If extensive, the data may be included as an e-supplement to the manuscript (see **E-Supplements**). Appendices should follow LITERATURE CITED and be introduced with a major heading (e.g., APPENDIX 1: TITLE).

E-Supplements. Authors may present material in an e-supplement (e.g., detailed data sets, Excel files, and video) that is more extensive or detailed than necessary for a *JAS* article. A note will appear in the *JAS* article that more material can be found online. Material in an e-supplement must undergo peer review and, thus, should be in a format that is easily accessible (i.e., does not require dedicated software or software that is not generally available) to most reviewers and readers.

Additional Usage Notes

Abbreviations. Except to begin a sentence and when specifically contraindicated (e.g., units of time should only be abbreviated when used with a number), authors must use the abbreviations that are listed in this document under **STANDARD JAS ABBREVIATIONS**. Abbreviations in the text that are not listed in **STANDARD JAS ABBREVIATIONS** must be defined at first use, unless they are international abbreviations for elements, units of measure, amino acids, and chemicals, as examples. Abbreviations listed in **STANDARD JAS ABBREVIATIONS** or standard international abbreviations cannot be used to create author-defined abbreviations (e.g., t = metric ton and cannot be used as an abbreviation for time, temperature, or treatment; C = carbon and cannot be used for Control).

Numbers. For details, see **Policies Regarding Number Usage for *Journal of Animal Science*** later in this document.

Once defined, author-defined abbreviations should always be used, except to begin a

sentence. Author-defined abbreviations must be defined in the abstract and redefined at first use in the body of the manuscript, in each table, and in each figure. Authors should avoid excessive use of author-defined abbreviations.

Gene and Protein Names. Because there is no universally accepted style for gene and protein names that applies to all species, the *JAS* asks authors to assume the responsibility of using the convention appropriate for the particular species. Some general guidelines can be found in the *CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers* (7th ed., 2006). For example, the gene that codes for the protein p53 is *TP53* in humans and *Trp53* in mice (note that, by convention, gene names are italicized, and protein names are generally not italicized).

Quantitative Trait Loci and DNA Markers and Microarray Data.

Authors of papers that contain original quantitative trait loci (QTL) or DNA marker-association results for livestock are strongly encouraged to make their data available in an electronic form to one of the publicly available livestock QTL databases *after the manuscript appears on the JAS First Look website* (<http://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/first-look>). The date on which the paper is posted to the *JAS-Papers in Press* website may represent the official public disclosure date for the contents of the article. Current QTL databases for livestock include, but may not be limited to, the Animal QTL database

(<http://www.animalgenome.org/QTLdb>)

and the Bovine QTL database (<http://genomes.sapac.edu.au/bovineqtl/index.html>).

Similarly, for microarray data we request that all authors using microarray data analysis in their research submit a complete data set to 1 of 3 databases before submission of a manuscript: the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/geo>), the EMBL-EBI ArrayExpress repository

(<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress>), or

the Center for Information Biology Gene Expression (CIBEX) database.

Commercial Products. The use of names of commercial products should be minimized. When a commercial product is used as part of an experiment, the manufacturer name and location (city and state if in the US; city, administrative region or district [e.g., province], and country if outside the US) or a website address must be given parenthetically at first mention in text, tables, and figures. The generic name should be used subsequently. No TM, ®, or © symbols should be used.

General Usage.

- Abbreviations are not used to begin sentences. Words must be spelled out.
- “Sex” should be used, rather than “gender.” Gender is more appropriate for describing a role in society than for describing biological sex.
- State total sample size (e.g., the study included a total of 600 animals), rather than using “N” to represent total sample size.
- The hierarchy for brackets and parentheses is [()]. For example, $[(2 + 3) \times (12 \div 2)] \times 2 = 60$.
- Meat shear force should be expressed in kilograms (kg), although newtons (N) may also be acceptable.
- Report time using the 24-h system (e.g., 1410 h rather than 2:10 p.m.). Use italics to designate genus and species (e.g., *Bos taurus*) and botanical varieties (e.g., *Medicago sativa* var. Potomac). Designations for botanical cultivars should be preceded by “cv.” or enclosed in single quotes (e.g., *Festuca arundinacea* cv. Kentucky 31 or *Festuca arundinacea* ‘Kentucky 31’).
- Names of muscles are not italicized.
- Specify the basis (i.e., as-fed or dry matter) for dietary ingredient and chemical composition data listed in text or in tables. Similarly, specify the basis for tissue composition data (e.g., wet or dry basis).

- Calculations of efficiency should be expressed as output divided by input (i.e., gain:feed, not feed:gain).
- A diet is a feedstuff or a mixture of feedstuffs; a ration is the daily allotment of the diet.
- The word “Table” is capitalized and never abbreviated.
- Except to begin a sentence, the word “Figure” should be abbreviated to “Fig.”
- Except to begin a sentence, experiment and equation should be abbreviated to Exp. and Eq., respectively, when preceding a numeral (e.g., Exp. 1).
- Avoid jargon unfamiliar to scientists from other disciplines. Do not use the term “head” to refer to an animal or group of animals. Instead, use animal, sow, ewe, steer, heifer, cattle, etc.
- Avoid bi- as a prefix because of its ambiguity; biweekly means twice per week and once every 2 weeks.
- Breed and variety names should be capitalized (e.g., Landrace and Hereford).
- Trademarked or registered names should be capitalized, but no TM or ® symbols should be used.

II. POLICIES AND PROCEDURES OF *JAS*

The mission of the American Society of Animal Science (ASAS) is to “*foster the discovery, sharing, and application of scientific knowledge concerning the responsible use of animals to enhance human life and well-being*” (<https://asas.org/about-asas/history-and-mission>). The *Journal of Animal Science*, which is published monthly by ASAS, accepts manuscripts presenting information for publication with this mission in mind.

The *JAS* is divided into the following Sections: Animal Genetics; Animal Nutrition: Nonruminant Nutrition; Animal Nutrition: Ruminant Nutrition; Animal Physiology; Animal Production; Animal Products; Special Topics; and Symposia, which contains invited manuscripts from symposia at ASAS

meetings. Manuscripts that do not fit one of the *JAS* Sections will not be considered for publication.

The Editor-in-Chief, Associate Editor-in-Chief, Managing Editor, and Section Editors establish the editorial policies of *JAS*, subject to review by the publications committee and ASAS Board of Directors. The views expressed in articles published in *JAS* represent the opinions of the author(s) and do not necessarily reflect the official policy of the institution with which an author is affiliated, the ASAS, or the *JAS* Editor-in-Chief. Authors are responsible for ensuring the accuracy of collection, analysis, and interpretation of data in manuscripts and ultimately for guaranteeing the veracity of the contents of articles published in *JAS*.

Contact Information

For information on the scientific content of the journal, contact the Editor-in-Chief, Dr. James Sartin, American Society of Animal Science, P.O. Box 7410, Champaign, Illinois 61826-7410; e-mail: jsartin@asas.org.

For questions about submitting a manuscript and ScholarOne Manuscripts, contact Lauren Van Driel, Submission Services Manager; e-mail: lvandriel@sciencesocieties.org.

For assistance with author proofs, contact Ms. Emily Mueller, Managing Editor; e-mail: emueller@sciencesocieties.org.

Care and Use of Animals

All authors submitting to *JAS* must complete the Care and Use of Animals form certifying that any research that involves animals has followed established standards for the humane care and use of animals and must specify which standards were used. Only investigations that have followed high standards for the humane care and use of animals in research will be reported in *JAS*.

Also, the manuscript must include a statement of institutional animal care and

use committee (IACUC), or equivalent, approval of all animal procedures. The IACUC statement should appear as the first item in MATERIALS AND METHODS and should specify which publically available animal care and use standards were followed (e.g., ADSA-ASAS-PSA Guide for Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching; Primary Industries Ministerial Council, Model code of practice for the welfare of animals: the sheep). The manuscript should describe anesthetics, analgesics, tranquilizers, and care taken to minimize pain and discomfort during preoperative, operative, and postoperative procedures. If research requires discomfort to the animals or stressful conditions, justification for these conditions must be evident in papers published in *JAS*.

Protection of Human Subjects

In the United States, federally funded or regulated research involving human subjects must comply with Code of Federal Regulations (CFR), Title 45 Public Welfare, Part 46 Protection of Human Subjects. However, CFR 45 Part 46.101(b) exempts some research from these regulations. For all exempted research and other details, see <http://www.hhs.gov/ohrp/human-subjects/guidance/45cfr46.html>.

Exempted research includes that in which the only involvement of human subjects is for “taste and food quality evaluation and consumer acceptance if 1) wholesome foods without additives are consumed or 2) a food is consumed that contains a food ingredient at or below the level and for a use found to be safe, or agricultural chemical or environmental contaminant at or below the level found to be safe, by the Food and Drug Administration or approved by the Environmental Protection Agency or the Food Safety and Inspection Service of the U.S. Department of Agriculture.” If human subjects were used in exempted research and the research was in compliance with CFR 45 Part 46, or equivalent regulations where the research was conducted, authors must state in **MATERIALS AND METHODS** or acknowledgements that they were in

full compliance. If human subjects were used in research that was not exempted in CFR 45 Part 46, or equivalent regulations where the research was conducted, authors must certify that the research received a priori approval from an appropriate Institutional Review Board.

Conflict of Interest

All *JAS* editors, ASAS staff, ASAS Board of Directors, and submitting authors must disclose any actual or potential conflicts of interest that may affect their ability to objectively present or review research or data. This generally includes any relevant professional, personal, political, intellectual, religious, or financial interest in, or relationship with, an individual or business that could have an actual or perceived influence, positive or negative, on the conduct and publication of the research or data. Financial relationships generally refer to financial benefits accrued to authors through avenues such as salary, consulting fees, honoraria (including paid holidays, use of vacation property, country club privileges, and other nonmonetary rewards for service), intellectual property rights, royalties, business ownership, and investments, other than diversified mutual funds or the equivalent.

Disclosures for *JAS* authors are to be provided as an acknowledgement on the title page of a manuscript (for instructions, see **Title Page**). The *JAS* may use such information as a basis for editorial and publication decisions, and may publish such disclosures if that is deemed relevant and sufficient. The *JAS* editors, ASAS staff, and ASAS Board of Directors with actual or potential conflicts of interest that may affect their ability to objectively evaluate or manage a manuscript will be prevented from gaining access to the manuscript and associated documents, unless they are an author or coauthor, in which case ScholarOne Manuscripts will limit their access to the Corresponding Author Center. When the current Editor-in-Chief, for example, has an actual or potential conflict of interest with a manuscript, a former Editor-in-Chief will

assume the responsibilities of the Editor-in-Chief for that manuscript.

Types of Articles

Articles published in *JAS* encompass a broad range of research topics in animal production and fundamental aspects of genetics, nutrition, physiology, and preparation and utilization of animal products. Many articles are multidisciplinary and cannot be conveniently categorized. Articles typically report research with cattle, goats, pigs, and sheep. However, studies involving other farm animals (e.g., poultry and meat and working horses) and companion animals, including performance and recreational horses, aquatic, and wildlife species will be considered for publication. Studies with laboratory animal species that address fundamental questions related to the biology of livestock, companion animals, and other managed animals may be considered.

The preceding paragraph is not meant to exclude manuscripts but, rather, is a clarification of the focus of *JAS*. Authors may contact the Editor-in-Chief or Associate Editor-in-Chief if there are questions about whether the topic of a manuscript is appropriate for *JAS*.

Research Articles. Results of research contained in manuscripts submitted to *JAS* must not have been published in or submitted previously to a peer-reviewed scientific journal. Previous presentation at a scientific meeting or the use of data in field reports or similar documents, including press publications or postings to personal or departmental websites, do not preclude the publication of such data in *JAS*. However, abstracts, proceedings papers, field reports, or similar presentations that are expanded to produce full-length manuscripts should be referenced and cited in *JAS* manuscripts. Articles simultaneously posted to websites and submitted to *JAS* should carry a disclaimer on the website that this version of the paper has not undergone *JAS* peer-review and is not to be considered the final

published form of the article. If the article has been published in *JAS*, the author should include the complete *JAS* citation so that proper credit can be given to *JAS* as the publisher of the article. Because *JAS* holds the copyright to articles it publishes, posting altered *JAS* articles that are represented as exact duplicates of the published version constitutes copyright violation.

Review Articles. The journal publishes invited review articles. The Editor-in-Chief, in consultation with the Associate Editor-in-Chief, Section Editors, and the ASAS Board of Directors, identifies invited reviews. Section Editors may solicit proposals for review articles to be published in *JAS*, after consultation with and approval by the Editor-in-Chief; the authors may be responsible for a portion of the publication charges for invited reviews. Unsolicited review articles will not be considered.

Special Topics. This Section includes Biographical or Historical Sketches and Contemporary Issues in the animal sciences. Even though Biographical or Historical Sketches are part of the Special Topics Section, they will be published on the ASAS website and in the Association News section of *JAS*. The frequency of publication depends on the availability of the prepared sketches. For more information, see <http://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/infora>.

Contemporary Issues include topics such as environmental concerns, legislative proposals, systems analysis, and various “newsworthy” scientific issues. Even though Contemporary Issues manuscripts do not have to include original data, authors’ assertions should be substantiated with references to established information from credible published sources.

Special Topics papers will be subject to peer review in a manner similar to other *JAS* submissions. Because of the nature of these manuscripts, their format may vary from that of standard scientific articles,

although ABSTRACT and INTRODUCTION must be consistent with keystroke (characters and spaces) limitations defined earlier in this document.

Teaching articles should be submitted to *Natural Sciences Education*, which is a joint venture of several professional societies, including the ASAS. Articles in *Natural Sciences Education* are “written by and for educators in extension, universities, industry, administration, and grades K–12” and highlight teaching techniques, concepts, ideas, and other teaching-related issues. The goal is build a portfolio of teaching-related articles that can be accessed at a single location. For detailed information about *Natural Sciences Education*, see <https://www.agronomy.org/publications/news>.

Rapid Communications. *JAS* is now considering rapid publication of short communications that are considered novel and highly significant to animal science. Submitted papers should follow *JAS* guidelines, but are restricted to 2 figures or tables or a combination of 1 figure/1 table. The words “Rapid Communication:” should begin the title. When preparing the letter, please include the following at the top of the first page, in bolded text: **NOTE: THIS IS A RAPID COMMUNICATION SUBMISSION.** This note will ensure that the submission is processed immediately.

The final published paper will be no more than 5 printed pages (approximately 15 Word file pages). A *JAS* Section Editor handles the review and outcome is to accept or reject the paper. The reviews will generally be complete by 2 weeks and if accepted, added to the First Look page within 2 days and placed in the next available journal issue. If significant revisions are needed, the Section Editor will reject the manuscript and require a new submission. Generally there will not be a revision. All papers are subject to the \$100 submission fee (applied towards publication if accepted). The manuscript will be published **Open Access** and the fee for publication of this rapid format

will be \$1,000 (members) and \$2,000 (nonmembers).

Technical Notes. A technical note is used to report a new method, technique, or procedure of interest to *JAS* readers. When possible, a technical note should include a comparison of results from the new method with those from previous methods, using appropriate statistical tests. The advantages and disadvantages of the new procedure should be discussed. When typeset for publication, a technical note shall not exceed 10 pages (approximately 18 Microsoft Word document pages), including tables and figures. “Technical note:” shall be the first portion of the title of such manuscripts. The review process for a technical note will be the same as that for other manuscripts. Information that is more extensive or detailed than necessary for a Technical note may be presented in an e-supplement (see **E-Supplements**). Short communications, brief communications, and similar types of articles will not be considered for publication in *JAS*.

Letters to the Editor. A letter judged suitable for publication will be printed in a “Letters to the Editor” section of *JAS*. The purpose of this section is to provide a forum for scientific exchange relating to articles published in *JAS*. To be acceptable for publication, a letter must adhere to the following guidelines. 1) Only a letter that addresses matters of science and relates to information published in *JAS* will be considered. In general, a letter should not exceed 5,000 keystrokes and should contain no more than 5 citations. 2) A letter should provide supporting evidence based on published data for the points made or must develop logical scientific hypotheses. A letter based on conjecture or unsubstantiated claims will not normally be published. No new data may be presented in a letter. 3) The Editor-in-Chief will evaluate each letter and determine whether a letter is appropriate for publication. If a letter is considered appropriate, the author(s) of original *JAS* article(s) will be invited to write a letter of response. Normally both letters will be published together. 4) All letters will be

subject to acceptance and editing by the Editor-in-Chief and editing by a technical editor.

SUBMISSION OF MANUSCRIPTS

Manuscripts should be submitted electronically through ScholarOne Manuscripts at <http://mc.manuscriptcentral.com/jas>.

Authors with questions about using the electronic manuscript submission system or, for technological reasons, are unable to submit manuscripts electronically may contact Lauren Van Driel (lvandriel@sciencesocieties.org).

Please note: in 2016, *JAS* instituted a submission fee equivalent to the page charges for one page at the membership rate. The submission fee must be paid at the time of submission, but will be credited towards total page charge fee if the article is published. **Please note:** the submission fee is not refundable if the article is rejected.

Section titles

Each author will be prompted to choose a section for grouping articles within the table of contents.

1. Animal Behavior and Cognition
2. Animal Genetics and Genomics
3. Animal Health and Well Being
4. Animal Models
5. Arid Land Animal Production
6. Cell and Molecular Biology
7. Companion Animal Biology
8. Companion Animal Nutrition
9. Dairy Products
10. Environmental Animal Science
11. Exercise Physiology

12. Feeds
13. Fetal Programming
14. Forage Based Livestock Systems
15. Gastrointestinal Biology
16. Growth Biology
17. Housing and Management
18. Immunology
19. Integrated Animal Science
20. Lactation and Mammary Gland Biology
21. Meat Science
22. Metabolism and Metabolomics
23. Microbiology
24. Microbiome
25. Molecular Nutrition
26. Muscle Biology
27. Neuroendocrinology
28. Non ruminant nutrition
29. Pasture and Grazing Lands
30. Proteomics
31. Reproduction
32. Ruminant Nutrition
33. Special Topics
34. Sustainable Animal Science and Practices
35. Symposia
36. Technology in Animal Science

- 37. Toxicology
- 38. Wildlife Management
- 39. Zoo and Exotic Animal Management and Nutrition
- 40. Board Invited Reviews

Copyright Agreement

Authors shall complete the Manuscript Submission and Copyright Release form for each new manuscript submission. The form is completed during the submission process through ScholarOne Manuscripts. Authors, such as United States government employees, who are unable to grant copyright to ASAS must indicate the reason for exemption on the form; material that was produced as an official duty of a U.S. Government employee is considered public domain. The American Society of Animal Science holds the copyright to material published in *JAS*. Persons who wish to reproduce material in *JAS* must request written permission to reprint copyrighted information from the Managing Editor, Ms. Emily Mueller (emueller@sciencesocieties.org). Likewise, authors of *JAS* manuscripts who include material (usually tables or figures) taken from other copyrighted sources must secure permission from the copyright holders and provide evidence of this permission at the time the manuscript is submitted to *JAS* for review. Tables or figures reproduced from the work of others, or data extracted from the work of others and used to construct summary tables (or figures) or for meta-analyses, must include an acknowledgement of the original source in a footnote or legend and, when appropriate, a complete citation in LITERATURE CITED. The ASAS, however, grants to the author(s) of *JAS* articles the right of republication in any book of which he or she is author or editor, subject only to his or her giving proper credit in the book to the original *JAS* publication of the article by ASAS.

REVIEW OF MANUSCRIPTS

General Procedures. The Editor-in-Chief, Associate Editor-in-Chief, and Section Editors determine whether manuscripts are suitable for publication in *JAS*. All communications about a submitted manuscript should maintain confidentiality. The Associate Editor-in-Chief and Section Editors handle correspondence with the peer reviewers and corresponding author and promptly decide whether a manuscript should be accepted, revised, or rejected. A Section Editor's decision to accept, invite revision, or reject a manuscript after peer review is based on peer-reviewer comments and recommendations and the Section Editor's own review of the manuscript. Section Editors forward documents for accepted and rejected manuscripts to the Editor-in-Chief. After acceptance, manuscript files are forwarded to the technical editors. The Editor-in-Chief is the final arbiter concerning acceptance or rejection of manuscripts submitted for publication.

Rejections. Manuscripts are rejected for 3 general reasons. 1) The substance of the manuscript may not meet *JAS* standards; the work may be incomplete, the evidence may not support the conclusions, the experimental approach may be poorly conceived, or the work may repeat established fact or represent no advancement of the existing knowledge. 2) Even though the work may be sound and the results valid, the paper may be better suited for publication elsewhere. 3) Manuscripts are not written clearly, concisely, and coherently, or they are not consistent with guidelines in the 2016 Instructions for Authors, *Journal of Animal Science*. These manuscripts may be rejected without review. Authors whose first language is not English are urged to have an editing service review their manuscripts before they are submitted to *JAS*. However, *JAS* considers the authors, and not an editing service, responsible for the content of manuscripts.

Appeals. If a manuscript is rejected, as a first course of action the author should discuss the matter with the Section Editor responsible for the manuscript. Decisions must be appealed to the Editor-

in-Chief if the author(s) believe(s) that the judgment was erroneous or biased. A letter presenting the reasons for the appeal should be sent to the Editor-in-Chief. The Editor-in-Chief will review the author's reasons, all documents related to the manuscript, and, if necessary, consult with the Section Editor responsible for the manuscript. The Editor-in-Chief will then decide whether to accept or deny the appeal.

Revisions. Most manuscripts that are eventually accepted for publication are returned to the author(s) at least once for revision. All revised manuscripts must be returned to Section Editors via *JAS* ScholarOne Manuscripts. Authors will be permitted 15 days to revise and return manuscripts classified as Minor Revision and permitted 35 days to revise and return manuscripts classified as Major Revision. ScholarOne Manuscripts prompts reviewers to classify manuscripts as Minor Revision or Major Revision.

Manuscripts that exceed the revision-option deadline will be withdrawn. Extenuating circumstances may justify the need to extend the revision-option deadline. Requests for extensions must be communicated to the Section Editor responsible for the manuscript before the revision-option expires. The Revision Checklist for Authors is sent with requests for revision (<http://www.animalsciencepublications.org/files/publications/jas/jas-revision-checklist.pdf>). Authors should closely follow the Checklist.

PAPERS IN PRESS, AUTHOR PROOFS, AND PUBLICATION CHARGES

Papers in Press. To facilitate earlier disclosure of research results, accepted manuscripts will be assigned a digital object identifier (doi) and posted to the *JAS* First Look site (<http://www.animalsciencepublications.org/publications/jas/first-look>) in the form in which they are accepted. The authors bear the primary responsibility for the content of manuscripts posted to

the Papers in Press site. Because articles posted to this site have not been professionally edited and typeset, and are frequently changed in response to questions from editors, they do not represent the final, published form of the manuscript. The date a complete monthly issue of *JAS* is posted online is the official publication date for *JAS* articles. However, the date on which a manuscript is posted to the *JAS*-Papers in Press website may represent the official public disclosure date for the contents of the article. Authors concerned about intellectual property issues, such as patents and disclosure dates, should seek legal counsel before submitting manuscripts to a scientific journal.

Author Proofs. Accepted manuscripts are forwarded to the editorial office for technical editing and typesetting. During this process, the technical editor may add queries to ask the authors for missing information, to clarify points, or to update figures. The manuscript is then typeset, figures processed, and author proofs (also called galley proofs) prepared. Queries are included in the galley proofs. Correspondence concerning the accepted manuscript should be directed to the Managing Editor.

Proofs of all manuscripts will be provided to the corresponding author and should be read carefully and checked against the typed manuscript. Accuracy of the author proof is the sole responsibility of the author(s). Corrections may be returned by e-mail (preferred), or by fax if necessary. For faxed corrections, changes to the proof should be made neatly and clearly in the margins of the proof. Notes created with Adobe editing tools and pointing to specific locations for corrections are preferred. Changes e-mailed to the Managing Editor, if not noted directly on the Adobe PDF file, must indicate page, column, and line numbers for each correction to be made on the proof. Editor queries should be answered on the galley proofs; failure to do so may delay or prevent publication. Excessive author changes made at the proof stage may result in a \$250 surcharge for additional typesetting, and they may

be deemed so excessive that the manuscript will be returned to the Section Editor for additional scientific review.

Publication Charges and Reprints.

The journal has 2 options available for publication: open access and conventional page charges. For the open access option, authors will pay the open access fee when proofs are returned to the editorial office so that their article will become freely available upon publication in an online issue of *JAS*. Charges for open access publication are \$2,500 per article if at least one author is a current professional member of ASAS; the charge is \$3,250 when no author is a professional ASAS member. For conventional publication, the charge is \$100 per printed page in *JAS* if at least one author is a professional ASAS member; the page charge is \$200 when no author is a professional member of ASAS. Reprints may be ordered at an additional charge.

Professional membership in ASAS is available to any person who has research, educational, commercial, or administrative responsibilities or interests in the broad disciplines within animal science. Complete details are available at the following website: www.asas.org/membership-services/member-information.

When the author proof is sent, the author is asked to complete a reprint order form requesting the number of reprints desired and the name of the institution, agency, or individual responsible for publication charges. Now that *JAS* is a fully electronic publication, there are no additional charges for color figures and images that appear in electronic issues of *JAS*. However, authors who order reprints are responsible for paying any additional charges for printing reprints that contain color.

STANDARD *JAS* ABBREVIATIONS

The following abbreviations should be used without definition in *JAS*. Plural abbreviations do not contain a final “s”

because the context of an abbreviation implies whether it is singular or plural. Use of the standard 3-letter abbreviations for amino acids (e.g., Ala) is acceptable in *JAS*. Use of the internationally recognized chemical symbols for chemical elements (e.g., P and S) is acceptable in *JAS*. Except for N (not italicized), which is the recognized abbreviation for nitrogen and newton (unit of force), chemical symbols for elements are reserved for elements (e.g., C is for carbon and never for control). For chemical units and abbreviations, refer to the ACS Style Guide (published by the American Chemical Society, Washington, DC).

Physical units

Item	Unit
Bq	becquerel
°C	degree Celsius
cal	calorie
Ci	curie
cM	centimorgan (spell out morgan if used <i>r</i> without a pre x)
Da	dalton
Eq	equivalent (only can be used with a pre x; R^2 e.g., mEq)
g	gram
ha	hectare
Hz	hertz
IU	international unit
J	joule
L	liter
lx	lux
m	meter

<i>M</i>	molar (concentration; preferred over μ mol/L)
mol	mole
N	newton (N not italicized)
<i>N</i>	normal (concentration)
Pa	pascal
rpm	revolutions/minute (not to be used to indicate centrifugal force)
t	metric ton (1,000 kg)
V	volt
W	watt

Units of time

Item	Unit
s	second
min	minute
h	hour
d	day
wk	week
mo	month
yr	year

Statistical symbols and abbreviations

Item	Term
ANOVA	analysis of variance
CI	confidence interval
CV	coefficient of variation
df	degree(s) of freedom (spell out if used without units)

<i>F</i>	<i>F</i> -distribution (variance ratio)
LSD	least significant difference
<i>n</i>	sample size (used parenthetically or in footnotes; note italics)
P	probability
r	simple correlation coefficient
r^2	simple coefficient of determination
R	multiple correlation coefficient
R^2	multiple coefficient of determination
s^2	variance (sample)
SD	standard deviation (sample)
SE	standard error
SED	standard error of the differences of means
SEM	standard error of the mean
<i>t</i>	<i>t</i> -(or Student) distribution
α	probability of Type I error
β	probability of Type II error
μ	mean (population)
σ	standard deviation (population)
σ^2	variance (population)
χ^2	chi-squared distribution

Others

Item	Term
AA	amino acid(s)
ACTH	adrenocorticotrophic hormone

ADF	acid detergent fiber (assumed sequential unless designated otherwise)	CIE	International Commission on Illumination (Commission Internationale d'Eclairage)
ADFI	average daily feed intake (not to be confused with DMI)	CLA	conjugated linoleic acid
ADG	average daily gain	CoA	coenzyme A
ADIN	acid detergent insoluble nitrogen	Co-EDTA	cobalt ethylenediaminetetraacetate
ADL	acid detergent lignin	CP	crude protein ($N \times 6.25$)
ADP	adenosine diphosphate	D diam	dextro-diameter
AI	artificial insemination	DE	digestible energy
AIA	acid insoluble ash	DEAE	(dimethylamino)ethyl (as in DEAE-L cellulose)
ARS	Agricultural Research Service	DFD	dark, firm, and dry (meat)
ATP	adenosine triphosphate	DM	dry matter
avg	average (use only in tables, not in the text)	DMI	dry matter intake
BCS	body condition score	DNA	deoxyribonucleic acid
BLUE	best linear unbiased estimate	EBV	estimated breeding value(s)
BLUP	best linear unbiased prediction bp base pair	eCG	equine chorionic gonadotropin
BSA	bovine serum albumin	EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
BTA	<i>Bos taurus</i> chromosome	EFA	essential fatty acid
BW	body weight (used for live weight)	EIA	enzyme immunoassay
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
C/EBP	CAAT-enhancer binding protein	EPD	expected progeny difference(s)
cfu	colony-forming unit	Eq.	Equation(s)
		Exp.	experiment (always followed by a numeral)

FFA	free fatty acid(s)	IGFBP	insulin-like growth factor-binding protein(s)
FSH	follicle-stimulating hormone	IL	interleukin
GE	gross energy	IVDM	in vitro dry matter disappearance
GEBV	genomic estimated breeding value(s)	D kb	kilobase(s)
<i>g</i>	gravity	KPH	kidney, pelvic, heart fat
G:F	gain-to-feed ratio	LLD ₅₀	levo-lethal dose 50%
GLC	gas-liquid chromatography	LH	luteinizing hormone
GLM	general linear model	LHRH	luteinizing hormone-releasing hormone
GnRH	gonadotropin-releasing hormone	LM	longissimus muscle
GH	growth hormone	ME	metabolizable energy
GHRH	growth hormone-releasing hormone	MP	metabolizable protein
h^2	heritability	mRNA	messenger ribonucleic acid
i.m.	intramuscular	MUFA	monounsaturated fatty acid
i.p.	intraperitoneal	NAD	nicotinamide adenine dinucleotide
i.v.	intravenous	NADH	reduced form of NAD
hCG	human chorionic gonadotropin	NDF	neutral detergent fiber
HCW	hot carcass weight	NDIN	neutral detergent insoluble nitrogen
HEPE	<i>N</i> -(2-hydroxyethyl)piperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic acid	NE	net energy
S		NE _g	net energy for gain
HPLC	high-performance (pressure) liquid chromatography	NE _l	net energy for lactation
i.d.	inside diameter	NE _m	net energy for maintenance
Ig	immunoglobulin (when used to identify a specific immunoglobulin)	NEFA	nonesterified fatty acid
IGF	insulin-like growth factor	No.	number (use only in tables, not in the text)
		NPN	nonprotein nitrogen

NRC	National Research Council		ribosomal ribonucleic acid
o.d.	outside diameter	rRNA	
OIE	World Organisation for Animal Health (Office International des Epizooties)	SAS	SAS Institute Inc. (no longer stands for Statistical Analysis System)
OM	organic matter	s.c.	subcutaneous
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis	SDS	sodium dodecyl sulfate
PBS	phosphate-buffered saline	SFA	saturated fatty acid
PCR	polymerase chain reaction	SNP	single nucleotide polymorphism spp. species ssp. subspecies
PG	prostaglandin	SSC	<i>Sus scrofa</i> chromosome
PGF _{2α}	prostaglandin F _{2α}	ST	somatotropin
PMSG	pregnant mare's serum gonadotropin	TDN	total digestible nutrients
PPAR	peroxisome proliferator-activated receptor	TLC	thin layer chromatography
PSE	pale, soft, and exudative (meat)	Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
PUFA	polyunsaturated fatty acid(s)	tRNA	transfer ribonucleic acid
QTL	Quantitative trait locus (loci)	TSAA	total sulfur amino acids
RDP	ruminally degradable protein	USDA	Department of Agriculture US
REML	restricted maximum likelihood	UV	ultraviolet
RFLP	restriction fragment length polymorphism	VFA	volatile fatty acid(s)
RIA	radioimmunoassay	vol	volume
	ribonucleic acid	vol/vol	volume/volume (used only in parentheses)
RNA		vs.	versus
RQ	respiratory quotient	wt	weight (use only in tables, not in the text)
RUP	ruminally undegradable protein	wt/vol	weight/volume (used only in parentheses)

wt/wt weight/weight (used only in parentheses)

LITERATURE CITED GUIDELINES FOR JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE

References in the Text. In the body of the manuscript, refer to authors as follows: Smith and Jones (1992) or Smith and Jones (1990, 1992). If the sentence structure requires the authors' names to be included in parentheses, the proper format is (Smith and Jones, 1982; Jones, 1988a,b; Jones et al., 1992, 1993). When there are more than 2 authors of an article, the first author's name is followed by the abbreviation et al. More than 1 article listed in the same sentence or parentheses must be in chronological order first and alphabetical order for 2 publications in the same year. Published, peer-reviewed articles, and not abstracts, should be cited. However, if authors originally described their work in a meeting abstract, proceedings paper, old-day report, or similar presentation and then expanded the information to produce a full-length manuscript, the authors should reference and cite those reports. If the work was someone else's and originally described in an abstract, proceedings paper, old-day report, or similar presentation, the authors should determine whether the work has been expanded and published as a peer-reviewed article, and then reference and cite the peer-reviewed article.

Work that has not been accepted for publication shall be listed in the text as "J. E. Jones (institution, city, and state or country, personal communication)." The author's own unpublished work should be listed in the text as "(J. Smith, unpublished data)." Personal communications and unpublished data must not be included in the Literature Cited section.

Literature Cited Section. To be listed in LITERATURE CITED, articles must be published or accepted for publication ("in press"). In-press citations should be

updated with complete information during revision or in the author proofs. In LITERATURE CITED, citations are listed alphabetically according to author(s) last name(s), and then chronologically. The year of publication follows author names. As with text references, 2 or more publications by the same author or set of authors in the same year shall be differentiated by adding lowercase letters after the date. With the exception of consortia, the names of all authors must appear in LITERATURE CITED. For consortia, authors may include, as an acknowledgment on the title page, a link to the website containing the names and locations of the members of the consortium, or they may include the names and locations of the members of the consortium in an appendix, but not in an acknowledgement on the title page. Journal names shall be abbreviated according to the conventional ISO abbreviations used by PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>). One-word titles must be spelled out. Inclusive page numbers must be provided.

Sample references are as follows:

1. Books and articles within edited books:

AOAC. 1990. Official methods of analysis. 15th ed. Assoc. Off. Anal. Chem., Arlington, VA.

NRC. 2000. Nutrient requirements of beef cattle. 7th rev. ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC. Robinson, P. H., E. K. Okine, and J. J. Kennelly. 1992.

Measurement of protein digestion in ruminants. In: S. Nissen, editor, Modern methods in protein nutrition and metabolism. Academic Press, San Diego, CA. p. 121–127.

2. Handbooks, technical bulletins, theses, and dissertations

Goering, H. K., and P. J. Van Soest. 1970. Forage fiber analyses (apparatus, reagents,

procedures, and some applications). Agric. Handbook No. 379. ARS-USDA, Washington, DC.

Shreck, A. L., C. D. Buckner, G. E. Erickson, and T. J. Klopfenstein. 2011. Digestibility of crop residues after chemical treatment and anaerobic storage. In: 2011 Nebraska Beef Cattle Report. Rep. No. MP94. Univ. of Nebraska, Lincoln. p. 35–36.

Sigma. 1984. Total hemoglobin: Quantitative, colorimetric determination in whole blood at 530–550 nm. Tech. Bull. No. 525. rev. ed. Sigma Chemical, St. Louis, MO.

Ward, J. D. 1995. Effects of copper deficiency on performance and immune function of cattle. PhD Diss. North Carolina State Univ., Raleigh.

3. Journal articles and abstracts

Centon, J. R., G. E. Erickson, T. J. Klopfenstein, K. J. Vander Pol, and M. A. Greenquist. 2007. Effects of roughage source and level in finishing diets containing wet distillers grains on feedlot performance. *J. Anim. Sci.* 85(Suppl. 2):76. (Abstract.) doi:10.2527/jas.2006-354 (NOTE: The doi is now considered part of a citation.)

Cleale, R. M., IV, R. A. Britton, T. J. Klopfenstein, M. L. Bauer, D. L. Harmon, and L. D. Satterlee. 1987a. Induced non-enzymatic browning of soybean meal. II. Ruminant escape and net portal absorption of soybean protein treated with xylose. *J. Anim. Sci.* 65:1319–1326. (NOTE: Articles published before circa 2005 may not have a doi.)

Perez, V. G., A. M. Waguespark, T. D. Bidner, L. L. Southern, T. M. Fakler, T. L. Ward, M. Steidinger, and J. E. Pettigrew. 2011. Additivity of effects from dietary copper and zinc on growth performance and fecal microbiota of pigs after weaning. *J. Anim. Sci.* 89:414–425. doi:10.2527/jas.2010-2839

Revidatti, M. A., J. V. Delgado Bermejo, L. T. Gama, V. Landi Periaty, C. Ginja, L. A. Alvarez, J. L. Vega-Pla, A. M. Martinez, and BioPig Consortium. 2014. Genetic characterization of local Criollo pig breeds from the Americas using microsatellite markers. *J. Anim. Sci.* 92:4823–4832. doi:10.2527/jas.2014-7848

The Bovine Hap Map Consortium. 2009. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. *Science.* 324:528–532. doi 10.1126/science.1167936

4. Conference proceedings

Bailey, E. A., J. R. Jaeger, J. W. Waggoner, G. W. Preedy, L. A. Pacheco, and K. C. Olson. 2012. Effect of weaning method on welfare and performance of beef calves during receiving. *Proc. West. Sec. Amer. Soc. Anim. Sci.* 63:25–29.

NMC. 1995. Summary of peer-reviewed publications on efficacy of pre-milking and post-milking teat disinfections published since 1980. In: Natl. Mastitis Council. Reg. Meet. Proc., Harrisburg, PA. Natl. Mastitis Council, Arlington, VA. p. 82–92.

Talmant, A., X. Fernandez, P. Sellier, and G. Monin. 1989. Glycolytic potential in longissimus dorsi muscle of Large White pigs as measured after in vivo sampling. In: Proc. 35th Int. Congr. Meat Sci. Technol., Copenhagen, Denmark. p. 1129.

Van der Werf, J. H. J. 1990. A note on the use of conditional models to estimate additive genetic variance in selected populations. *Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Edinburgh, Scotland XIII:*476–479.

5. Electronic Publications

FDA. 2014. Approved animal drug products online (Green Book). <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/default.htm> (Accessed 26 December 2014.)

Galyean, M. L. and P. J. Defoor. 2003. Effects of roughage source and level on intake by feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 81(E. Suppl. 2):E8–E16.

Heaton, M. P., T. S. Kalb eisch, D. T. Petrik, B. Simpson, J. W. Kijas, M. L. Clawson, C. G. Chitko-McKown, G. P. Harhay, K. A. Leymaster, and the International Sheep Genomics Consortium. 2013. Genetic testing for TMEM154 mutations associated with lentivirus susceptibility in sheep. *PLoS ONE* 8(2): e55490. doi:10.1371/journal.pone.0055490

POLICIES REGARDING NUMBER USAGE FOR

JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE

Number usage in *JAS* is consistent with the *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*.

- All cardinal numbers are written as numerals except when they begin a sentence or appear in a title, when 2 numerals are adjacent in a sentence (spell out the number most easily expressed in words; e.g., two 10-kg samples), or when a number is used as a gure of speech.
- Numbers less than 1 are written with a preceding (leading) zero (e.g., 0.75).
- A comma separator is used in numbers greater than 999 (e.g., 1,234 and 1,234,567).
- Numerals should be used to designate ratios and multiplication factors (e.g., 2:1 and 3-fold increase).
- Statements such as “5 times less” should be avoided because “times” means multiplied by, and the product of a positive number (multiplicand) multiplied by 5, for example, is greater, not less, than the multiplicand. The opposite is true for a negative multiplicand, but the notion of “5 times less than –5,” for example, may be not be clear to readers.
- If a number is spelled out at the beginning of a sentence, its associated

unit is also spelled out (e.g., Ten microliters of uid . . . , not Ten μ L of uid . . .).

- Units of measurement not associated with a number should be spelled out rather than abbreviated (e.g., lysine content was measured in milligrams per kilogram of diet) unless used parenthetically, as “lysine content (mg/kg of diet) was measured,” or in tables and gures.
- Single-digit ordinals are spelled out (i.e., rst through ninth); larger ordinals are expressed in numeric form. Single-digit ordinals may be expressed numerically when they form part of a series (e.g., 1st, 3rd, 10th, 20th, not rst, third, 10th, and 20th).
- Measures must be presented in the metric system (SI or Système International d’Unités; see <http://physics.nist.gov/cuu/Units/introduction.html>).
- When a term must be expressed in nonmetric units for clarity (e.g., bushel weight), show the nonmetric value in parentheses immediately after the metric value.
- Use “to” instead of a hyphen to indicate a numerical range in text (e.g., 1 to 10).

Avoid the use of multiplying factors (e.g., $\times 10^{-6}$) in table columns or rows, or in gure axis labels because of the uncertainty about whether the data are to be, or already have been, multiplied by the factor.

- Avoid ambiguity by stating units (e.g., numbers of spermatozoa, millions/mL).
- Do not use more than one slant line (for “per”) in a single expression; for example, use 5 mg/(g · d) or 5 mg · g⁻¹ · d⁻¹ instead of 5 mg/g/d. Mathematically, “per” implies division; when 2 “per” occur consecutively, it is unclear precisely what is being divided by what.
- Dietary energy may be expressed in calories or in joules, although joule is the standard SI unit for energy.

- Hyphenate units of measure used as preceding adjectives (e.g., 5-kg sample). Hyphens are not used with percent or degree signs.
- Insert spaces around all signs (except slant lines) of operation when these signs occur between 2 values (e.g., 10 ± 1 ; $5 < 10$; $2 + 2 = 4$).
- Convert “mg %” to other units, such as mg/L or mg/mL.
- Use “mol/100 mol” rather than “molar percent.”.

VITA

Gabriel Faria Estivallet Pacheco, filho de Carlos Virgílio Estivallet Pacheco e Simone Margarida Faria Estivallet Pacheco, nasceu em 11 de março de 1983, Salvador, Bahia.

Ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, no segundo semestre de 2005. No período entre setembro de 2006 e setembro de 2007, trancou o curso para realizar estágio extracurricular em uma propriedade leiteira no estado de Baden Württemberg na Alemanha.

Ao longo da graduação realizou estágios no Laboratório de Nutrição de Ruminantes sob orientação do professor Dr. Gilberto Vilmar Kozloski e no laboratório de Bovinocultura de Leite sob orientação do professor Dr. Clair Jorge Olivo. Em 2008 foi um dos fundadores do Grupo de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia – GRENAC da UFSM.

No segundo semestre de 2010 realizou estágio curricular no Centro de Estudos em Nutrição de Animais de Companhia na Universidade Federal de Lavras (UFLA) sob orientação da professora Dr^a. Flávia de Oliveira Borges Saad. Graduou-se como Zootecnista em janeiro de 2011 pela UFSM.

Em abril de 2011 deu início ao curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), na área de Nutrição de Não Ruminantes, com ênfase em Nutrição de Cães e Gatos. Obteve o título de Mestre em Zootecnia em março de 2013 com a defesa da dissertação intitulada “Avaliação de complexos enzimáticos sobre o farelo de arroz integral e farinha de penas em dietas para cães” sob orientação do Prof^o Dr. Luciano Trevizan.

Entre maio de 2013 e junho de 2014 atuou como Técnico Especialista em Pesquisa e Desenvolvimento de produtos para animais de companhia na empresa Hercosul Alimentos Ltda.

Em abril de 2014, ingressou no Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS sob orientação do Professor Dr. Luciano Trevizan. Realizou doutorado sanduiche financiado pelo CNPq (Programa Conjunto de Bolsas de Doutorado na República Federal da Alemanha DAAD – CAPES – CNPq), no período de abril de 2016 até janeiro de 2017, junto ao Instituto de Nutrição Animal (Institut für Tierernährung) da Universidade Livre de Berlim (Freie Universität Berlin), na Alemanha, sob orientação do Prof^o Dr. Jürgen Zentek.

Em março de 2018 foi contratado novamente pela Hercosul Alimentos para atuar como Pesquisador III na área de pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) de produtos.