UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS JABOTICABAL

DESENVOLVIMENTO DE TESTE PARA AVALIAÇÃO DA APTIDÃO AERÓBIA DE BEAGLES IDOSOS

Thais Sgarbiero
Médica Veterinária

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JULIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

CAMPUS JABOTICABAL

DESENVOLVIMENTO DE TESTE DE PARA AVALIAÇÃO DA APTIDÃO AERÓBIA DE BEAGLES IDOSOS

Discente:Thais Sgarbiero

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

2021

S523d

Sgarbiero, Thais
Desenvolvimento de teste para avaliação da aptidão aeróbia de Beagles idoso/ Thais Sgarbiero. --Jaboticabal, 2021

83 p. : il., tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Guilherme de Camargo Ferraz

1. Fisiologia. 2. Cães. 3. Teste de esforço. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: DESENVOLVIMENTO DE TESTE PARA AVALIAÇÃO DA APTIDÃO AERÓBIA DE BEAGLES IDOSOS

AUTORA: THAIS SGARBIERO

ORIENTADOR: GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. GUILHERME DE CAMARGO FERRAZ (Participaçao Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Dra. CLARISSE SIMÕES COELHO (Participaçao Virtual)
Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias / Lisboa/Portugal

Prof. Dr. IVAN FELISMINO CHARAS DOS SANTOS (Participaçao Virtual)
FMVZ/UNESP / Botucatu/SP

Jaboticabal, 03 de dezembro de 2021

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

Thais Sgarbiero – Nascida na cidade de Piracicaba – SP, 28 de março de 1987. Biológa graduada na Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), campus Sorocaba-SP, iniciando o curso em 2006 e finalizando em 2009. Médica Veterinária graduada pela Universidade Estadual Paulista -Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, campus de Jaboticabal-SP, iniciando em 2014 e finalizando 2018. Durante a graduação em Medicina veterinária, realizou duas iniciações científicas pela FAPESP, orientada pelo Prof. Dr. Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa, na área de Bem-Estar Animal. Em 2017 estagiou no Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos da FCAV/UNESP e participou por 1 ano do programa Jovem Veterinário promovido pela Nestlé Purina. No programa Jovem Veterinário participou da rotina da nutrição clínica no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” (FCAV/UNESP), com orientação do Prof. Dr. Aulus Cavalieri Carciofi, realizou eventos e participou de cursos promovidos pela Nestlé Purina como estagiária da empresa. Em 2019 iniciou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da FCAV/UNESP, na área de Bioquímica e Fisiologia Animal, como bolsista CNPq, sob orientação do Prof. Guilherme de Camargo Ferraz.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos que me apoiaram até aqui: meus pais, que sempre incentivaram meus sonhos; ao Rodrigo, meu companheiro que incentiva de modo incansável para que eu persiga o melhor de mim; a Bianca, minha amiga e terapeuta que ajudou quando os dias ficaram mais difíceis; a Julia, que mais me ajudou nesse projeto, tanto na organização quanto na execução e também me ouvindo e tranquilizando quando tudo parecia caótico e por fim, aos colegas, professores, funcionários, estagiários e todos que possibilitaram de forma prática a realização desse projeto. Gratidão a todos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à FCAV como local de imensos aprendizados, de encontro com pessoas essênciais e queridas e de paisagem acolhedora, à CNPq pela bolsa de estudo (130172/2020-0) e por possibilitar esse período de aprendizado e à empresa Neovia-ADM pelo financiamento do projeto.

Agradeço ao Prof. Guilherme de Camargo Ferraz pela orientação, não somente de mestrado, mas também profissional, pelas conversas e conselhos e por sempre reconhecer e nos mostrar nossos acertos e esforços, mostrando a importância da autoconfiança.

Agradeço à Júlia Ribeiro Garcia de Carvalho pela amizade, pela colaboração na execução do projeto, por todos os ensinamentos e por ser uma profissional inspiradora.

A execução desse projeto também não seria possível sem os pós-graduandos, estagiários e ICs do LAFEQ que se dedicaram imensamente a esse projeto, principalmente ao Vinícuis, que me auxiliou desde o início. Agradeço muito a toda equipe LAFEQ.

Também não seria possível a realização do projeto sem o auxílio das pós-graduandas Fernanda Mendonça, Letícia Pacheco e Camila Goloni do Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos que foram fundamentais para garantir a qualidade. Agradeço imensamente por toda a dedicação, mesmo durante a pandemia.

Agradeço também aos professores Aulus Cavalieri Carciofi, Kênia Cardoso Bícego, José Correa de Lacerda Neto, Gener Tadeu Pereira, Clarisse Simões Coelho, Ivan Felismino Charas dos Santos e todos os professores que disponibilizaram recursos e tempo a favor do projeto.

Por fim, agradeço também aos funcionários do departamento de Morfologia e Fisiologia animal Angela, Euclides e Damares que auxiliam nossos projetos e alegram nossos dias. aprendizado.

SUMÁRIO

Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA.....iii
RESUMO.....iv
ABSTRACT v
LISTA DE ABREVIAÇÕES..... vi
LISTA DE FIGURAS.....vii
LISTA DE TABELAS.....viii
1. INTRODUÇÃO.....1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....2
2.1. Exercício físico e saúde.....2
2.2. Exercício físico para idosos.....3
2.3. Testes para avaliação da aptidão aeróbia em cães.....4
2.4. Variáveis fisiológicas para avaliação da aptidão aeróbia.....5
3. MATERIAL E MÉTODOS.....9
3.1. Animais.....9
3.2. Local.....9
3.3. Habituação dos animais à esteira ergométrica.....10
3.4. Testes de carga incremental (TCI).....11
3.5. Momentos de coleta 13
3.6.. Mensurações fisiológicas e comportamentais.....16
3.6.1. Lactato (Lac) e Glicose (Gli) 16
3.6.2. Temperatura Retal (TR).....16

3.6.3. Frequência Cardíaca (FC) 17

3.6.4. Termografia infravermelha superficial (IT).....17

3.6.5. Escore de Percepção de Esforço (EE).....20

3.6.6. Hemograma completo (Hemo) e P roteína total (PT).....20

3.6.7. Turgor cutâneo (Turgor).....20

3.6.8. Hemogasometria venosa (Hgas).....20

3.6.9. Creatina qunase (CK) e aspartato aminotransferase (AST).....21

3.7. Delineamento e análise estatística dos dados.....21

4. RESULTADOS.....22

5. DISCUSSÃO.....44

6. CONCLUSÃO.....54

7. REFERÊNCIAS.....55

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Câmpus de Jaboticabal

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **"Desenvolvimento de teste para avaliação da aptidão física de cães idosos"**, protocolo nº 003122/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Guilherme de Camargo Ferraz, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 14 de março de 2019.

Vigência do Projeto	15/04/2019 a 30/12/2020
Espécie / Linhagem	*Canis familiaris*
Nº de animais	20
Peso / Idade	11± 3 kg/ Jovens 2± 1 anos e idosos 11± 2 anos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Laboratório de Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos "Prof. Dr. Flávio Prada"

Jaboticabal, 14 de março de 2019.

Fabiana Pilarski

Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil
tel 16 3209 7100 www.fcav.unesp.br

DESENVOLVIMENTO DE TESTE PARA AVALIAÇÃO DA APTIDÃO AERÓBIA DE BEAGLES IDOSOS

RESUMO – Assim como para humanos, o exercício físico regular em cães idosos pode ser uma ferramenta para reduzir efeitos deletérios induzidos pelo avanço da idade. Neste sentido, protocolos para avaliação da aptidão aeróbia de cães idosos se fazem necessários para o desenvolvimento de programa de exercício contínuo. A finalidade do estudo foi caracterizar possíveis diferenças fisiológicas entre cães adultos e idosos e verificar a efetividade do TCI como teste de aptidão aeróbia específico para cães idosos. Utilizaram-se 18 cães Beagles, sendo 9 cães adultos (A) e 9 cães idosos (I) para realização do teste. O TCI foi realizado em esteira ergométrica, utilizando velocidade constante (1,5 m/s) e incrementos de carga por meio da inclinação da esteira (7,5%) e acréscimo de pesos por meio de chumbos de pesca alocados em colete adaptado para cães nas porcentagens crescentes de 5, 10 e 15% da massa corpórea de cada cão. Aplicou-se teste t Student para avaliação intergrupo e ANOVA para amostras repetidas no tempo ($p<0,05$). O TCI promoveu aumento da lactatemia em I (1,62±0,55 mM) em relação a A (0,89±0,2 mM), assim como aumento na atividade sérica de CK e AST em A (568±605 e 41±23, respectivamente) em relação a I (183±98 e 27±7,5, respectivamente). O grupo I diferiu de A, após o TCI, também na temperatura superficial de *Longissimus dorsi* (33,2±0,9 e 34,7±1,1ºC, respectivamente), pH (A=7,42±0,03 e I=7,45±0,02) e $pvCO_2$ (A= 36,0±2,4 e I=32,3±4,0mmHg). Na avaliação de turgor cutâneo, A diferiu de I antes do TCI (A=1,30±0,5 e I=1,99±0,6s) e no escore de percepção de esforço (A=1, sendo considerado esforço leve e I=2, sendo considerado esforço moderado). O TCI demonstrou ser de uso prático e seguro para avaliar aptidão aeróbia de cães idosos e apontou diferenças fisiológicas entre os grupos experimentais.

Palavras-chave: esteira, fisiologia do exercício, carga de chumbo, teste de esforço incremental

DEVELOPMENT OF TEST TO ASSESS THE AEROBIC FITNESS OF ELDERLY BEAGLES

ABSTRACT – As for humans, regular exercise in elderly dogs can be a tool to reduce deleterious effects induced by aging. In this sense, protocols for evaluating the aerobic fitness of elderly dogs are necessary for the development of a continuous exercise program. The purpose of this study was to characterize possible physiological differences between adult and elderly dogs and verify the effectiveness of the ILT as a specific aerobic fitness test for elderly dogs. Eighteen Beagles dogs were used, 9 adult (A) and 9 elderly dogs (E) to perform the test. The ILT was performed on an ergometric treadmill, using constant speed (1.5 m/s) and load increments through the inclination of the treadmill (7.5%) and weight addition through lead load allocated in a vest adapted for dogs in the increasing percentages of 5, 10 and 15% of the body mass of each dog. Student's t test was applied for intergroup evaluation and ANOVA for samples repeated over time ($p<0.05$). The ILT promoted an increase in lactatemia in E (1.62±0.55 mM) in relation to A (0.89±0.2 mM) and an increase in the serum activity of CK and AST in A (568±605 and 41±23, respectively) compared to E (183±98 and 27±7.5, respectively). Group E differed from A also in the surface temperature of *Longissimus dorsi* (33.2±0.9 and 34.7±1.1, respectively), pH (A=7.42±0.03 and E=7, 45±0.02) and pvCO2 (A= 36.0±2.4 and E=32.3±4.0) after ILT, in the skin turgor test before ILT (A=1.30±0.5 and E=1.99±0.6) and on the perceived exertion score (A=1, being considered mild exertion and E=2, being considered moderate effort). ILT proved to be of practical and safe use to assess aerobic fitness of elderly dogs and showed physiological differences between the experimental groups.

Keywords: exercise physiology, incremental exercise test, lead load, treadmill

LISTA DE ABREVIAÇÕES

TEI – teste de esforço incremental

DC – débito cardíaco

FC – frequência cardíaca

CK – creatina quinase

AST – aspartato aminotransferase

TCI – teste de carga incremental

A – grupo de cães adultos

I – grupo de cães idosos

Lac – concentração de lactato

Gli – concentração de glicose

TR – temperatura retal

Aclim – aclimatação

Aqueci – aquecimento

Desaq – desaquecimento

IT – imagem termográfica

Hemo – hemograma

Hgas – hemograsomeria

Turgor – teste do turgor cutâneo

EE – escore de percepção de esforço

BF – termografia na região de *bíceps femoris*

CL – termografia na região da carúncula lacrimal

LD - termografia na região de *longissimus dorsi*

CM - termografia na região de coxim metatársico

PT – proteína total

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do Teste de Carga Incremental (TCI) com as coletas realizadas e especificações executadas em cada etapa.....12

Figura 2. Regiões das termografias realizadas e locais do spot para mensuração da temperatura superficial 19

Figura 3. Área sob a curva da concentração de lactato (A) e glicose (B), da temperatura retal (C) e frequência cardíaca (D) ao longo do Teste de Carga Incremental (TCI) dos cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos). A_{area} = tamanho da área sob a curva do grupo Adulto.....25

Figura 4. Linha de tendência quadrática da oncentração de lactato (A) e glicose (B), da temperatura retal (C) e frequência cardíaca (D) ao longo do Teste de Carga Incremental (TCI) dos cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos).....26

Figura 5. Área sob a curva da temperatura superficial da região de *bíceps femoris* (A), temperatura superficial da região de *longissimus dorsi* (B), temperatura superficial de carúncula lacrimal (C) e temperatura superficial do coxim metatársico (D) ao longo do Teste de Carga Incremental (TCI) de cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos). .....**Erro! Indicador não definido.**28

Figura 6. Curva de tendência quadrática da temperatura superficial da região de bíceps femoris (A), temperatura superficial da região de longissimus dorsi (B), temperatura superficial de carúncula lacrimal (C) e temperatura superficial do coxim metatársico (D) ao longo do Teste de Carga Incremental (TCI) de cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos). 29

Figura 7. Área sob a curva (A e B) e linha de tendência quadrática (C e D) da atividade das enzimas creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) ao longo do Teste de Carga Incremental (TCI) dos cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos).....30

Figura 8. Relação entre a concentração de lactato (A) e glicose (B), de temperatura retal (C) e frequência cardíaca (D) durante o Teste de Carga Incremental (TCI) dos cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos). 33

Figura 9. Relação entre a atividade enzimática de creatina quinase (A) e de aspartato aminotransferase (B) após o TCI dos cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos).....35

Figura 10. Temperaturas superficiais obtidas por meio de imagens termográficas de regiões dos músculos bíceps femoris (A) e Longissimus dorsi (B), da carúncula lacrimal (C) e do coxim metatársico (D) ao longo do Teste de Carga Incremental (TCI) de cães dos grupos Adulto (A, 4±2 anos) e Idoso (I, 14±3 anos). 37

Figura 11. Médias de pvO_2, $pvCO_2$ e pH coletados em sangue venoso e mediana do teste de turgor cutâneo (Turgor) analisados em sangue venoso dos grupos de cães Adulto (A, 4±2 anos) e Idoso (I, 14±3 anos) nos momentos Antes e Após e Teste de Carga Incremental (TCI). 40

Figura 12. Avaliação intergrupo (**A**) da mediana do Escore de Percepção de Esforço (EE) dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos). Avaliação intragrupo (**B**) das medianas nos momentos de observação durante o Teste de Carga Incremental (TCI) e curva de tendência quadrática com setas vermelhas apontando os momentos de pico (**C**).....43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Protocolo do Teste Incremental de Carga (TCI) com as etapas de exercício e momentos de coleta (Coletas), assim como o tempo coleta (Tempo) e especificações dessas antes, durante e após o teste de esforço incremental. 15

Tabela 2. Mediana geral e da área sob a curva (mediana da área) com a amplitude (max-min), média geral e média da área sob a curva (Média da Área) com desvio padrão e média do pico com desvio padrão e momento de coleta de pico, calculados por meio da curva de tendência de lactato e glicose séricos, temperatura retal, frequência cardíaca e biomarcadores musculares creatina quinase (CK) e spartato aminotransferase (AST) de cães Adultos (A) e Idosos (I) que realizaram teste de carga incremental.....24

Tabela 3. Média e desvio padrão das variáveis fisiológicas de 18 cães Beagles distribuídos nos grupos Adulto (A, n=9) e Idoso (I, n=9) ao longo dos momentos de coleta do Teste de Carga Incremental (TCI).....32

Tabela 4. Valores de mediana com mínimo (min) e máximo (max) das atividades séricas de creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) nos momentos de coleta antes e após o teste de esforço incremental (TCI).....34

Tabela 5. Média ± desvio padrão dos parâmetros hemogasométricos (pH, $pvCO_2$, pvO_2) e do teste de turgor cutâneo (Turgor) dos grupos Adulto (A, n= 9, 4±2 anos) e Idoso (I, n= 9 cães, 14±3 anos) nos momentos logo antes (Antes) do Teste de Esforço Incremental (TCI) na esteira e logo após a última etapa do TCI (Após).....39

Tabela 6. Média ± desvio padrão dos parâmetros hematológicos dos grupos Adulto (A, n= 7, 4±2 anos) nos momentos logo antes (Antes) do Teste de Esforço Incremental (TCI) na esteira e logo após a última etapa do TCI (Após).....41

1. INTRODUÇÃO

A expectativa de vida dos animais de estimação tem se elevado (Metzger, 2005) e existe crescente interesse na saúde e bem-estar de cães idosos (Bartges et al., 2012). Segundo senso relativamente antigo da *American Veterinary Medical Association* (AVMA, 2007), 30 a 40% de 78 milhões de cães nos EUA tem idade maior que sete anos. Cuidados com saúde dos cães nesta faixa etária são fundamentais, uma vez que possuem necessidades específicas e são mais propensos a desenvolver afecções crônicas degenerativas, tais como osteoarticulares, renais, hepáticas, entre outras.

O envelhecimento em mamíferos é acompanhado pelo declínio de diversas funções físicas e fisiológicas (Middelbos et al., 2009). Para animais de estimação, bem como para humanos, o envelhecimento acarreta mudanças fisiológicas, como redução nos sentidos de visão e audição, declínio e clareamento da pelagem, assim como alterações menos óbvias que podem envolver sistemas digestivo, imunológico ou renal (Laflamme, 2012). Estudos recentes foram realizados para avaliar e comprovar o declínio cognitivo em cães, causado progressivamente pelo envelhecimento (Krug et al., 2018). No entanto, outra característica debilitante da senilidade em cães tem sido menos estudada: a perda de massa muscular denominada sarcopenia (Cruz-Jentoft et al., 2010).

Esta redução de massa muscular é identificada no próprio envelhecimento *per se*, acometendo a espécie humana e animais de companhia, especialmente durante o período de senilidade, sendo tema cada vez mais importante na medicina humana e na medicina veterinária devido à alta prevalência e implicações clínicas (Freeman, 2012). A perda de força muscular não só diminui a mobilidade e a autonomia individual, mas também está relacionada a inúmeros fatores desfavoráveis à saúde, sendo a sarcopenia (perda da massa muscular devido à idade) a principal causa de redução de qualidade de vida (Wallis et al., 2018).

Tanto para humanos (Gremeaux et al., 2012; Lustosa et al., 2015) quanto para cães (Kerrigan, 2017) é conhecido que o exercício físico pode reduzir efeitos deletérios induzidos pelo avanço da idade. Nesse sentido, a prescrição de protocolos de exercício feita por um profissional é necessária para que o exercício seja realizado

de modo otimizado e rotineiro, buscando eficácia e evitando lesões causadas por programas de exercício errôneos. Para a prescrição de protocolos de exercício eficazes são utilizados testes de avaliação da aptidão aeróbia desses pacientes, a fim de compreender a atual aptidão aeróbia e planejar meios de se alcançar a aptidão desejada. Esses testes podem ser aplicados numa esteira ergométrica, sendo intensamente utilizados tanto em humanos (Mugele et al.,2018), equinos (Ferraz et al., 2008) e cães adultos (Cerqueira et al., 2018; Restan et al., 2019). Na literatura as informações sobre testes de esforço são escassas em cães idosos, sendo essa lacuna ainda mais evidente em cães geriátricos sendo avaliados numa esteira sob condições controladas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Exercício físico e saúde

Em humanos é conhecido que a inatividade física é uma das causas reais de 35 doenças crônicas que afetam os sistemas imunológico, reprodutivo, digestório, nervoso, musculoesquelético, cardiorrespiratório, endócrino e ósseo (Booth; Roberts; Laye, 2012). Muitas das doenças crônicas possuem diversas possíveis origens, no entanto, é conhecido que a inatividade física é responsável por 20 a 45% de seis dessas para humanos, sendo essas, doenças cardiovasculares (Booth et al., 2017), diabetes melitos tipo 2 (Aune et al., 2015), neoplasias de mama (Gonçalves et al., 2014) e de colon (Boyle et al., 2012), disfunção cognitiva (Beydoun et al., 2014) e depressão (Schuch et al., 2016). Os benefícios do exercício físico a longo prazo também são bem descritos no combate e prevenção da obesidade (Speretta; Leite; de Oliveira Duarte, 2014), para hipertensão (Brito et al., 2021) e tem sido estudado para auxílio da osteoartrite (Keogh et al., 2018).

A sarcopenia é um problema comum na população humana e idosa e que compõem majoratoriamente a síndrome da fragilidade (Nascimento et al., 2019). É uma síndrome relacionada a perda progressiva e generalizada de massa e força muscular, podendo resultar em deficiência física, baixa qualidade de vida e morte (Cruz-Jentoft et al., 2010). Quando o processo de perda muscular se torna crônica e prejudica a autonomia do indivíduo, ele pode levar à fragilidade, sendo essa síndrome

complexa que leva ao aumento da vulnerabilidade, resultando na debilidade de vários órgãos e na limitação da capacidade de manutenção da homeostase (Nascimento et al., 2019).

A origem da sarcopenia em idosos é a degeneração multifacetada, envolvendo a atrofia de miofibras de tipo II (tipo IIa e IIx), responsáveis pela contração rápida da musculatura (Roberts et al., 2018). O combate e a prevenção da sarcopenia tem sido obtida pela hipertrofia das fibras de tipo II, alcançada por meio de treinamentos com exercício resistido (Kim; Kang, 2020; Kirwan et al., 2020). Os exercícios resistidos tem ganhado cada vez mais atenção, mostrando também serem eficazes no combate e prevenção de diabetes melitos tipo II (Codella et al., 2018), ainda com efeitos positivos na funcionalidade e estrutura cerebral, de modo que evocam mudanças do lobo frontal, levando a melhorais nas funções executivas e a menor atrofia e menos lesões na substância branca (Herold et al., 2019).

Apesar do vasto conhecimento dos benefícios do exercício físico para saúde, qualidade de vida e longevidade para humanos, poucos estudos foram realizados para demonstrar esses benefícios para os animais de campanhia. Alguns artigos são encontrados demonstrando benefícios do exercício físico para cães em doenças cardiovasculares (Sutayatram et al., 2018; Restan et al., 2020) e perda de massa corpórea (Uribe et al., 2016; Vitger et al., 2016). No entanto, para animais de companhia ainda existem muitas lacunas sobre teste de esforço destinado a prescrição da carga para treinamento, visando tanto desempenho como manutenção da saúde, sendo esse último abordagem chave para auxiliar na qualidade de vida, longevidade bem-estar de animais idosos.

2.2. Exercício físico para idosos

Os mecanismos do envelhecimento não são completamente conhecidos, sendo conhecidas algumas intervenções que podem influenciar para um processo de envelhecimento bem-sucedido em indivíduos da espécie humana, possibilitando que desfrutem de saúde física e mental e maior longevidade (WHO, 2010). Entre essas, além da alimentação saudável e bem-estar psicossocial, a atividade física tem sido revelada como fundamental (Gremeaux et al., 2012). Os benefícios da atividade física

crônica para humanos idosos incluem melhoria na aptidão física, reduzindo o risco de quedas e proporcionando independência para atividades diárias (Bichay et al., 2016; Carraro et al., 2018).

Desta maneira, para desenvolvimento de programa de exercício contínuo é considerado o nível de aptidão física do indivíduo, sendo necessário a compreensão da dose-resposta de um teste de esfoço para otimizar a prescrição de intensidades corretas de treino (Aarskog et al., 2012). Em humanos, muitos estudos a partir de testes para avaliação da aptidão física, revelaram o efeito de intensidade, repetição e tempo de treinamento de diversos tipos de exercícios para idosos (Lustosa et al., 2015; Bichay et al., 2016). No entanto, pouco se sabe sobre a dose-resposta de um teste de esfoço para avaliação da aptidão física em cães, especialmente nos idosos.

2.3. Testes para avaliação da aptidão aeróbia em cães

Atualmente, na literatura científica são encontrados diversos artigos com cães que envolvem fisiologia do exercício e testes de esforço incremental, relacionados principalmente a cães atletas (Radin et al., 2015; Cerqueira et al., 2018; Restan et al., 2019) e cães de trabalho (Alves et al., 2012).

O teste de esforço incremental (TEI) é utilizado para determinar a aptidão aeróbia com base na taxa de trabalho, bem como na duração e na magnitude dos incrementos da taxa de trabalho (Bentley et al.,2007). A partir do TEI são obtidas variáveis clínicas e laboratoriais como frequência cardíaca e biomarcadores séricos para avaliação da capacidade física e abordagem preventiva de lesões, sendo comuns tanto em humanos (Da Ponte et al., 2018), quanto equinos (Ferraz et al., 2009; Soroko et al., 2018) e cães (Ferasin; Marcora, 2009; Piccione et al., 2012; Cerqueira et al., 2018; Restan et al., 2019).

Apesar do crescente número de estudos científicos na área de fisiologia do exercício em cães, nenhum estudo foi encontrado sobre o desenvolvimento de teste específico para avaliação da aptidão física de cães idosos. Segundo Rikli e Jones (1999), um teste de aptidão física para ser aplicado em indivíduo da espécie humana idosos, deve ser ajustado para que se torne seguro para a maioria dos indivíduos dessa faixa etária. Brooks et al. (2014) citou a importância e benefícios do exercício físico para cães, no entanto, refere à lacuna de programas de exercício ideais. Para

cães idosos essa lacuna pode ocorrer devido à falta de testes de aptidão física direcionado para essa faixa etária, resultando, dessa forma, na falta de programas de condicionamento físico que possam ser utilizados por profissionais da área para cães idosos, com segurança e praticidade.

2.4. Variáveis fisiológicas para avaliação da aptidão física

Fisiologicamente, durante o exercício físico, o débito cardíaco (DC) está relacionado com capacidade aeróbia por meio da clássica equação de Fick ([$\dot{V}O_2$=DCx (a-VO_2)]. Esta equação mostra que o consumo de oxigênio é produto da relação do DC e da diferença artério-venosa de oxigênio (a-v O_2). O DC se relaciona à frequência cardíaca (FC) por meio da equação DC=FC x Vej, ou seja, DC é o produto da FC pelo volume se sangue ejetado do coração (Vej). Dessa forma, a FC se relaciona com o DC e o VO_2 e é muito utilizada para estimar a capacidade aeróbia do indivíduo (Berkman et al., 2015).

A mensuração da temperatura corporal é outra importante medida fisiológica durante a atividade física, uma vez que revela a capacidade de termorregulação que pode limitar o desempenho (Periard et al., 2021). Assim, caracterizações precoces de hipertermia durante e após o exercício foram amplamente examinadas por meio do registro da temperatura retal (Rizzo et al., 2017, Kennedy et al., 2021), sendo medida sensível para detecção de alterações nas respostas termorregulatórias devido à desidratação (Baker, 1984) e temperatura central (Kozłowski et al., 1985). Apesar de temperatura retal ser tradicionalmente utilizada para medidas fisiológicas em cães, a termografia tem sido empregada como uma forma menos invasiva e eficaz no monitoramento fisiológico do controle térmico de cães submetidos a exercício físico (Vainionpää et al., 2012; Rizzo et al., 2017; Elias et al., 2021).

Por meio da temperatura superficial (termografia) pode ser avaliado de forma limitada, porém não invasiva, o metabolismo do organismo (Redaelli et al.,2014) e a atividade muscular (Repac et al., 2020). O calor gerado pelo metabolismo é transmitido na corrente sanguínea e a atividade muscular gera calor, esse calor pode ser captado pela termografia infravermelha (Vainionpää et al., 2012).

Em cães a termorregulação ocorre principalmente através do arquejo (Goldberg et al., 1981), mas também através da sudação dos coxins (Ninomiya et al., 2013).

Estes parecem participar da termorregulação para dissipação do calor em condições de emergência, quando o trato respiratório está preservando sua função de troca gasosa (Robertshaw, 1971). Devido ao resfriamento evaporativo que ocorre através da respiração, os cães podem ser induzidos a perda hídrica respiratória e contribuir paraum estado de desidratação (Baker et al., 1983). Sendo que nessa condição, os cães podem ter redução da performance e risco à saúde (Baker et al., 1983). Dessa forma, a mensuração da hidratação de cães antes e após o exercício físico determina a segurança do teste, uma vez que cães desidratados podem apresentar menor fluxo sanguíneo e débito cardíaco (Baker, 1984). Estudo recente utilizou testes clínicos elementares como turgor cutâneo e tempo de preenchimento capilar para avaliar desidratação após treino de busca e resgate em cães, detectando leve desidratação após 15 min de exercício (Goucher et al., 2019).

Avaliações laboratoriais são fundamentais e complementam avaliações clínicas. Em indivíduos saudáveis, o aumento da concentração de lactato está primariamente ligado a realização de exercício físico (Glancy et al., 2021). O lactato por mais de um século, de modo simplicado, tem sido ligado a hipóxia e sendo referido erroneamente como causador de fadiga e dor muscular e mesmo atualmente, apesar de numerosos estudos demonstrando o lactato como substrato energético para a contração muscular (Ferguson et al., 2018; Brooks, 2018).

Em diversos estudos são utilizados o termo “limiar anaeróbio” indicando a idéia que o aumento da intensidade de exercício resulta em um ambiente hipóxico, criando dependência do organismo da glicólise e consequente acúmulo de lactato (Wasserman; McIlroy, 1964; Wasserman et al. 1973). No entanto, está estabelecido que as mitocôndrias são capazes de trabalhar em pressões parciais de oxigênio diminutas, incluindo em carga de exercício que provocam aumento do lactato plasmático (Ferguson et al., 2018). Portanto, o termo limiar de lactato se torna mais propício para se referir ao início do desequilíbrio entre a produção e a remoção de lactato (Glancy et al., 2021). A relação exponencial entre a concentração plasmática de lactato obtida a partir de um TEI é ferramenta importante para o diagnóstico do condicionamento e prescrição de programas de exercício (Ferraz et al., 2008).

Durante esforços intensos que duram segundos ou durante atividades com alta intensidade intermitentes, a maior parte do ATP é derivada da hidrólise da

fosfocreatina e do glicogênio em piruvato que posteriormente é convertido a lactato (Hargreaves, Spriet, 2020). A produção de lactato aumenta quando ocorre taxas aceleradas de glicólise e se acumula no músculo e no sangue, principalmente em intensidades de exercício mais elevadas (Spriet et al., 2000). Atualmente, é conhecido que o lactato é um substrato importante para o metabolismo oxidativo, gliconeogênese e glicogênese muscular (Medbø et al., 2006; Brooks, 2018), e como molécula sinalizadora que medeia as adaptações ao exercício (Takahashi et al., 2019). Após a produção de lactato, este é distribuído por todo o organismo, servindo como combustível pela oxidação de tecidos, ou como um precursor para a gliconeogênese ou glicogênese (Ferguson et al., 2018).

Além do lactato, outros biomarcadores musculares podem ser utilizados para compreender as adaptações fisiológicas que são induzidas por diferentes tipos de exercício. Desta maneira, enzimas como creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) são liberadas na corrente sanguínea quando ocorre microtraumas ou microlesões na musculatura devido ao esforço realizado (Silva; Macedo, 2011). A atividade plasmática dos biomarcadores musculares muda após o exercício, sem que para isso ocorra necessariamente lesões significativas das fibras musculares (Cerqueira et al., 2018).

A CK é encontrada no músculo esquelético, no miocárdio e no tecido cerebral, sendo considerada por muitos autores como indicador útil de danos musculares (Lippi et al., 2019). É formada por duas subunidades, M e B, que formam três isoenzimas: CK-BB, predominante no cérebro e sistema digestório; CK-MB, presente no tecido cardíaco, nos rins, nos intestinos e nos pulmões; e CK-MM, presente no músculo estriado (Aktas et al., 1993). É conceito estabelecido na literatura que exercícios de alta intensidade podem induzir elevações da atividade sérica da CK (McGowan, 2008). Em mamíferos, a CK é comumente utilizada para o diagnóstico de rabdomiólise (Melli et al., 2005). Recentemente, num estudo publicado com cães da raça Beagles adultos (2 ± 1 anos) submetidos a TEI, foi encontrado pico transitório de CK seis horas após o fim do exercício, sendo que o retorno ao valor basal ocorreu em 24 h (Cerqueira et al., 2018). Portanto, neste estudo foi considerado que o exercício provocou microlesões ou aumento passageiro da permeabilidade do sarcolema. Tal mudança não produziu alteração clínica digna de nota, não podendo ser consideradas como

rabdomiólise. Resultado semelhante foi encontrado num estudo recente que submeteu cães da raça Pastor Alemão a exercício teste submáximo em esteira (Menchetti et al., 2019).

A AST é encontrada principalmente no fígado, nas hemácias e nos músculos esquelético e cardíaco. Por ser enzima presente no citoplasma e nas mitocôndrias, necessita de maior grau de lesão ou microlesão para ser liberada na corrente sanguínea. Em equinos, valores de CK elevam-se primeiro que os da AST, sendo que a CK é também a primeira a regressar a valores normais (Teixeira-Neto et al., 2008). No estudo de Cerqueira et al. (2018) foi observado que como CK, o pico de AST ocorreu no período de 6 h após o TEI, representando um valor maior que cinco vezes o valor basal, retornando, ao valor basal em 24 h, sugerindo que, da mesma maneira que a CK, não houve lesões musculares significativas.

A hemogasometria e o hemograma determinados antes e após exercício físico podem identificar alterações fisiológicas. A hemogasometria é considerada método adequado e confiável para detectar mudanças no equilíbrio ácido-base dos fluidos corporais (Gokce et al., 2004). Em cães, alterações metabólicas no controle ácido-base podem ocorrer em resposta ao exercício (Matwichuk et al., 1999; Rovira et al., 2007; Mendoza-Lara et al., 2012).

Em humanos, durante o TEI, é utilizada uma escala de percepção subjetiva de esforço, de modo que o paciente possa, durante o teste, indicar a sensação de esforço realizado, estando esse relacionado com o condicionamento físico. Em humanos, a escala tradicional de percepção subjectiva de esforço foi desenvolvida por Borg (1998). Em estudo recente, Swanson et al., (2019) desenvolveram escala de percepção de esforço para cães inspirada em escala desenvolvida para avaliação física de crianças que, assim como nos pacientes caninos, são incapazes de descrever sua percepção em relação a intensidade de exercício. O uso de escala de percepção pode promover maior segurança no TEI e colaborar para a avaliação do esforço exigido no teste, além de permitir avaliação do condicionamento físico dos cães.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Participaram do estudo 18 cães da raça Beagle, sendo cinco fêmeas e 13 machos, provenientes do canil Laboratório de Pesquisa em Nutrição e Doenças Nutricionais de Cães e Gatos “Prof. Dr. Flávio Prada”, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, campus de Jaboticabal. Desses animais, nove foram adultos jovens (seis machos e três fêmeas), com idade de 4 ± 2 anos (grupo A) e nove cães idosos (sete machos e duas fêmeas), com 14 ± 3 anos (grupo I). Todas as fêmeas foram castradas e apenas um macho idoso foi castrado. O escore corporal (Laflamme, 1997) da maioria dos cães adultos foi 4, sendo que apenas dois cães, um macho (escore 5) e uma fêmea (escore 6); quanto aos idosos, seis cães tiveram o escore corporal 5, sendo que dois machos apresentaram os escores de 6 e 4 e uma fêmea com escore 7. Os animais foram desverminados e, para certificar o estado de higidez, hemogramas e exames bioquímicos, eletrocardiográficos e ecocardiográficos e exames radiográficos foram realizados antes do início do experimento.

Dos cães idosos, sete apresentaram endocardiose de mitral com insuficiência leve, sendo que três necessitavam de medicamentos maleato de enalapril (0,5 mg/kg a cada 12 ou 24h) e desses dois recebiam também furosemida (4 mg/kg a cada 24h). Todos os cães se apresentaram aptos e tiveram a frequência cardíaca acompanhada durante o exercício.

3.2. Local

O experimento foi conduzido no mês de agosto pelo Laboratório de Fisiologia do Exercício (LAFEQ) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista, câmpus de Jaboticabal (UNESP/FCAV), localizada em 21º14’44”S e 48º18’16”O a 606m acima do nível do mar. Todos os procedimentos experimentais foram previamente julgados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da mesma instituição, e aprovados sob o protocolo n.º 003122/19. Os cães

foram mantidos no canil, em até três cães por baia, de acordo com grupos de afinidade, tendo à disposição água *ad libitum* e dieta exclusivamente à base de ração, calculada em consonância com sua demanda energética individual. A sala de exercício contendo a esteira ergométrica (Galloper® 5500, Sahinco, Palmital - Brasil) se localizava a 30 m do canil, no Laboratório de Medicina Esportiva Equina (LMEE/FCAV).

3.3. Habituação dos animais à esteira ergométrica

O objetivo da fase de adaptação foi que os cães se habituassem aos pesquisadores, saída do canil, à sala da esteira, assim como ao ruído da esteira, uso do colete (local o qual foi armazenado os pesos metálicos), bem como caminhar sem desequilíbrio na esteira a 1,5 m/s numa inclinação de 7,5%. Os cães foram retirados do canil e conduzidos à sala de esteira diariamente, durante 10 dias no período da manhã. Nos primeiros dias os cães foram levados à sala da esteira em grupos de afinidade e familiarizados com ao local, onde foram realizados os testes de carga incremental. Os cães foram incentivados a subir na esteira desligada e receberam reforço positivo (ração seca). Uma vez habituados à esteira rolante desligada, esta foi ligada para que se habituassem ao ruído da esteira, recebendo reforço positivo quando estavam calmos e próximos à esteira. Em seguida os cães foram colocados individualmente sobre a esteira. Porém fora da manta de rolagem, sendo a esteira inclinada para que se habituassem aos ruídos e movimentos de inclinação, sendo recompensados quando se apresentavam calmos e atentos. Ato contínuo, os cães foram posicionados na manta rolante sem inclinação e encorajados pelos membros da equipe para que se movessem numa velocidade fixa de 1,5m/s. Foram também habituados a inclinação a 7,5% enquanto caminhavam a 1,5 m/s (Cerqueira et al., 2018). Por fim, os cães foram apresentados ao colete (adaptado de Pelosi et al., 2013), contendo compartimentos para armazenamento de carga (chumbo de pesca) e utilizaram colete durante o exercício de adaptação com, no máximo, 2% de massa corpórea de carga, para que se habituassem ao colete com carga e ao movimento dos pesquisadores para colocar os pesos no compartimento de carga do colete. As

sessões diárias de adaptação duraram e 10 ± 5 min para cada cão, dependendo da resposta do cão.

3.4. Testes de Carga Incremental (TCI)

O TCI teve o objetivo de avaliar a aptidão aeróbia dos cães por meio do incremento de carga. Para isso utilizou-se chumbo de pesca, foi armazenado num colete adaptado, em cada etapa de esforço do TCI, que foi realizado sempre no período da manhã numa sala climatizada. Todos os cães tiveram acesso livre a água e não receberam refeições por pelo menos 1 h antes do exercício.

Os animais foram conduzidos a partir do canil à sala da esteira. Após cateterização (BD Angiocath®16 GA) da jugular esquerda, colocação do frequencímetro (Garmin Forerunner 310XT, GarminLtd, Olathe, Kansas, USA) e do colete, inicialmente sem os pesos, os animais permaneceram livres na sala de exercício por 15 min para adaptação ao ambiente (aclimatação). O TCI foi composto por 4 etapas contínuas de incremento de carga, sendo 0, 5, 10 e 15 % da massa corpórea (**Figura 1**). Entre cada etapa de esforço foi prescrito 3 min de descanso, momento no qual foram realizadas as coletas das amostras biológicas e oferecido água.

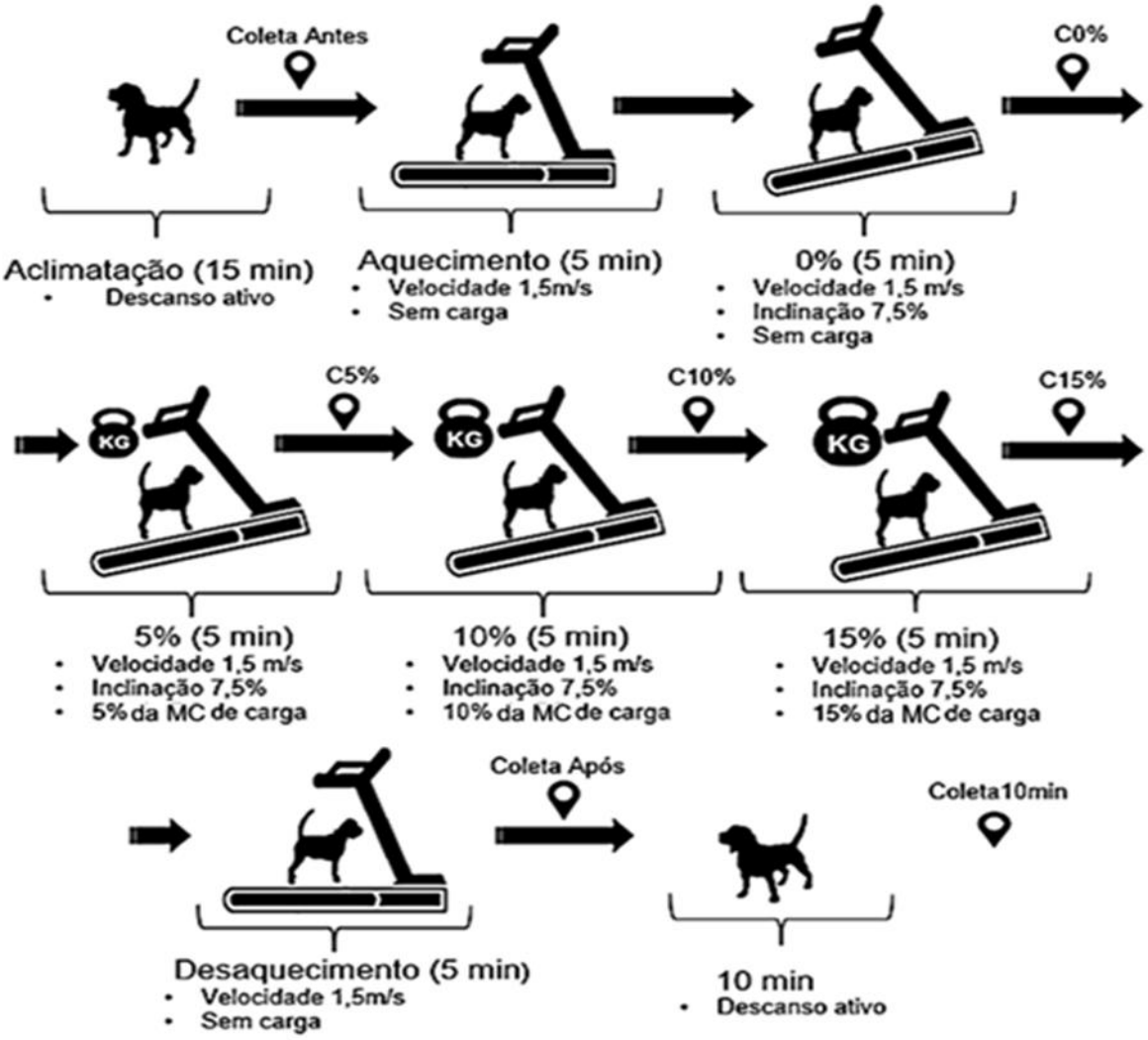


Figura 1: Etapas do Teste de Carga Incremental (TCI) com as coletas realizadas e especificações executadas em cada etapa. **Aclimatação**= etapa com o cão solto na sala de exercício em repouso ativo; **Coleta Antes**=coletas imediatamente antes do TC; **Aquecimento**= exercício em esteira sem inclinação e sem carga; **0%**= etapa com 0% de carga de massa corpórea (MC); **Coleta 0%**= coletas após etapa 0%; **5%**= etapa com 5% de carga; **Coleta 5%**= coletas após etapa 5%; **10%**= etapa com 10% de carga de MC; **Coleta 10%**= coletas após etapa 10%; **15%**=etapa com 15% de carga de MC; **Coleta 15%**= coletas após etapa 15%; **Desaquecimento**=exercício em esteira sem inclinação e sem carga; **Coleta Após**= coletas ao término do TCI; Coleta **10min**= coletas após 10 minutos do término do TCI com cão solto na sala de exercício em repouso ativo.

3.5. Momentos de Coleta

Os cães permaneceram 72h sem exercício voluntário 72h antes e após o TCI, ou seja, não foram levados ou soltos para outras atividades externas a suas baias para que não houvesse interferência nas variáveis fisiológicas. O repouso ocorreu em suas baias e todo o manejo que não incluísse exercício físico voluntário foi mantido normalmente.

Os momentos de coleta e as especificações dessas realizadas durante o TCI estão resumidas na **Tabela 1**. A coleta Aclimatação (Aclim) se refere a etapa de 15 minutos após a cateterização e antes do TCI, nos quais os cães permaneceram soltos na sala de exercício, ou seja, em descanso ativo; Antes se refere ao momento de coleta logo antes do início do TCI; Aquecimento (Aqueci) é a etapa de cinco minutos no qual o exercício se inicia sem carga e sem inclinação, apenas com velocidade de 1,5 m/s; as etapas de exercício de 0%, 5%, 10% e 15% são os cinco minutos de exercício realizado com a esteira inclinada e os respectivos incrementos de carga em relação ao peso corporal de cada cão de 0%, 5%, 10% e 15%. Os momentos de coleta de 0%, 5%,10% e 15% ocorreram logo após as respectivas etapas, ou seja, nos três minutos de repouso dos cães entre as etapas de exercício. O repouso ocorreu com os cães ainda na manta da esteira ergométrica e contidos por guias de segurança, com a supervisão dos pesquisadores. Desaquecimento (Desaq) se refere a etapa de exercício no qual a inclinação e as cargas foram retiradas e os cães caminharam por cinco minutos; Após é o momento de coleta logo após o Desaq e 10 min se refere aos 10 min que os cães permaneceram soltos na sala de exercício após o TCI.

Para obtenção da frequência cardíaca foram considerados os registros realizados pelo frenquêncímetro durante as etapas de Aclim, Aqueci, 0%, 5%, 10% 15%, Desaq e 10 min. Já as coletas de sangue para quantificação de lactato e glicose, bem como temperatura retal e imagens termográficas foram realizadas durante os intervalos entre as etapas de esforço supramencionadas.

As variáveis hemograma e proteína total, hemogasometria e teste de turgor cutâneo foram coletadas em Antes e 15%, com a finalidade de avaliar os cães antes do exercício e após a carga mais intensa, ainda antes da recuperação. Durante todo o TCI os cães foram filmados lateralmente e posteriormente os dois minutos finais de

cada etapa do TCI foram assistidos para avaliação do escore de percepção de esforço, portanto, essa avaliação ocorreu nas etapas de Aquecimento (Aque), 0%, 5%, 10%, 15% e Desaquecimento (Desaq). Os biomarcadores creatinina quinase e aspartato aminotransferase foram coletados nos momentos Antes e 1h, 3h, 6h, 24h, 48h e 72h após o TCI.

Tabela 1: Protocolo do Teste Incremental de Carga (TCI) com as etapas de exercício e momentos de coleta (Coletas), assim como o tempo coleta (Tempo) e especificações dessas antes, durante e após o teste de esforço incremental.

Coletas	Tempo (min)	Especificações
Aclimatação (Aclim)	15	Cão solto em sala para aclimatação e obtenção de FC
Coleta Antes (Antes)	3	Cão posicionado na esteira para coleta de Lac, Gli, CK, AST, TR, ITs, Hemo, Hgas e Turgor
Aquecimento (Aqueci)	5	Velocidade de 1,5m/s, sem inclinação e sem carga, com obtenção de FC e EE
Etapa 0%	5	Velocidade de 1,5m/s, com inclinação de 7,5% e sem carga, com obtenção de FC e EE
Coleta 0% (0%)	3	Coleta de amostras de sangue para Lac, Gli e obtenção de TR e ITs
Etapa 5%	5	Velocidade de 1,5m/s, inclinação de 7,5%, acréscimo de carga de 5% MC e obtenção de FC e EE
Coleta 5% (5%)	3	Coleta de amostras de sangue para Lac, Gli e obtenção de TR e ITs
Etapa 10%	5	Velocidade de 1,5m/s, inclinação de 7,5%, acréscimo de carga 10% MC e obtenção de FC e EE
Coleta 10% (10%)	3	Coleta de amostras de sangue para Lac, Gli e obtenção de TR e ITs
Etapa 15%	5	Velocidade de 1,5m/s, inclinação de 7,5%, acréscimo de carga 15% MC e obtenção de FC e EE
Coleta 15% (15%)	3	Coleta de amostras de sangue para Lac, Gli, TR, ITs, Hemo, Hgas e Turgor
Desaquecimento (Desaq)	5	Velocidade de 1,5m/s, sem inclinação e sem carga e obtenção de FC e EE
Coleta após (Após)	3	Coleta de amostras de sangue para Lac, Gli e obtenção de TR e ITs
Etapa 10 min	10	Cão solto em sala e obtenção de FC
Coleta 10 min após (10min)	3	Coleta de amostras de sangue para Lac, Gli e obtenção de TR e ITs

FC = frequência cardíaca; Lac = lactato; Gli = glicose; CK = creatina quinase; AST = aspartato aminotransferase; TR = temperatura retal; IT = imagem termográfica; Hemo = hemograma e proteína total; Hgas = hemogasometria; EE = escore de percepção do esforço e Turgor = teste de turgor cutâneo.

3.6. Mensurações fisiológicas e comportamentais

Imediatamente antes do início do TCI, os cães foram cateterizados na sala da esteira. O local de cateterização foi tricotomizado, higienizado e utilizado anestésico tópico (cloridrato de lidocaína 20 mg/g) antes da cateterização. O cateter (BD Angiocath®16 GA) foi fixado no terço médio da veia jugular esquerda (sangue venoso), acoplado a um extensor de 20 cm. Os cães permaneceram com o cateter por, no máximo, 6 h após o fim o TCI, com a finalidade de evitar lesões. Na sala de exercício os cães foram observados todo o período pelos pesquisadores e permaneceram sem o colar elizabetano. Já após o TCI, ao voltarem para o canil, os cães usaram colar elizabetano e ficaram em gaiolas individuais até a coleta de 6h após o TCI. As coletas basais e após 6h do TCI (momentos de coleta 24h, 48h e 72h) foram realizadas por meio da venopunção jugular com agulhas 0,8 x 0,25 mm.

3.6.1. Lactato (Lac) e Glicose (Gli)

As amostras de sangue (0,5 mL) foram coletadas através de cateter (BD Angiocath®16 GA) e acondicionadas em minitubos previamente identificados contendo EDTA e fluoreto de sódio para interrupção do metabolismo glicolítico das hemácias e leucócitos, sendo mantidos sob refrigeração (4 °C). Em seguida as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1470g em centrifuga refrigerada a 4°C e o soro foi armazenado em freezer -80ºC. As concentrações de Lac foram determinadas por meio do método eletroenzimático com bioanalisador automático (YSI 2300 Stat Plus®, Ohio - USA).

3.6.2. Temperatura retal (TR)

A temperatura retal foi obtida por meio de termômetro clínico digital flexível (Omron Health Care MC-343F) inserindo aproximadamente 2 cm no reto e encostando na mucosa retal.

3.6.3. *Frequência Cardíaca (FC*)

A FC foi obtida por meio de frequencímetro (Garmin Forerunner 310XT, Garmin Ltd, Olathe, Kansas, USA) que registra dados de FC a cada um segundo durante o exercício. Para facilitar tal medição, os cães tiveram o transmissor do frequencímetro fixado na caixa torácica com uma cinta cardíaca ajustável de uso humano (Garmin HRM, Garmin Ltd, Olathe, Kansas, USA) e por meio de ataduras de crepom tipo *cysne* (8cm x 1,8m) antes do início do TCI (adaptado de Cerqueira et al., 2018). A média da FC foi obtida de cada etapa de exercício (Aclimatação, Aquecimento, Etapa 0%, Etapa 5%, Etapa 10%, Etapa 15%, Desaquecimento e 10 min) no programa Garmin Connect®.

3.6.4. *Termografia infravermelha superficial (IT)*

As ITs foram realizadas em sala climatizada a 22 ± 1,5ºC e umidade relativa de 55±3,4%. A sala recebia entrada de luz natural por janelas posicionadas em duas paredes, próxima ao teto. No entanto, não houve incidência direta de luz nos locais onde os cães permaneceram. A dimensão da sala foi de 10x10x5 m e comportou no máximo 5 pessoas durante a termografia. Utilizou-se câmera termográfica digital de modelo i50 (Flir® Systems, Wilsonville, Oregon, Estados Unidos), com valor de sensibilidade menor que 0,1ºC e emissividade de 0,98, variação de temperatura de -20 a 350ºC e resolução de 140 x 140 pixels. A tricotomia foi realizada 15 minutos antes da primeira IT, esse tempo foi utilizado para que o aquecimento causado pela máquina de tricotomia não interferisse na avaliação. Cada IT foi composta por: uma imagem lateral da região do membro pélvico do cão, a 1 m de distância da região do músculo *bíceps femoris* (Santos et al., 2019); a 0,6 m acima da região de quadril para obtenção das imagens do *longissimus dorsi* (adaptado de Rizzo et. al., 2017); imagem da carúncula lacrimal direita, a 0,3 m de distância dos olhos (adaptado de Rizzo et. al., 2017) e do coxim metatársico, a 0,3 m de distância. As ITs foram realizadas num ângulo de 90° em relação a área de interesse do corpo dos cães. Os dados foram processados em programa específico (FLIR Tools®) e foi utilizado mensuração pontual de 1 pixel (spot) na região de *bíceps femoris* (BF- **Figura 2A**), de carúncula

lacrimal (CL- **Figura 2B**) e do coxim metatársico (CM- **Figura 2C**) e dois spots na região de *longissimus dorsi* (LD- **Figura 2D**) paralelos a coluna vertebral. A temperatura e umidade relativa do ambiente foram obtidos por meio de um termohigrômetro digital (HT-270 – Instrutherm - Itest Medição e Automação Ltda) e utilizados para ajuste do termograma no FLIR Tools®. Todas as ITs foram realizadas e avaliadas pelo mesmo pesquisador.

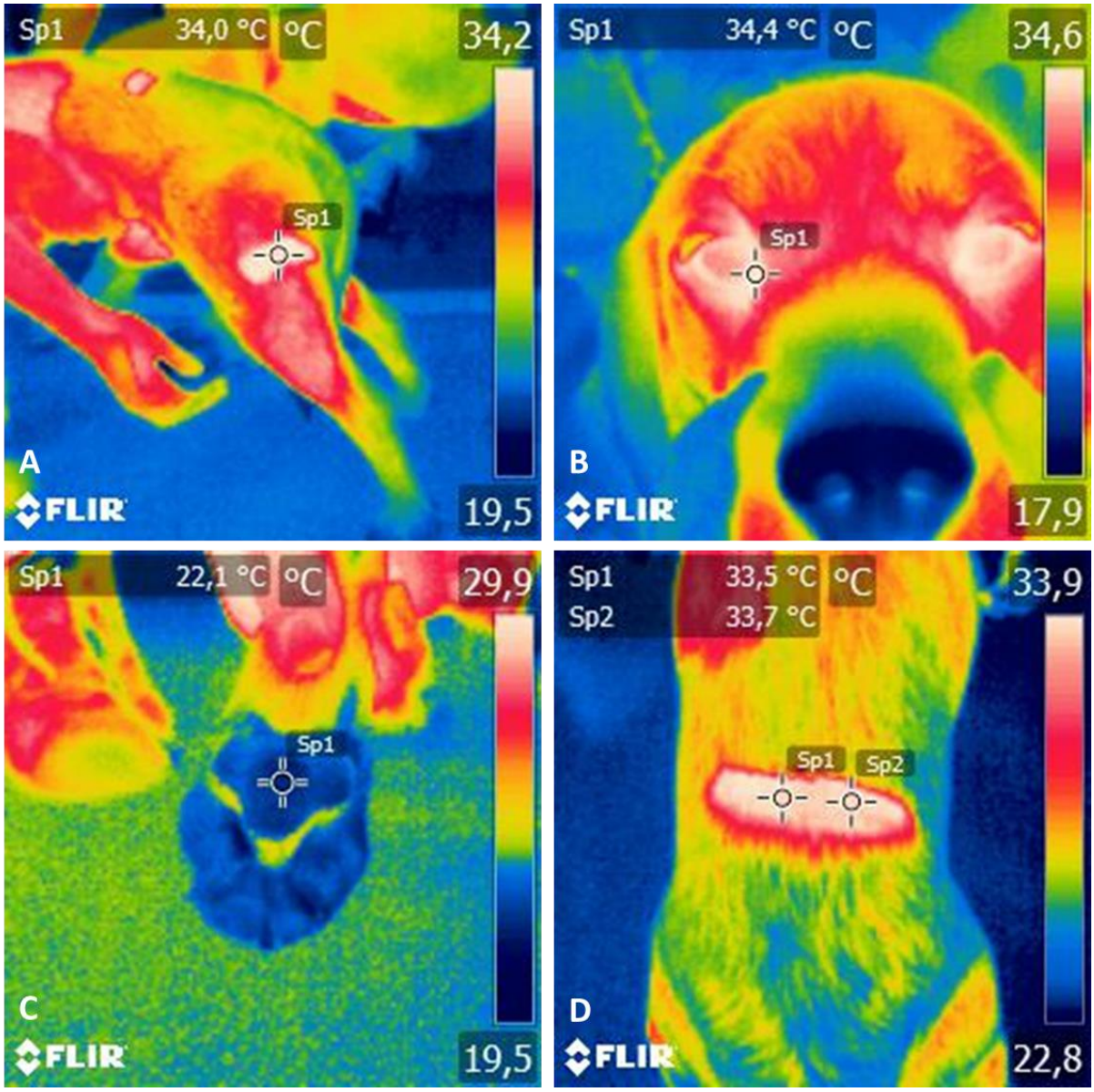


Figura 2: Regiões das termografias realizadas e locais do spot para mensuração da temperatura superficial. A – *Bíceps femoris* (BF); B – Carúncula lacrimal (CL); C – Coxim metatársico (CM) e D – *Longissimus dorsi* (D).

3.6.5. Escore de Percepção de Esforço (EE)

O TCI de todos os cães foi registrado por câmera de vídeo (Canon XA10, Canon Inc., Tokyo, Japão), sendo posicionada a 1,5 m lateralmente a esteira, onde o cão realizou o exercício. Utilizou-se dois minutos finais de cada etapa do TCI (Aqueci, 0%, 5%, 10%, 15% e Desaq) para a avaliação e determinação do escore de percepção de esforço dos cães (Swanson et al., 2019).

3.6.6. Hemograma completo (Hemo) e Proteína total (PT)

A coleta para hemograma completo e PT foi realizada por meio da venopunção jugular ou cateter fixado no terço médio da veia jugular direita (acoplado a um extensor de 20 cm) com seringas de 3 mL e agulhas 0,8 x 0,25 mm nas coletas Antes e logo após a carga máxima (15%). O sangue foi armazenado em tubos com EDTA previamente indentificados e mantidos refrigerados a -4ºC até a centrifugação e dosagem. As dosagens do Hemo foram realizadas no contador automático de células BC 2800vet (Mindray®) e a PT foi realizada no bioquímico semiautomático Labquest (Bioplus, São Paulo, Brasil).

3.6.7. Turgor cutâneo (Turgor)

O turgor foi realizado por meio do teste de turgor cutâneo. Este foi avaliado utilizando adaptação de Goucher et al. (2019) usando-se o polegar e o dedo indicador para elevar uma dobra da pele paralela à crista sagital do osso parietal até uma altura de aproximadamente 2 cm por aproximadamente 8 segundos. O teste de turgor foi filmado para avaliação mais precisa do tempo necessário até que a pele retornasse ao contorno anatomicamente normal da cabeça do cão. O mesmo avaliador foi responsável por todos os testes de desidratação, antes e após o TCI.

3.6.8. Hemogasometria venosa (Hgas)

A coleta de sangue para as medidas de pvO_2, $pvCO_2$ e pH foi realizada através do cateter na jugular acoplado a um extensor de 20 cm em seringas de 3,0 mL para

análises hemogasométricas (BD LuerLock) nos momentos Antes e 15%. Imediatamente após obtenção das amostras essas foram processadas em hemogasômetro (OPTI CCA-TS, Opti CCA-TS, Opti Medical systems, GA, USA) utilizando-se cassetes Ca^{+2} (OPTI Cassette E-Ca, Opti Medical systems, GA, USA).

3.6.9. Creatina quinase (CK) e Aspartato aminotransferase (AST)

Para a análise desses biomarcadores musculares foram coletados 3 mL de sangue venoso por cateter fixado no terço médio da veia jugular esquerda, acoplado a um extensor de 20 cm (momentos de coleta antes, 1h, 3h e 6h após o TCI) e venopunção jugular (momentos de coleta 24h, 48h e 72h) com agulhas 0,8 x 0,25 mm. Ato contínuo foram distribuídos em tubos previamente identificados, sem anticoagulante, para obtenção de soro. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1470 g em centrifuga refrigerada a 4°C e, em seguida, congeladas a -80˚C. Quantificações dos biomarcadores foram realizadas por meio de processo cinético em analisador semiautomático (LABQUEST BIO 2000®, São Paulo - Brasil), utilizando-se kits comerciais para determinação da atividade enzimática das enzimas CK (CK-NAC Liquiform - Labtest) e AST (AST/GOT Liquiform - Labtest).

3.7. Delineamento e análise estatística dos dados

O experimento seguiu o esquema de parcelas subdivididas com os tratamentos principais sendo as duas faixas etárias A e I e nas subparcelas os momentos de coleta para cada variável. Para análise, os dados obtidos dos biomarcadores CK e AST foram submetidos a transformação logarítmica ($\log_e(x)+1$) para ajuste em distribuição normal das avaliações intragrupo.

As avaliações intergrupo foram realizadas quanto as médias (paramétricos) e medianas (não-paramétrico) gerais, área sob a curva e pico médio. Para média e mediana geral foram usados todos os dados de cada grupo e comparados; a área sob a curva foi calculada pelo método dos trapézios no GraphPad 8.0.1 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA) e para as avaliações do pico médio e momentos pico, foram encontrados os valores por meio da equação da curva de tendência

quadrática ($y=ax^2+bx+c$), sendo o pico médio encontrado pelo y ($y=-b/2a$) da equação de vértice da parábola e os momentos de pico pelo x ($x=-\Delta/4a$). Para Gli os valores de pico foram considerados o vértive mínimo. As comparações para dados paramétricos foram realizadas pelo teste t de Student para amostras não pareadas e para os dados não paramétricos foi usado Teste U de Mann-Whitney.

As avaliações intragrupo foram realizadas entre as médias de cada momento de coleta. Os dados foram avaliados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk e homocedasticidade usando teste de Levene, foi então realizada ANOVA One-Way de Medidas Repetidas, seguido do Teste Tukey ($p<0,05$). Para os dados não paramétricos foi utilizado teste de Friedman do ANOVA. Todas as análises estatísticas foram realizadas no sofware Sigma Plot 12.0. Valores de $P< 0,05$ foram considerados significativos.

4. RESULTADOS

Todos os cães utilizados finalizaram o TCI sem exaustão e se apresentaram ativos mesmo logo após o teste, não ocorrendo fadiga ou qualquer manifestação clínica de dor como claudicação ou apatia. Comparando as medianas gerais de A e I (**Tabela 2**), para Lac, o grupo I apresentou maior ($p<0,001$) concentração que A ao longo dos momentos de coleta, sendo esses momentos 0% ($p<0,001$), 5% ($p<0,001$),10% ($p<0,001$), 15% ($p<0,001$), Após ($p=0,001$) e 10 min ($p=0,003$). Apenas em Lac se obteve diferença na área sobre a curva ($p<0,001$) (**Figura 3A**) e de pico médio ($p=0,001$), sendo que o grupo I foi maior que A. Não houve diferenças intergrupo para as variáveis Gli, TR e FC nas comparações gerais ($p=0,53$, $p=0,17$ e $p=0,26$, respectivamente), de área sob a curva ($p=0,44$, $p=0,45$ e $p=0,10$, respectivamente) (**Figura 3B, 3C e 3D**) e de pico médio ($p=0,066$, $p=0,570$ e $p=0,246$, respectivamente).

Os momentos de pico pela curva de tendência (**Tabela 2**) para Lac (**Figura 4A**) e FC (**Figura 4D**) foram os mesmos comparando grupos A e I (entre 10% e 15% e entre 5% e 10%, respectivamente). Para TR (**Figura 4C**), o pico na curva de tendência ocorreu posteriormente em I (entre 10% e 15%) em relação a A (10%) e para Gli

(**Figura 4B**) o momento de pico de I (entre Antes e 0%) ocorreu anteriormente a A (entre 0% e 5%).

Tabela 2: Mediana geral e da área sob a curva (mediana da área) com a amplitude (max-min), média geral e média da área sob a curva (Média da Área) com desvio padrão e média do pico com desvio padrão e momento de coleta de pico, calculados por meio da curva de tendência de lactato e glicose séricos, temperatura retal, frequência cardíaca e biomarcadores musculares creatina quinase (CK) e spartato aminotransferase (AST) de cães Adultos (A) e Idosos (I) que realizaram teste de carga incremental.

	Grupo	Mediana Geral (min-max)	Média Geral (±dp)	Área Sob a Curva (min-max)	Área Sob a Curva (±dp)	Mediana do Pico* (min – máx)	Média do Pico* (±dp)	Momento do Pico*
Lactato (mM)	A	0,87 (0,5-1,4)	0,89±0,2	5,3 (3,9 - 7,3)	5,44±1,12	0,97 (0,7-1,5)	1±0,25	10% - 15%
	I	1,53 (0,8-3,2)	1,62±0,55	9,2 (6,9 -15,8)	9,98±3,04	1,78 (1,2-2,9)	1,9±0,59	10% - 15%
Glicose (mM)	A	5,74 (5,0-7,7)	5,89±0,5	34,9 (33-37)	35,2±1,6	5,7 (5,3-6)	5,68±0,3	0% - 5%
	I	6,01 (3,9-7,4)	5,97±0,53	35,5 (34-38)	35,8±1,5	5,2 (4,9-5,7)	5,49±0,4	Antes -0%
Temperatura Retal (ºC)	A	38,7 (38-39,5)	38,7±0,2	232 (232-234)	232±0,6	38,8 (38,5-39)	38,8±0,1	10%
	I	38,6 (38-39,2)	38,6±0,3	232 (229-234)	232±1,6	38,8 (38,4-39)	38,8±0,2	10%-15%
Frequência Cardíaca (bpm)	A	160,1 (100-191)	156±23	972 (971-1089)	965±88	170 (136-189)	169±17	5%-10%
	I	160,4 (93-237)	161±28	1029 (933-1141)	1033±71	182 (152-219)	181±22	5%-10%
CK (UI/L)	A	294 (59-3029)	568±605	3736 (941-8044)	3769±2907	261 (65-632)	303±244	6h-24h
	I	161 (59-529)	183±98	1176 (735-16)	1169±289	75 (53-101)	78±17	3h-6h
AST (UI/L)	A	34 (16-167)	41±23	236 (395-147)	251±104	46 (26-73)	47±18	6h
	I	26 (10-47)	27±7,5	152 (225-118)	165±33	31 (26-42)	31±6	3h

*Não foi possível obter os valores de mediana, média e momento de pico para 1 A e 1 I para lactato e AST; 2 A e 3 I para glicose; 1 I para temperatura retal e frequência cardíaca e 2 A e 2 I para CK.

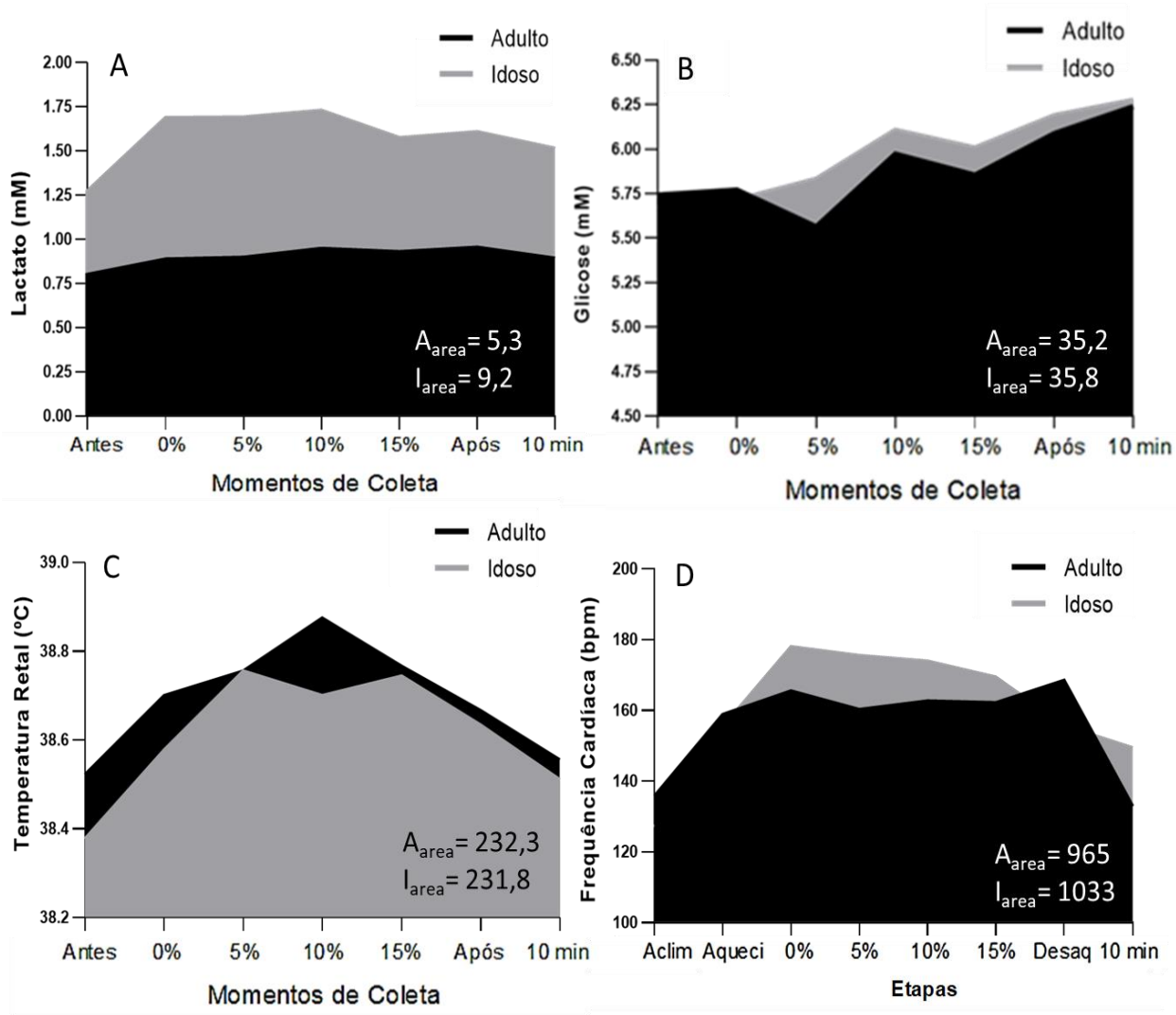


Figura 3: Área sob a curva da concentração de lactato (A) e glicose (B), da temperatura retal (C) e frequência cardíaca (D) ao longo do Teste de Carga Incremental (TCI) dos cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos). A_{area} = tamanho da área sob a curva do grupo Adulto. I_{area} = tamanho da área sob a curva do grupo Idoso. Aclim= coleta de frequência cardíaca (FC) ao longo de 15 min. de espera com o cão livre na sala de exercício para aclimatação; Aque= coleta de FC durante a etapa de aquecimento na esteira, sem inclinação e sem carga; Antes = coleta na esteira de exercício, logo antes do início do TCI; 0% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e sem carga; 5% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e 5% da massa corpórea de carga; 10% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e 10% da massa corpórea de carga; 15% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e 15% da massa corpórea de carga; Desaq= coleta de FC durante a etapa de aquecimento na esteira, sem inclinação e sem carga; Após = coleta após o desaquecimento na esteira, sem inclinação e sem carga; 10 min = coleta referente a etapa de 10 min. de descanso ativo dos cães, no qual permaneceram livres dentro da sala de exercício.

23

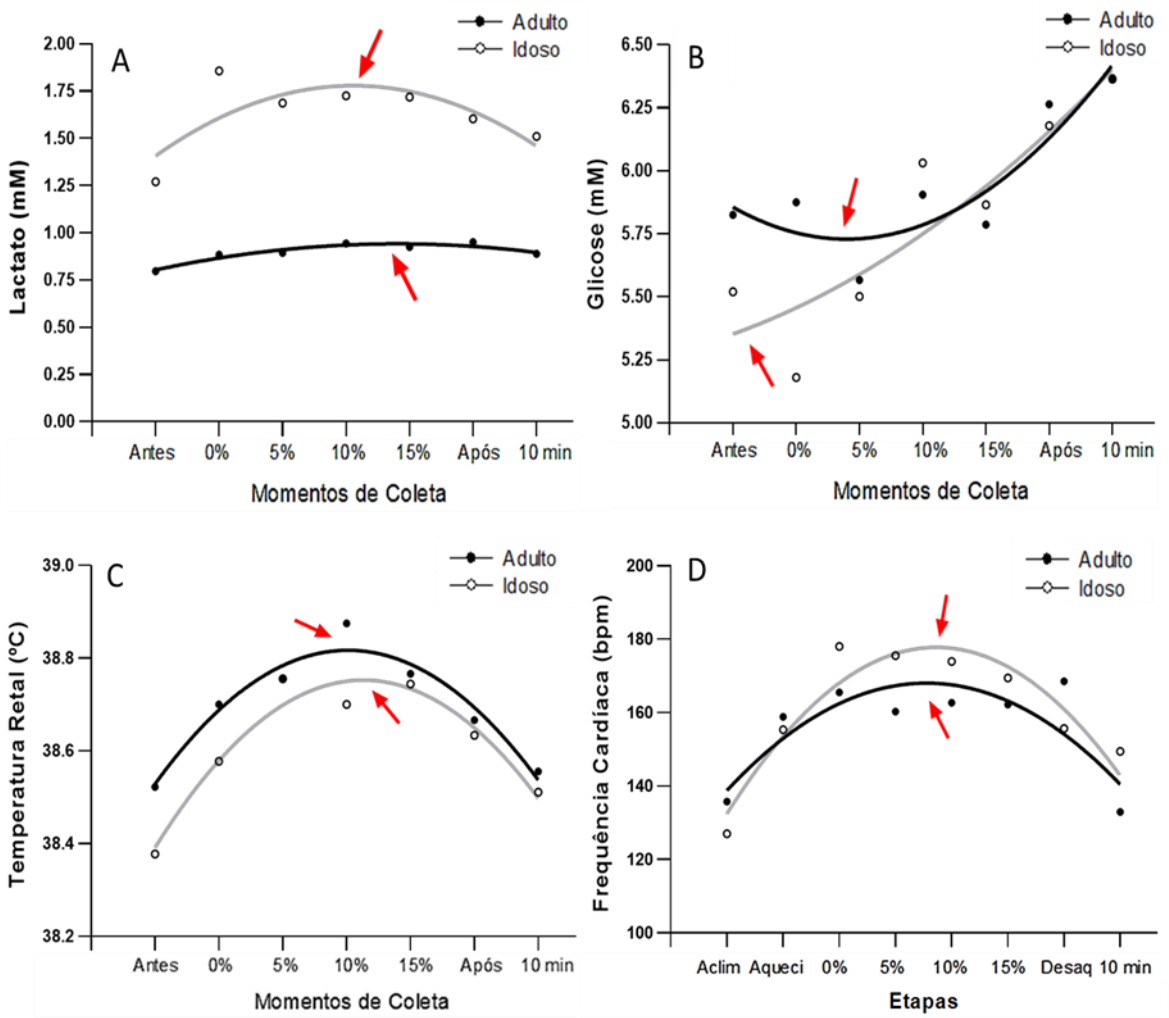


Figura 4: Linha de tendência quadrática da oncentração de lactato (A) e glicose (B), da temperatura retal (C) e frequência cardíaca (D) ao longo do Teste de Carga Incremental (TCI) dos cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos). Setas vermelhas indicam o pico das respectivas curvas de tendência de Adulto e Idoso para cada variável. Aclim= coleta de frequência cardíaca (FC) ao longo de 15 min. de espera com o cão livre na sala de exercício para aclimatação; Aque= coleta de FC durante a etapa de aquecimento na esteira, sem inclinação e sem carga; Antes = coleta na esteira de exercício, logo antes do início do TCI; 0% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e sem carga; 5% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e 5% da massa corpórea de carga; 10% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e 10% da massa corpórea de carga; 15% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e 15% da massa corpórea de carga; Desaq= coleta de FC durante a etapa de aquecimento na esteira, sem inclinação e sem carga; Após = coleta após o desaquecimento na esteira, sem inclinação e sem carga; 10 min = coleta referente a etapa de 10 min. de descanso ativo dos cães, no qual permaneceram livres dentro da sala de exercício.

Quanto a análise das ITs **(Figura 5 e Tabela 2)**, apenas LD apresentou diferença intergrupo. Nesse, A apresentou maiores valores que I em média geral ($p<0,001$) e mediana da área sob a curva ($p=0,01$), para média de pico houve tendência de A ser maior que I ($p=0,055$). As diferenças intergrupo de LD, ocorreram nos momentos Antes ($p=0,044$), 0% ($p=0,023$), 5% ($p=0,003$) e 10% ($p=0,017$). Para as outras regiões avaliadas nas IT (BF, CL, CM) não houve diferença intergrupo.

Os momentos de pico encontrados pela curva de tendência (**Figura 6**), tanto para BF quanto para LD, foram de intensidade menor para A comparado a I (BF, entre 5% a 10% para A e entre 10% a 15% para I; LD, em 10% para A e entre 15% e Após para I). Já para CL, foram de maior intensidade para A (entre 15% e Após) em relação a I (entre 10% e 15%) e para CM, tanto A quanto I apresentaram os picos na mesma intensidade (entre 10% e 15%).

Os valores transformados de CK e AST podem ser visualizados na Tabela 3 e 5. Para CK ($p<0,001$) e AST ($p<0,001$), o grupo A apresentou maior atividade enzimática que I após o TCI. Não houve diferença na área sob a curva (**Figura 7A e 7B**) e pico médio de CK ($p=0,102$ e $p=0,165$, respectivamente) e AST ($p=0,06$ e $p=0,09$, respectivamente). Os momentos de pico pela curva de tendência para CK (**Figura 7C**), o pico ocorreu posteriormente em I (entre 6h e 24h) em relação a A (entre 3h e 6h) e para AST (**Figura 7D**) o momento de pico de I (3h) ocorreu anteriormente a A (6h).

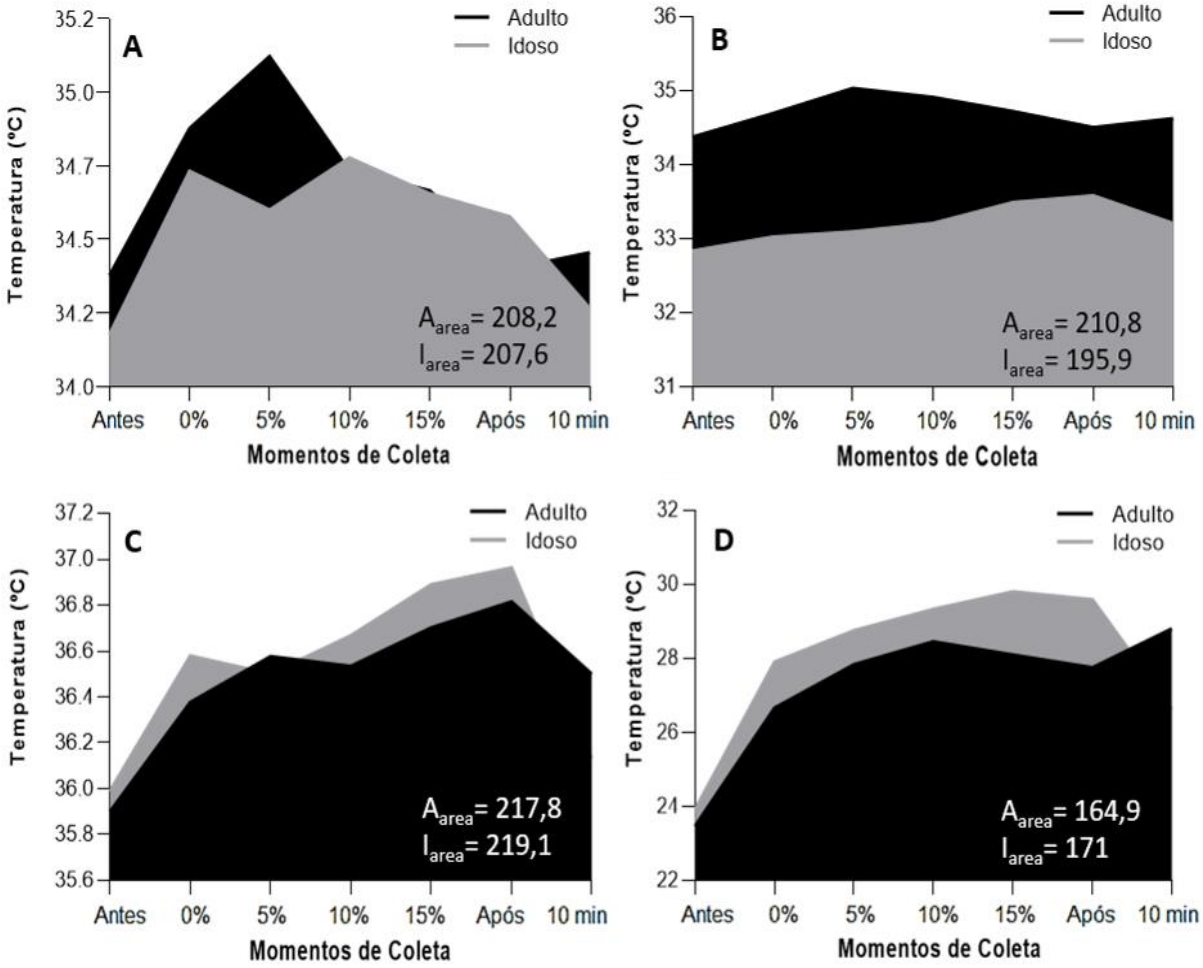


Figura 5: Área sob a curva da temperatura superficial da região de *bíceps femoris* (A), temperatura superficial da região de *longissimus dorsi* (B), temperatura superficial de carúncula lacrimal (C) e temperatura superficial do coxim metatársico (D) ao longo do Teste de Carga Incremental (TCI) de cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos). Antes=coletas imediatamente antes do TCI; 0%= coletas após etapa 0%; 5%= coletas após etapa 5%; 10%= coletas após etapa 10%; 15%= coletas após etapa 15%; Após= coletas ao término do TCI;10min= coletas após 10 minutos do término do TCI com cão solto na sala de exercício em repouso ativo; A_{area} = tamanho da área sob a curva do grupo Adulto; I_{area} = tamanho da área sob a curva do grupo Idoso

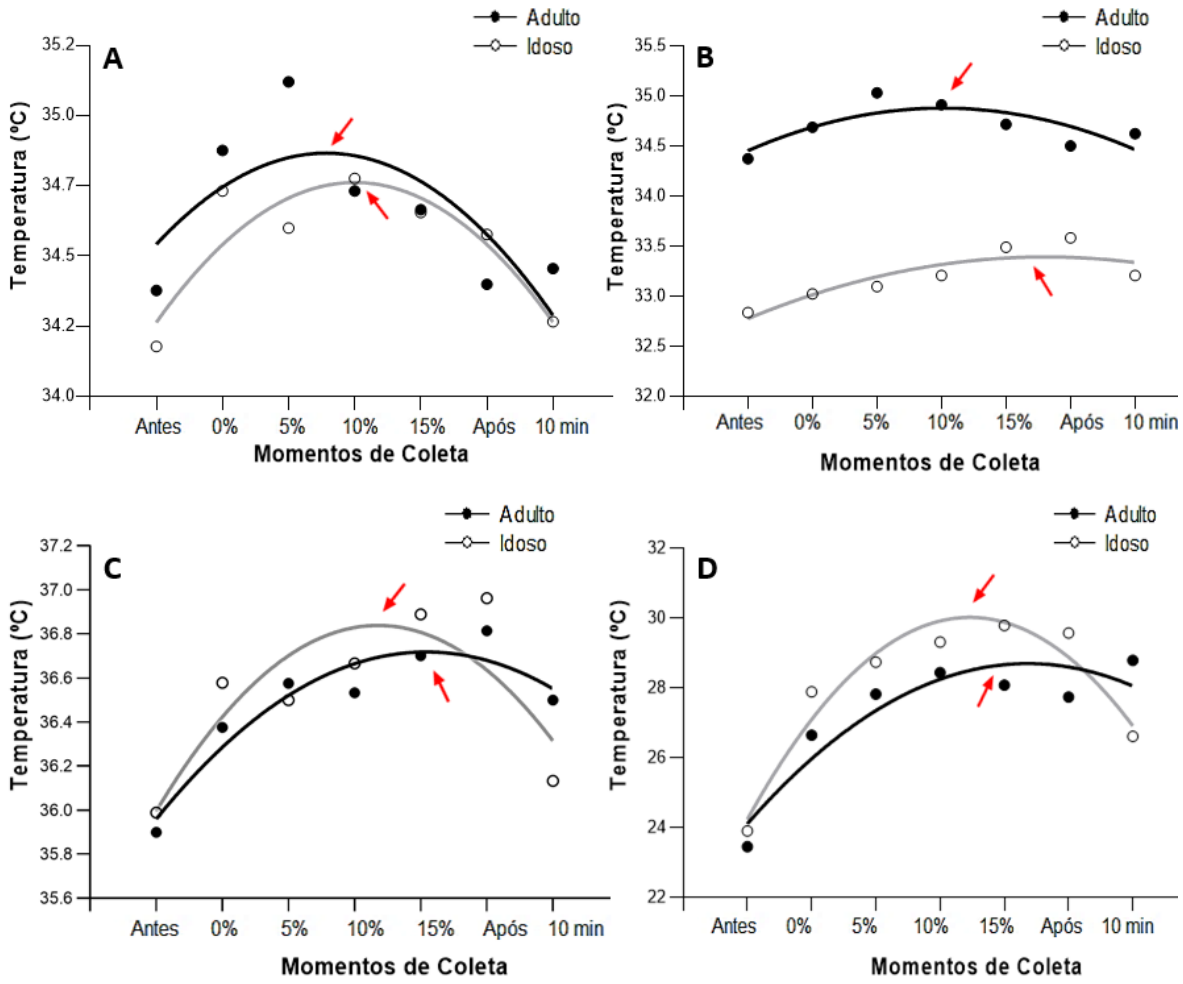


Figura 6: Curva de tendência quadrática da temperatura superficial da região de bíceps femoris (A), temperatura superficial da região de longissimus dorsi (B), temperatura superficial de carúncula lacrimal (C) e temperatura superficial do coxim metatársico (D) ao longo do Teste de Carga Incremental (TCI) de cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos). Antes=coletas imediatamente antes do TCI; 0%= coletas após etapa 0%; 5%= coletas após etapa 5%; 10%= coletas após etapa 10%; 15%= coletas após etapa 15%; Após= coletas ao término do TCI;10min= coletas após 10 minutos do término do TCI com cão solto na sala de exercício em repouso ativo; Aarea = tamanho da área sob a curva do grupo Adulto; Iarea = tamanho da área sob a curva do grupo. Setas vermelhas indicam para o pico das respectivas curvas de tendência de Adulto e Idoso para cada variável.

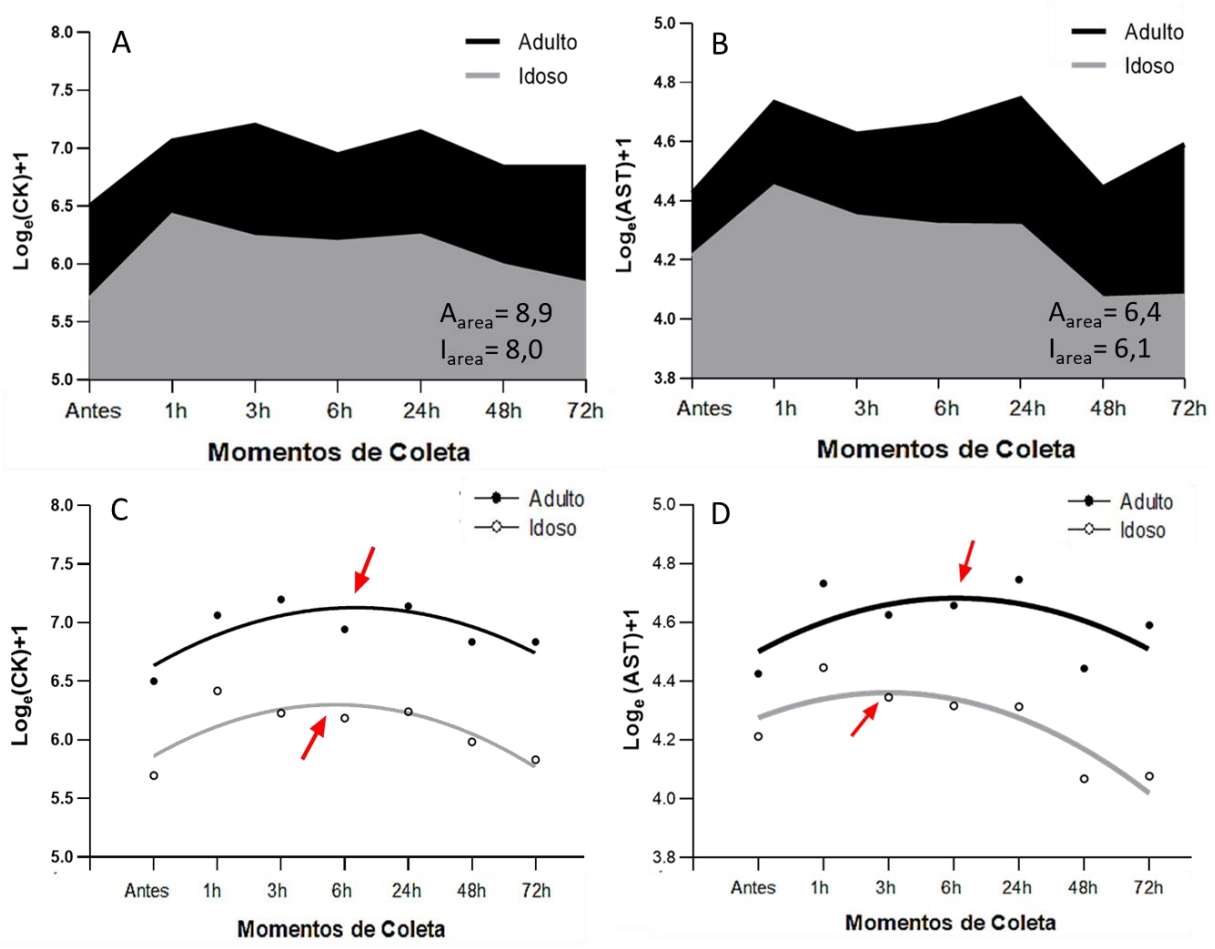


Figura 7: Área sob a curva (A e B) e linha de tendência quadrática (C e D) da atividade das enzimas creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) ao longo do Teste de Carga Incremental (TCI) dos cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos). A_{area} = tamanho da área sob a curva do grupo Adulto; I_{area} = tamanho da área sob a curva do grupo Idoso. Setas vermelhas indicam o pico das respectivas curvas de tendência de Adulto e Idoso para cada variável. Antes = coleta na esteira de exercício, logo antes do início do TCI; 0% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e sem carga; 1h, 3h, 6h, 24h, 48h e 72h indicam os momentos de coleta após o TCI.

Quanto as avaliações intragrupo (**Tabela 3**), para Lac (**Figura 8A**), o grupo A apresentou tendência de diferenciação da concentração ao longo dos momentos de coleta (p=0,051), sendo que 10% e Após obtiveram as maiores médias e Antes, a menor. O grupo I obteve Antes menor que todos os outros momentos (sendo 0%, 5%, 10% e 15% com p<0,001; Após com p=0,001 e 10 min com p=0,041). Para as concentrações de Gli (**Figura 8B**), em A, 5% foi menor (p=0,031) que 10min e em I, Antes foi menor (p=0,044) que Após.

Na TR (**Figura 8C**), para A, se obteve 5%, 10% e 15% com temperaturas maiores que Antes (p= 0,016, p=0,032 e p=0,005, respectivamente) e 10 min (p=0,01, p=0,021 e p=0,009). Já para I, os momentos 5% e 15% foram maiores que Antes (p<0,001 e p=0,034, respectivamente) e 10 min (p<0,001 e p=0,050, respectivamente) e os momentos 10% e Após foram maiores apenas que Antes (p=0,002 e p=0,023, respectivamente).

As comparações intragrupo de FC (**Figura 8D**) resultou, para A, os momentos Aquec, 0%, 5%, 10%, 15% e Desaq maiores que Aclim (p=0,009, p=0,03, p=0,017, p=0,006, p=0,007 e p<0,001, respectivamente) e 10min (p= 0,009, p<0,001, p=0,005, p=0,002, p=0,002 e p<0,001, respectivamente). Na mesma comparação, para I, os momentos 0%, 5% e 10% tiveram maiores temperaturas que Aclim (p<0,001 para os 3 momentos) e 10 min (p=0,09, p=0,021 e p=0,034, respectivamente) e os momentos 15%, Desaq e Aque apenas maiores que Aclim (p<0,001, p=0,033 e p=0,036, respectivamente).

Para biomarcadores musculares CK e AST (**Tabela 4**), não houve diferença (p>0,05) intragrupo para o grupo A em CK (**Figura 9A**), já para I, o momento 1h foi maior que Antes (p=0,044). Para AST (**Figura 9B**) o grupo A também não apresentou diferença (p=0,112) e o grupo I obteve 1h maior que 48h (p=0,003) e 72h (p=0,004).

Tabela 3: Média e desvio padrão das variáveis fisiológicas de 18 cães Beagles distribuídos nos grupos Adulto (A, n=9) e Idoso (I, n=9) ao longo dos momentos de coleta do Teste de Carga Incremental (TCI).

	Grupo	Aclim	Antes	Aqueci	0%	5%	10%	15%	Desaq	Após	10 min
Lactato (mM)	A	-	$0,8\pm0,3^{A}$	-	$0,9\pm0,2^{A}$	$0,9\pm0,2^{A}$	$0,9\pm0,2^{A}$	$0,9\pm0,1^{A}$	-	$0,9\pm0,2^{A}$	$0,9\pm0,2^{A}$
	I	-	$1,3\pm0,4^{Ab}$	-	$1,7\pm0,6^{Ba}$	$1,7\pm0,5^{Ba}$	$1,7\pm0,5^{Ba}$	$1,6\pm0,4^{Ba}$	-	$1,6\pm0,4^{Ba}$	$1,5\pm0,5^{Ba}$
Glicose (mM)	A	-	$5,7\pm0,4^{ab}$	-	$5,8\pm0,3^{ab}$	$5,6\pm0,3^{b}$	$6\pm0,4^{ab}$	$5,8\pm0,5^{ab}$	-	$6,1\pm0,5^{ab}$	$6,2\pm0,8^{a}$
	I	-	$5,7\pm0,3^{b}$	-	$5,8\pm0,5^{ab}$	$5,8\pm0,4^{ab}$	$6,1\pm0,2^{ab}$	$6\pm0,6^{ab}$	-	$6,2\pm0,3^{a}$	$6,1\pm0,3^{ab}$
Temperatura Retal (ºC)	A	-	$38,5\pm0,2^{b}$	-	$38,7\pm0,2^{ab}$	$38,8\pm0,1^{a}$	$38,9\pm0,3^{a}$	$38,8\pm0,2^{a}$	-	$38,7\pm0,1^{ab}$	$38,6\pm0,2^{b}$
	I	-	$38,4\pm0,2^{c}$	-	$38,58\pm0,3^{abc}$	$38,8\pm0,3^{a}$	$38,7\pm0,3^{ab}$	$38,7\pm0,3^{a}$	-	$38,6\pm0,3^{ab}$	$38,5\pm0,2^{bc}$
Frequência Cardíaca (bpm)	A	136 ± 17^{b}	-	159 ± 28^{a}	166 ± 24^{a}	160 ± 20^{a}	163 ± 17^{a}	162 ± 16^{a}	169 ± 11^{a}	-	133 ± 22^{b}
	I	127 ± 20^{c}	-	155 ± 26^{bc}	178 ± 30^{a}	176 ± 27^{a}	174 ± 24^{a}	169 ± 19^{ab}	156 ± 24^{ab}	-	149 ± 21^{bc}

Letras maiúsculas correspondem a diferenças intergrupo e minúsculas correspondem a diferenças intragrupo, de acordo com o teste de Tukey (P≤,05). Os horários de pico estão em negrito. A transformação logarítmica (loge (x) +1) foi usada para análise estatística nas variáveis CK e AST. Aclim= coleta ao longo de 15 min. com o cão livre na sala de exercício; Aqueci= coleta durante a etapa de aquecimento na esteira, sem inclinação e sem carga; Antes = coleta na esteira, logo antes do início do TCI; 0% = coleta da etapa de exercício com inclinação e sem carga; 5% = coleta da etapa de exercício com inclinação e 5% da massa corpórea de carga; 10% = coleta da etapa de exercício com inclinação e 10% da massa corpórea de carga; 15% = coleta da etapa de exercício com inclinação e 15% da massa corpórea de carga; Desaq= coleta durante a etapa de aquecimento na esteira, sem inclinação e sem carga; Após = coleta após o desaquecimento na esteira, sem inclinação e sem carga; 10 min = coleta após 10 min. de descanso ativo dos cães, no qual permaneceram livres dentro da sala de exercício; 1h, 3h, 6h, 24h, 48h e 72h indicam o tempo de coleta após o TCI.

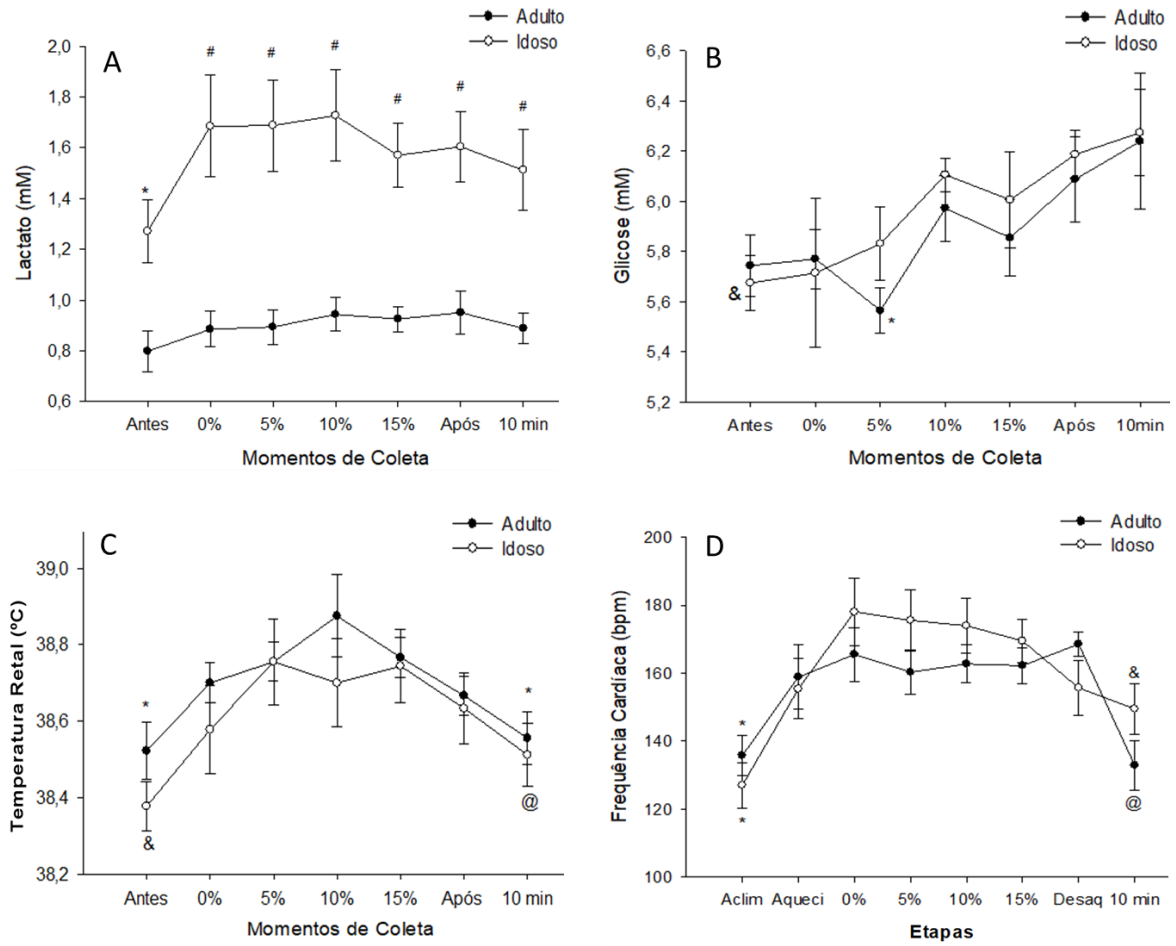


Figura 8: Relação entre a concentração de lactato (A) e glicose (B), de temperatura retal (C) e frequência cardíaca (D) durante o Teste de Carga Incremental (TCI) dos cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos). Aclim= coleta de frequência cardíaca (FC) ao longo de 15 min. de espera com o cão livre na sala de exercício para aclimatação; Aque= coleta de FC durante a etapa de aquecimento na esteira, sem inclinação e sem carga; Antes = coleta na esteira de exercício, logo antes do início do TCI; 0% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e sem carga; 5% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e 5% da massa corpórea de carga; 10% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e 10% da massa corpórea de carga; 15% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e 15% da massa corpórea de carga; Desaq= coleta de FC durante a etapa de aquecimento na esteira, sem inclinação e sem carga; Após = coleta após o desaquecimento na esteira, sem inclinação e sem carga; 10 min = coleta referente a etapa de 10 min. de descanso ativo dos cães, no qual permaneceram livres dentro da sala de exercício. # indica os momentos que obtiveram maior valor na comparação intergrupo. Em A, * indica, em Idoso, menor concentração em Antes em relação a todos os outros momentos. Em B, * indica que, em Adulto, 5% é menor que 10 min e & indica que, em Idoso, Antes é menor que Após. Em C, * indica, em Adulto, que 10% é maior que Antes; & indica, em Idoso, que Antes menor que 5%, 10%, 15% e Após e @ indica, em Idoso, que 10 min menor que 5% e 15%. Em D, * indica que Aclim é menor que todos os outros momentos, exceto 10min tanto em Adulto quanto Idoso; & indica que em Adulto o momento 10 min é menor que todos os outros momentos, exceto Aclim e @ indica que em Idoso o momento 10min é menor que 0%, 5% e 10%.

Tabela 4: Valores de mediana com mínimo (min) e máximo (max) das atividades séricas de creatina quinase (CK) e aspartato aminotransferase (AST) nos momentos de coleta antes e após o teste de esforço incremental (TCI).

		Momento de coleta após o teste de esforço incremental (h)							
		Basal	Antes	1	3	6	24	48	72
CK (U/L) (min-max)	A	206 (147-824)	353 (59-765)	778 (59-2353)	765 (118-2236)	693 (88-2412)	614 (147-1236)	438 (147-1000)	631 (118-3030)
	I	170 ^{ab} (88-324)	124 ^{b} (59-294)	252 ^{a} (88-353)	203 ^{ab} (88-382)	206 ^{ab} (59-441)	216 ^{ab} (88-530)	163 ^{ab} (59-294)	134 ^{ab} (88-265)
AST (U/L) (min-max)	A	31 (26-37)	37 (21-42)	39 (26-63)	37 (21-58)	31 (26-68)	39 (26-68)	31 (21-52)	31 (21-42)
	I	26 ^{ab} (21-37)	21 ^{ab} (16-47)	31 ^{a} (26-47)	26 ^{ab} (21-42)	26 ^{ab} (16-37)	26 ^{ab} (21-42)	21 ^{b} (16-32)	26 ^{b} (10-31)

A= Adulto (n=9) e I= Idoso (n=9). Letras minúsculas correspondem a diferenças intragrupo, de acordo com o teste de Tukey (P≤,05). A transformação logarítmica (loge (x) +1) foi usada para análise estatística. Basal = amostras coletadas no canil; Antes = amostras coletadas antes do TCI.

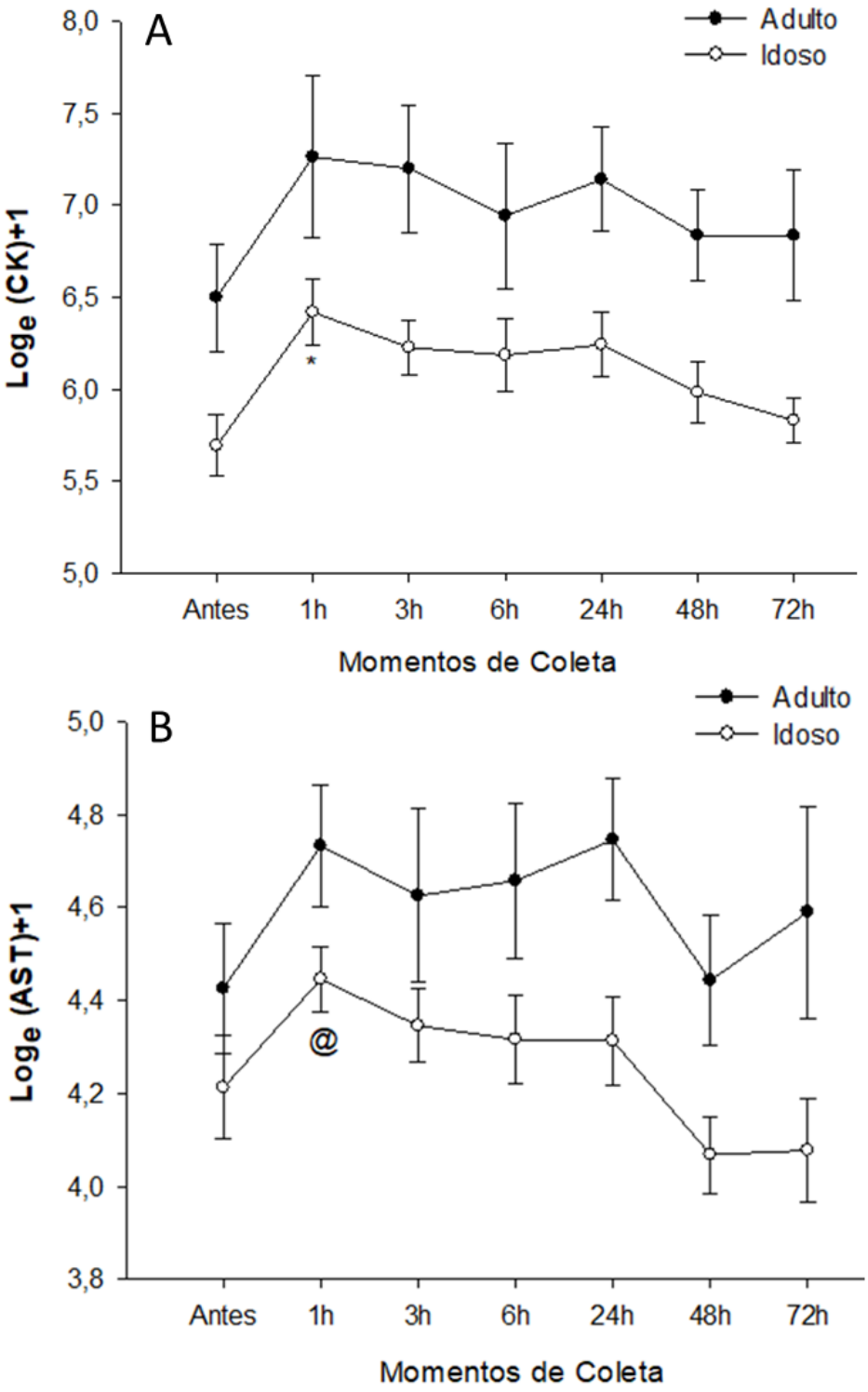


Figura 9: Relação entre a atividade enzimática de creatina quinase (A) e de aspartato aminotransferase (B) após o TCI dos cães dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos). Antes = coleta na esteira de exercício, logo antes do início do TCI; 0% = coleta referente a etapa de exercício com inclinação e sem carga; 1h, 3h, 6h, 24h, 48h e 72h indicam os momentos de coleta após o TCI. Em A, * indica, em I, que 1h é maior que Antes. Em B, @ indica que 1h é maior que 48h e 72h em Idoso.

Nas avaliações intragrupo (**Tabela 3**) das ITs, para BF (**Figura 10A**), A apresentou 5% maior (p=0,03) que 10 min e I não teve diferença entre os momentos (p=0,05). Para LD (**Figura 10B**), A apresentou o momento 5% maior (p=0,01) que Antes e I apresentou os momentos 15% (p=0,003) e Após (p=0,001) maiores que Antes. Para CL (**Figura 10C**), o grupo A apresentou os momentos 5% (p=0,001), 10% (p=0,002), 15%(p<0,001), Após (p<0,001) e 10min (p=0,001) maiores que Antes e I apresentou os momentos 0% (p=0,028), 10% (p=0,007), 15% (p<0,001), Após (p<0,001) maiores que Antes, os momentos 15% (p=0,002) e Após (p=0,002) também foram maiores que 10 min. Por fim, para CM (**Figura 10D**), em A o momento Antes foi menor que todos os outros (0%,p=0,002; 5%, p<0,001; 10%, p<0,001; 15%, p<0,001; Após, p<0,001 e 10 min, p<0,001), assim como para I (em todos p<0,001). I também apresentou os momentos 5% (p=0,002), 10% (p<0,001), 15% (p<0,001) e Após (p<0,001) maiores que 10 min e 15% maior que 0% (p=0,012).

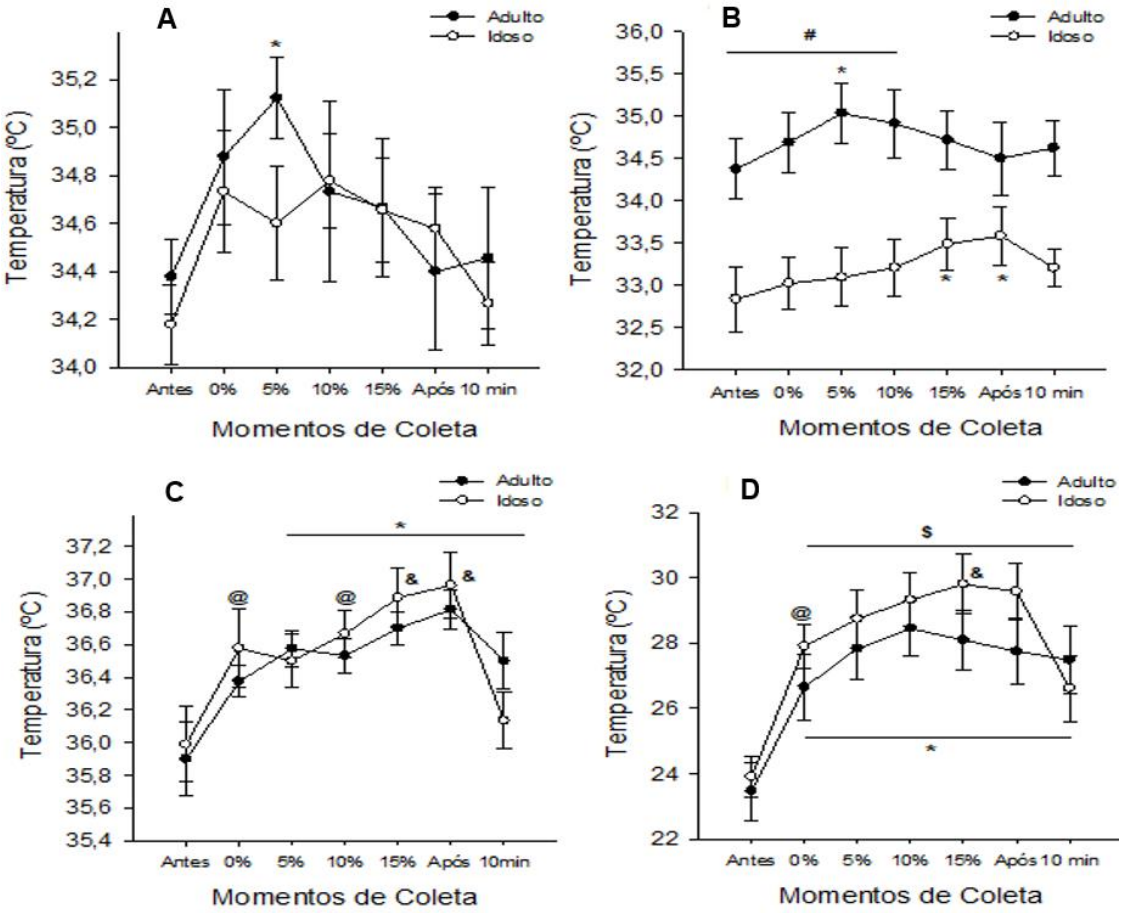


Figura 10: Temperaturas superficiais obtidas por meio de imagens termográficas de regiões dos músculos bíceps femoris (A) e Longissimus dorsi (B), da carúncula lacrimal (C) e do coxim metatársico (D) ao longo do Teste de Carga Incremental (TCI) de cães dos grupos Adulto (A, 4±2 anos) e Idoso (I, 14±3 anos). Antes=coletas imediatamente antes do TCI; 0%= coletas após etapa 0%; 5%= coletas após etapa 5%; 10%= coletas após etapa 10%; 15%= coletas após etapa 15%; Após= coletas ao término do TCI;10min= coletas após 10 minutos do término do TCI com cão solto na sala de exercício em repouso ativo. Em A, * indica momentos de coleta maiores que Antes e 10 min. Em B * indica momento de coleta maior que 10 min em A. Em C, * indica momentos de coleta maiores que Antes em A, & indica momentos maiores que Antes e 10 min em I e @ indica momentos apenas maiores que Antes em I. Em D, * indica momentos maiores que Antes em A, $ indica momentos maiores que Antes em I, & indica momento maior que Antes, 0% e 10 min em I e @ foi maior apenas que Antes.

Quanto aos parâmetros hemogasométricos (**Tabela 5 e Figura 11**), não houve diferença entre os grupos A e I no momento Antes do TCI para qualquer avaliação hemogasométrica (pH, p=0,07; $pvCO_2$, p=0,361 e pvO_2, p=0,304). No entanto, para o momento Após, o pH de I foi maior (p=0,019) e $pvCO_2$ foi menor (p=0,031), comparado com A. Para pvO_2 não houve diferença (p=0,932) intergrupo em Após.

Na avaliação intragrupo, tanto para pH quanto pvO_2, ambos os grupos apresentaram maior valor Após que Antes (A, p=0,026 e I, p=0,017 para pH e A, p= 0,041 e I, p=0,024 para pvO_2). Para $pvCO_2$, em ambos os grupos, Antes apresentou maior valor que Após (A, p=0,016 e I, p=0,002).

No teste de turgor cutâneo (**Tabela 5 e Figura 11**), o grupo I apresentou menor (p=0,02) elasticidade cutânea que A. Já na comparação intragrupo não houve diferença nos grupos analisados (Para A, p=0,81; para I, p=0,09). Quanto ao hemograma (**Tabela 6**) dos cães adulto, não houve diferença entre os momentos Antes e Após em nenhum parâmetro.

Tabela 5: Média ± desvio padrão dos parâmetros hemogasométricos (pH, $pvCO_2$, pvO_2) e do teste de turgor cutâneo (Turgor) dos grupos Adulto (A, n= 9, 4±2 anos) e Idoso (I, n= 9 cães, 14±3 anos) nos momentos logo antes (Antes) do Teste de Esforço Incremental (TCI) na esteira e logo após a última etapa do TCI (Após).

Grupo	pH Antes	pH Após	$pvCO_2$ Antes (mmHg)	$pvCO_2$ Após (mmHg)	pvO_2 Antes (mmHg)	pvO_2 Após (mmHg)	Turgor Antes (s)	Turgor Após (s)
A	$7,39±0,02^{Ab}$	$7,42±0,03^{Ba}$	$39,7±2,4^{Aa}$	$36,0±2,4^{Ab}$	$50,4±4,3^{Ab}$	$66,1±11,3^{Aa}$	$1,30±0,5^{Ba}$	$1,24±0,5^{Aa}$
I	$7,42±0,02^{Ab}$	$7,45±0,02^{Aa}$	$37,2±4,7^{Aa}$	$32,3±4,0^{Bb}$	$54,8±10^{Ab}$	$66,5±10,5^{Aa}$	$1,99±0,6^{Aa}$	$1,68±0,8^{Aa}$

As letras diferentes em maiúsculo nas colunas correspondem diferença entre os grupos no mesmo momento de coleta de acordo com teste t ($p<0,05$), enquanto letras minúsculas indicam diferença intragrupo nos momentos de coleta Antes e Após de acordo com teste t pareado ou Wilcoxon ($p<0,05$).

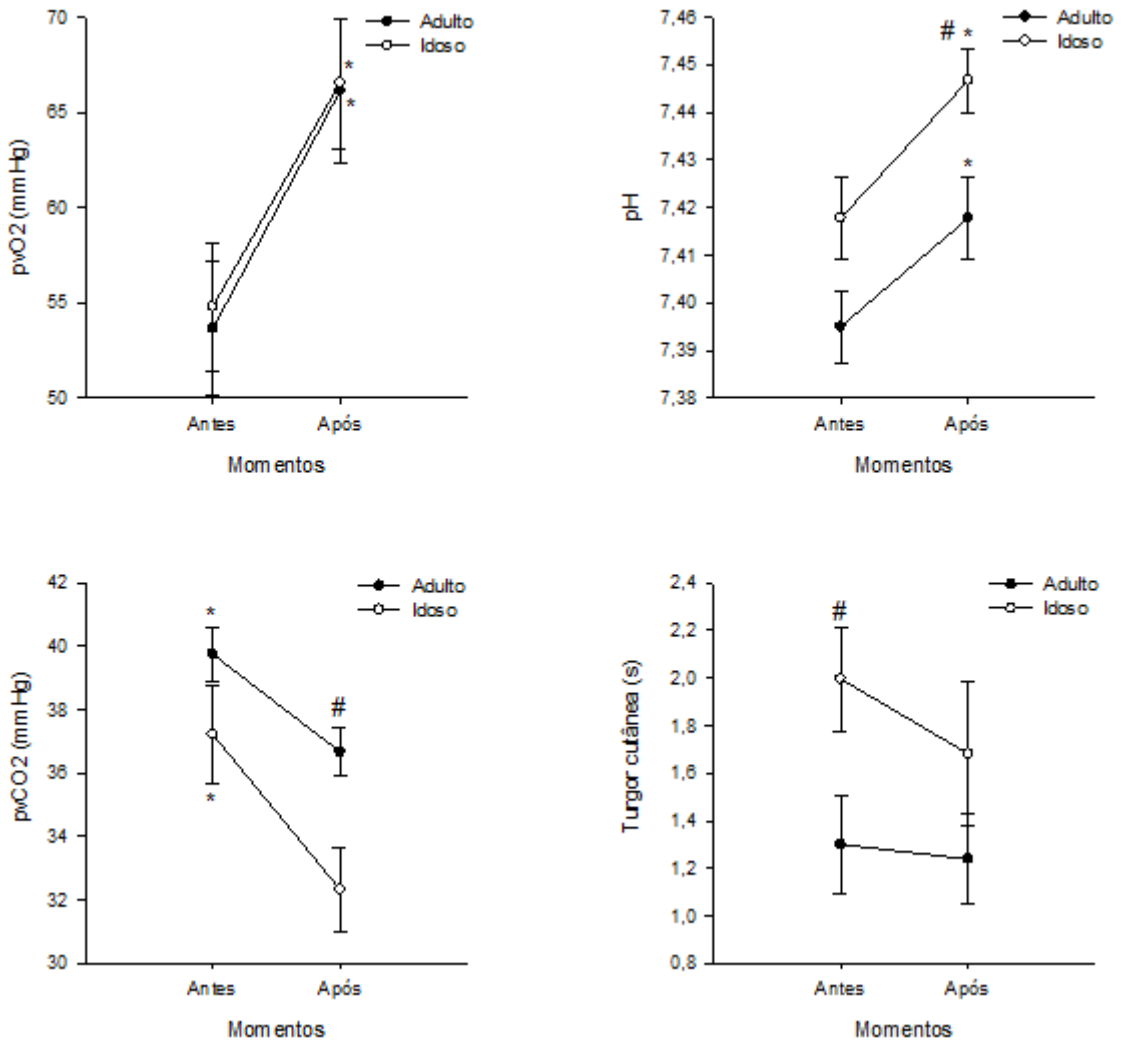


Figura 11: Médias de pvO_2, $pvCO_2$ e pH coletados em sangue venoso e mediana do teste de turgor cutâneo (Turgor) analisados em sangue venoso dos grupos de cães Adulto (A, 4±2 anos) e Idoso (I, 14±3 anos) nos momentos Antes e Após e Teste de Carga Incremental (TCI). # indica diferença intergrupo e * indica diferença entre os momentos (intragrupo).

Tabela 6: Média ± desvio padrão dos parâmetros hematológicos dos grupos Adulto (A, n= 7, 4±2 anos) nos momentos logo antes (Antes) do Teste de Esforço Incremental (TCI) na esteira e logo após a última etapa do TCI (Após).

	Hex10^6	Lex10^3	Hb (g/dL)	Ht%	Ns (%)	Nb (%)	Lin (%)	Mon (%)	Plaq x 10^3	PT (g/dL)
Antes	6,27±0,36	7,23±1,04	14,39±1,11	43,84±2,66	68,14±3,94	1,71±0,45	25,43±4,56	2,29±1,03	199,54±85,15	6,14±0,17
Após	6,06±0,33	7,19±0,7	13,86±0,74	41,97±3,25	68,57±6,06	1,57±0,73	25,86±2,17	1,71±1,16	238,86±31,44	6,10±0,13

HE= hemáceas, LE=leucócitos, Hb= hemoglobina, Ht=hematócrito, Ns=neutrófilo segmentado, Nb=neutrófilo bastonete, Lin=linfócitos, Mon=monócitos, Plaq=plaquetas, PT=proteína total.

A **Figura 12A** indica que a mediana geral de EE do gupo I foi maior ($p \leq 0,0001$) do que A. Na diferença intergrupo, comparando os grupos momento a momento, I apresentou maiores escores do que A em Desaq ($p < 0,001$). Na comparação intragrupo (**Figura 12B**), o momento 15% obteve maior ($p \leq 0,0001$) escore em relação a Aque para o grupo A. Ainda na comparação intragrupo, I teve todos os outros momentos maiores que Aque (todos com $p < 0,001$) e os momentos 15% e Desaq também maiores que 0% ($p = 0,001$ em ambos) e 5% ($p = 0,036$ em ambos). O grupo A apresentou o pico pela linha de tendência (**Figura 12C**) entre 10% e 15% e I apresentou próximo ao Desaq.

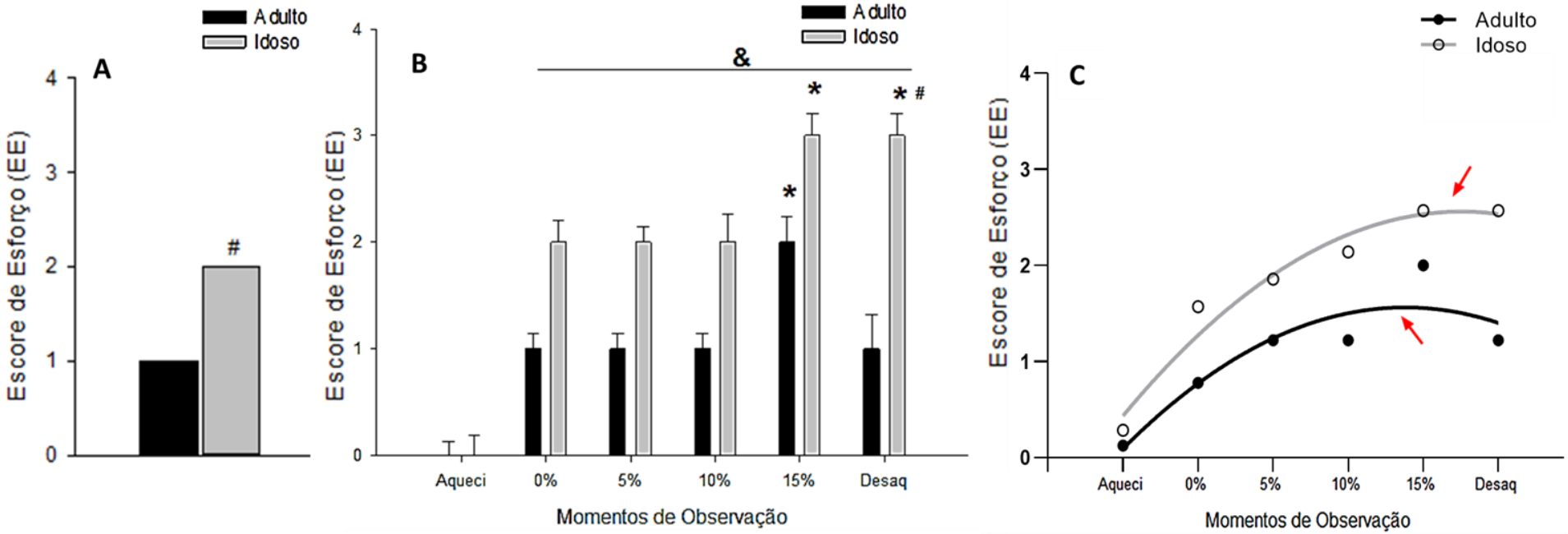


Figura 12: Avaliação intergrupo (**A**) da mediana do Escore de Percepção de Esforço (EE) dos grupos Adulto (4±2 anos) e Idoso (14±3 anos). Avaliação intragrupo (**B**) das medianas nos momentos de observação durante o Teste de Carga Incremental (TCI) e curva de tendência quadrática com setas vermelhas apontando os momentos de pico (**C**). Aque = coleta do aquecimento na esteira de exercício, logo após do início do TCI, esteira sem inclinação; 0% = coleta com inclinação e sem carga; 5% = coleta com inclinação e 5% do peso corpóreo de carga; 10% = coleta com inclinação e 10% do peso corpóreo de carga; 15% = coleta com inclinação e 15% do peso corpóreo de carga; Desaq = coleta do desaquecimento, sem inclinação e sem carga. # indica maior escore na avaliação intergrupo; & indica menor escore na avaliação intragrupo Idoso e * indica maiores escores na avaliação intragrupo Adulto e Idoso.

5. DISCUSSÃO

Os principais achados obtidos nesse estudo demonstraram que cães idosos, em comparação com cães adultos que vivem nas mesmas condições, apresentaram maior lactatemia e menor atividade de CK e AST. Ainda, os cães idosos apresentaram maior pH e menor $pvCO_2$ após a carga pico de exercício em relação aos adultos, indicando que houve maior alcalose respiratória para essa faixa etária. O grupo de idosos também apresentou menor temperatura superficial da região de LD em relação aos adultos. Quanto ao escore de percepção de esforço, os cães idosos apresentaram maiores escores em relação aos adultos. Esses resultados indicaram que o TCI realizado foi o suficiente para gerar esforço significativo nos cães idosos. Ademais, promoveu aumento sérico na atividade de CK e AST de forma fisiológica, ou seja, sem que causasse qualquer prejuízo clínico ou no bem-estar dos cães e retornando aos valores de antes do TCI após 6h deste.

Por meio dos achados do presente estudo, é notado que o TCI promoveu diferenças fisiológicas comparando os momentos iniciais e os finais para ambos os grupos, como aumento da concentração de Lac, redução da concentração de Gli; aumento da FC, da TR e das temperaturas superficiais de LD, CL e CM; além do aumento de pH, pvO2 e escore de esforço e redução de pvCO2. No entanto, TR, FC e Lac indicaram recuperação 10 minutos após o TCI. Portanto o TCI pode ser utilizado por profissionais para determinar a aptidão aeróbia de cães idosos de forma segura, bem como ser empregado na avaliação de programas de condicionamento para prevenção de enfermidades, assim como na melhoria da saúde e bem-estar dessa faixa etária de cães. Nenhum outro estudo foi encontrado abordando testes de aptidão física em cães idosos. Apenas alguns estudos relataram sobre o teste de caminhada de 6 minutos, aplicado para cães com debilidades cardíacas (Boddy et al., 2004), pulmonares (Swimmer, Rozanski, 2011) neuromuscular (Cerda-Gonzalez et al., 2016) e obesidade (Manens et al., 2014).

O protocolo utilizado de TCI, diferente dos protocolos de aptidão física tradicionais aplicados em humanos (El-Sayed et al., 1993; Moriarty et al. 2020) e animais, como equino (Ferraz et al., 2008; Ferraz et al., 2013) e caninos (Pellegrino et al., 2019; Restan et al., 2020), os quais ocorrem com incremento de velocidade, foi elaborado visando o incrememto por meio de carga (inclinação da esteira e

porcentagem de peso corpóreo) que permite obter resultados fisiológicos suficientes para monitorar a aptidão aeróbia de cães idosos de porte médio com idade média de 14 anos. Ainda o TCI ocorre em tempo prático para aplicação profissional (aproximadamente 45 min) e com velocidade reduzida (1,5 m/s ou 5,4 km/h), de modo a evitar prejuízo aos cães ou qualquer desconforto aos tutores, preocupados com o bem-estar.

Além disso, o protocolo do TCI pode também ser testado para cães de qualquer faixa etária com sobrepeso ou obesidade, como já utilizado de forma semelhante no trabalho de Pelosi et al. (2013), que estudaram protocolo para cães com debilidades pouco ou moderadamente limitantes. Em ratos, estudo realizado por Cunha et al. (2009) utlilizaram métodos para determinação do limiar de lactato em ratos idosos por meio do método de acréscimo de carga em porcentagem de massa corpórea dos indivíduos, de modo semelhante ao realizado nesse presente estudo, com o objetivo de encontrar um método de baixa intensidade para ser utilizado em animais idosos.

Ainda sobre o protocolo de TCI utilizado, o tempo de intervalo entre etapas de coleta de três minutos utilizado aqui foi determinado para que houvesse tempo hábil de realizar as coletas necessárias sem estressar os cães e principalmente pelo “delay” no transporte de lactato entre músculo e plasma dos cães em relação ao humano e equino, sugerido no estudo de Ferasin e Marcora (2009) e já empregado do trabalho de Restan et al. (2019).

Quanto aos achados do estudo, a variável Lac obteve maior concentração durante o TCI no grupo I, possivelmente devido a menor aptidão aeróbia em relação aos adultos. Essa relação também foi encontrada num estudo com equinos (Adamu et al., 2013), no qual cavalos de baixa performance e mais velhos obtiveram maiores concentrações de lactato. Estudos indicam que a quantidade de lactato produzida não é maior em indivíduos condicionados, e sim, a capacidade de captação de lactato que é melhorada (Hubbard, 1973, Lantis et al., 2017). Uma hipótese complementar pode ser encontrada no estudo de Prioux et al. (2000), o qual comparou humanos adultos e idosos em exercício incremental e obteve resultado semelhante ao do presente estudo, a concentração venosa de lactato maior em indivíduos idosos. A hipótese defendida por estes últimos autores é que maior parte do lactato produzido durante um exercício submáximo sustentado é oxidado e que a musculatura dos membros é

responsável pela captação de lactato em exercício moderado, uma vez que a capacidade oxidativa de músculos e capilares em indivídos idosos e sedentários é reduzida, essa mudança da capacidade oxidativa dos músculos poderia modificar a depuração de lactato, reduzindo sua captação e, portanto, apresentando concentração mais alta nessa faixa etária.

Para as concentrações medianas de glicose, não houve diferença entre os grupos A e I. Em I a menor concentração na curva de tendência foi entre Antes e 0%. Em humanos, durante exercício de aumento progressivo, é conhecido que ocorre redução da insulina conforme se aumenta a intensidade ou tempo de exercício, esse fato se deve, principalmente, à liberação de catecolaminas, as quais promovem efeitos inibitórios nas células beta do pâncreas (Simões et al., 1998). Além disso, o glucagon, responsável pelo antagonismo da insulina e estímulo da glicogenólise e neoglicogênese, aumenta com o estímulo das catecolaminas, promovendo aumento dos níveis glicêmicos (Wasserman et al., 1991).

Quanto a temperatura retal, não houve diferença nas comparações intergrupo. Nota-se que a média da TR para ambos não ultrapassou 39ºC, indicando que apesar do esforço físico, não houve hipertermia nos cães, sendo esta considerada acima de 39,3ºC (Miller, 2009). O acompanhamento térmico dos cães durante um teste de esforço com carga é importante, uma vez que em temperatura e umidade relativa mais altas, existe potencial risco de hipertermia (Hall, Carter, 2017), principalmente em cães idosos e obesos, os quais possuem maior risco de desidratação (Bruchim et al., 2006).

Como reflexo das condições fisiológicas dos cães idosos em relação aos cães adultos, na curva de tendência da TR (**Figura 4C**), o grupo I teve o pico de temperatura retal após o grupo A (entre 10% e 15% e 10%, respectivamente), indicando que podem demorar mais para realizar o controle térmico. Esse comportamento foi encontrado em humanos (Minson et al., 1998; Holowatz et al., 2010), nesses foi observado que indivíduos mais velhos exibem menor aumento do fluxo sanguíneo na pele quando ocorre aumento da temperatura central em comparação com os indivíduos mais jovens, reduzindo a eficiência do controle térmico. Em ratos idosos também foi observado dificuldade de desenvolver febre, ocorrendo devido limitações no aumento de taxa metabólica e portanto, limitando o controle térmico (Buchanan et al., 2003). Os achados encontrados no presente estudo sugeriram que possa ocorrer com os

cães um mecanismo semelhante, sendo que o envelhecimento pode gerar prejuízo na troca de calor.

Tanto para TR quanto para as temperaturas superficiais de BF e LD, para ambos os grupos houve aumento da temperatura nos momentos após 5% de carga, indicando que houve efeito da carga e exercício e ambos apresentaram recuperação parcial após o desaquecimento (coleta Após) e retorno da temperatura próximo ao valor de antes do TCI após 10 min de descanso ativo.

As temperaturas superficiais dos cães adultos foram maiores que nos cães idosos, apesar de não ocorrer diferença estatística em BF. Nas ITs de BF e LD também ocorreu o pico de temperatura pela curva de tendência em I de modo tardio em relação ao A. Em BF o pico para A ocorre entre 5% e 10%, esse aumento pôde ocorrer pelo efeito inicial da acumulação de carga da inclinação da esteira e da própria carga de chumbo, sendo que nas etapas seguintes os cães passaram a termorregular. Um indicativo desse processo é que na curva de tendência de EE em A, pôde ser notado aumento crescente dos escores até o pico, entre 10% e 15%, e uma vez que o EE inclui em sua avaliação a hiperventilação, pôde-se inferir que ocorre o controle térmico dos cães por esse recurso.

Os músculos da região lombar estão incluídos no sistema epaxial, sendo o *Longissimus dorsi* o mais robusto deles. Exercícios de caminhada e trote em superfície inclinada promove maior atividade em LD em relação a superfícies não inclinadas e são recomendados para fortalecimento dos músculos lombares em cães que sofrem de doenças da coluna (Miró et al., 2020). No presente estudo, além da inclinação foi utilizado acréscimo de carga, o que pode ter colaborado para maior atividade da musculatura epaxial. No estudo de Hutchinson et al. (2012) foi avaliado a musculatura epaxial de cães jovens e idosos por meio da ultrassonografia, concluindo menor área desse músculo nos cães idosos. No presente estudo, as ITs de LD mostraram que A apresentou maior temperatura em relação a I. Possivelmente, essa diferença de temperatura ocorreu nos cães idosos tanto por esses apresentarem menor temperatura superficial, como já discutido anteriormente, como também por apresentarem perda muscular em relação aos indivíduos mais jovens (sarcopenia). Essa perda ocorre principalmente nas fibras musculares do tipo II, responsáveis pela

contração rápida da musculatura, como já estudada em humanos (Snijders et al., 2009) e ratos (Sayed et al., 2016).

Em CL o grupo A obteve maior temperatura superficial da etapa 5% a 10min, já em I as etapas de maior temperatura foram 15% e Após, com redução da temperatura em 10min. A CL, por ser uma região ricamente irrigada e inervada pelo sistema simpático, é um ponto de convencional em estudos de termografia nos olhos em cães (Travain et al., 2015; Rizzo et al., 2017; Elias et al., 2021) e está relacionada com a temperatura retal em cães (Rizzo et al., 2017) e tem alta sensibilidade as mudanças de temperatura devido ao exercício (Elias et al., 2021). A termografia na região da CL também é utilizada em cães como ferramenta para investigação de respostas emocionais como expectativa, stress ou ao receber alimentação (Travain et al., 2016.; Elias et al., 2021). Nos cães do presente estudo foi observado que enquanto no grupo I a IT de CL tem um aumento com o TCI e retornou aos valores de semelhantes a Antes, para o grupo A a temperatura superficial de CL permaneceu significantemente mais alta que Antes mesmo 10 min após o TCI. Essa diferença pôde ter ocorrido pelo fato dos cães adultos serem mais agitados que os idosos e uma vez livres na sala de exercício para o repouso ativo, ficaram agitados pelo fato de estarem livres no ambiente e em estado de expectativa. Durante os 10 min foi observado que nenhum cão permaneceu todo tempo em repouso e principalmente os cães mais jovens ficaram agitados mesmo logo após o exercício.

Resultados semelhantes a CL foram encontrados para CM. Os coxins dos cães são as únicas regiões dos cães que possuem glândulas sudoríparas, além de ser altamente vascularizada e pouco isolada, facilitando a troca de calor (Ninomiya et al., 2013). No momento Antes a temperatura dos coxins foi menor que a temperatura das outras regiões, sendo esperado, uma vez que regiões de extremidade são mais frias que regiões centrais. No entanto, esse resultado também poderia indicar alguma troca de calor. Nessa região houve aumento da temperatura superficial durante o TCI, o qual pôde ocorrer tanto pela fricção do coxim com a manta da esteira quanto pelo aquecimento do corpo como um todo.

Em A a temperatura de CM não retornou aos valores de Antes mesmo após 10 min de repouso ativo, assim como para CL. Um possível motivo para tal resultado seria a agitação dos cães quando livres na sala de exercício. Para o grupo I a

temperatura superficial de CM atingiu o pico entre 10% e 15% e em seguida reduz, ainda assim não voltando aos valores de Antes. A redução na temperatura superficial do CM de I pode ocorrer pelo fato desses cães terem menor agitação enquanto livres durante os 10 min na sala de exercício.

Os resultados de FC indicam que não houve diferença intergrupo e na curva de tendência (**Figura 4D**) de ambos os grupos se pode notar que o pico da FC ocorreu entre os momentos de 5% e 10%. Esse resultado é diferente do esperado, que seria as respostas fisiológicas de maior esforço ocorrerem no momento 15%, uma vez que nesse se acumula o maior tempo de exercício e a maior carga acumulada. Resultado semelhante foi encontrado em cães militares de diferentes idades e portes (Queiroz et al., 2018), no qual a FC foi maior antes da etapa da carga mais intensa. Uma possível explicação está relacionada ao controle autonômico do coração que ocorre em cães, uma vez que nessa espécie a tonicidade do sistema parassimpático costuma ser maior em relação às outras espécies (Restan et al., 2019). No estudo de O'Leary et al. (1997) foi observado, mesmo em altas intensidades de exercício, apesar do tônus simpático estar acentuadamente aumentado, também existe atividade parassimpática significativa. Podendo esta ser uma explicação para a FC média não aumentar progressivamente até 15%.

Na comparação intragrupo, em ambos houve aumento da frequência cardíaca com início do exercício e redução aos valores médios de antes do exercício em até 10 min de repouso ativo após o exercício. Dessa forma, mesmo os cães idosos foram capazes de se recuperar logo após o TCI.

Por fim, quanto aos biomarcadores musculares CK e AST, houve maior atividade enzimática no grupo A em relação ao grupo I. Essa diferença pode ocorrer devido à perda de massa muscular decorrente a idade (Pagano et al., 2015; Sutherland-Smith et al., 2019). Essa perda ocorre principalmente nas fibras musculares do tipo II, responsáveis pela contração rápida da musculatura, como já estudada em humanos (Snijders et al., 2009), ratos (Sayed et al., 2016) e cães (Haidet; Parsons, 1991). Devido a sua contração mais rápida, em comparação com as fibras musculares tipo I, essas sofrem mudanças na permeabilidade do sarcolema (microlesões fisiológicas) durante o exercício e dessa forma o extravasamento de CK e AST no plasma sanguíneo ocorre com maior intensidade (Monemi et al., 1998).

Resultados semelhantes, comparando CK e AST em jovens e mais velhos, foi encontrado em cavalos de corrida no estudo de Lindner e Hatzipanagiotou (1998) e em humanos no estudo de Bouzid et al., 2014.

Na medicina preventiva humana, a recomendação de exercício físico já é rotineira, uma vez que na senilidade ocorre a perda da massa magra (sarcopenia) mesmo na ausência de doenças como causa (Zhang et al., 2021). A sarcopenia gera, tanto em humanos quanto em animais de companhia, redução da autonomia e qualidade de vida, gerando dificuldade de se levantar, de se locomover e quedas. Os exercícios físicos, tanto de resistência (distância ou velocidade) quanto resistidos (força), são recomendados em humanos como parte principal da prevenção e tratamento para sarcopenia (Dieli-Conwright et al., 2018; McKendry et al., 2020).

O TCI abrangeu exercício tanto de resistência (velocidade e tempo) quanto resistido (inclinação e carga), promovendo contrações dos dois tipos de fibras musculares (I e II) e gerando microlesões fisiológicas. Portanto, ocorreu diferença nas médias da atividade das enzimas CK e AST dos cães, sendo esta resposta de maior intensidade nos A. Dessa forma, a cargas do TCI também podem servir como ferramenta de treino resistido para cães idosos caso não haja outros quadros que levariam a contraindicação, como problemas na coluna, por exemplo. Na fisioterapia veterinária os treinos resistidos são utilizados nos pacientes para auxílio do ganho de massa muscular, ferramentas como esteira aquática, suporte de pesos, exercícios de equilíbrio, salto, entre outros (Cottriall, 2014).

Assim como no estudo de Cerqueira et al. (2018), o pico de AST nos cães adultos ocorreu em 6h após o exercício. No entanto, de CK, no referido estudo, foi relatado ocorrer em 6h após o exercício, enquanto no presente estudo, segundo a curva de tendência, foi encontrado o pico em 6h a 24h após o TCI. Isso pode ocorrer pelo fato de elevações na atividade sérica de CK e AST serem depentes do tipo de exercício realizado, assim como a duração e intensidade desse (McKenzie et al., 2007). Nesse estudo vimos também que a elevação na atividade dessas enzimas pode ocorrer também segundo a faixa etária, uma vez que os cães idosos apresentaram a média de CK e AST mais baixas, além do pico ter ocorrido antes em relação aos adultos, em 3h após o TCI para AST e entre 3h e 6h após para CK.

No estudo também foi notado que os valores de atividade de CK ultrapassaram os valores de referência, principalmente nos cães adultos, considerando os valores de referência de CK, segundo Meyer et al. (1992), de 20 a 200 U/L. Mesmo antes do TCI, no momento Antes, a mediana de CK foi maior que os valores de referência. Esse aumento pode ocorrer tanto pela grande variação individual desse parâmetro em cães (Aktas et al., 1993), quanto pela cateterização realizada prévia ao TCI. A espécie canina parece ser mais sensível ao processo de cateterização, observação também realizada em Cerqueira et al. (2018) e fundamentada em estudos que relatam a importância da CK total no musculo liso de vasos sanguíneos de cães e humanos (Morello et al., 2014).

Tanto no grupo A quanto em I, foi observado aumento da atividade de CK e AST após o exercício, no entando, retornando aos valores semelhantes aos basais a partir de 6h após o TCI, indicando recuperação. Esse acompanhamento cinético das atividades enzimáticas é importante para prevenir alterações musculares relacionadas ao exercício. Lesões musculares significantes podem gerar rabdomiólise induzida pelo esforço. Nesse quadro ocorre alterações clínicas como músculos dolorosos e tensos, alterações da locomoção, ou coloração avermelhada da urina (Devall et al., 2018). Apesar da CK acima da faixa de normalidade em adultos, nenhum desses sintomas foram detectados nos cães do presente estudo. A atividade sérica, tanto de CK quanto AST, aumentou até 6h após o TCI nos cães e reduziu após esse período, chegando em valores semelhantes ou menores que os basais em 72h. Em caso de valores persistentemente altos da atividade séricas dessas enzimas no plasma sanguíneo após o período de 6h, no caso do protocolo do TCI, e acompanhado de sinais clínicos, pode ser indicativo de lesões mais significativas e indica-se redução das atividades para recuperação.

Em média, em ambos os grupos (A e I), não houve valores de AST acima dos valores de referência. Já para CK, o grupo A teve todos os valores médios acima dos valores de referência e o grupo I, em todos os momentos após o TCI antes de 24h. Essa diferença dos valores proporcionais de CK e AST ocorre uma vez que a enzima CK está presente no citoplasma das células musculares e possui baixo peso molecular, características que facilitam a sua passagem do sarcolema para o plasma mesmo que não aja dana tecidual, basta que haja aumento na permeabilidade da

membrana da fibra para que ocorra o extravasamento dessa enzina (Perez et al., 1997). Dessa forma, a CK é considerada um biomarcados mais sensível que AST. Em equinos, CK se eleva primeiro que AST e regressa primeiro aos valores basais (Teixeira-Neto et al., 2008). Já a AST é uma enzima presente no citoplasma e mitocôndria das células musculares, portanto, seu aumento se deve a alterações maiores no sarcolema e da fibra muscular, indicando comprometimentos maiores. No presente estudo, a cinética de CK e AST ocorreram de forma semelhante, de forma que comparando o mesmo grupo, essas enzimas aumentaram e reduziram ao mesmo tempo. Esse achado em cães também ocorreu no trabalho de Cerqueira et al. (2018). Além disso, os valores de AST, em média, não ultrapassaram os valores de referência, indicando que o TCI não causou qualquer comprometimento nas fibras musculares dos cães. A atividade de CK, apesar de aumentar, retornou rapidamente aos valores de antes de TCI.

A hemogasometria apresentou resposta fisiológica ao exercício comumente encontrado na literatura. Imediatamente após a carga de 15%, os cães apresentam elevação em pvO_2 e hipocapnia. Essas alterações indicaram que houve manutenção da resposta cardiorrespiratória devido ao exercício, além da necessidade de termorregulação (aumento de pvO_2). No entanto, houve redução do gasto energético muscular devido ao repouso para coleta (hipocapnia). A TR, no momento de coleta de maior carga (15%), a temperatura se encontra maior que a temperatura Antes, confirmando a necessidade de controle térmico por meio da hiperventilação nos cães. Ademais, em EE, no momento de observação de maior carga, os cães apresentaram escore 2 (respiração ofegante consistente, mas não dificultosa) em A e 3 (respiração ofegante levemente forçada) em I, indicando a presença de hiperventilação nos cães no momento correspondente ao Após da hemogasometria. O aumento do pH venoso no Após indica alcalose respiratória, o aumento do pH decorrente da redução de $pvCO_2$. No presente estudo ainda pode ser notado a diferença intragrupo de $pvCO_2$ e pH, sendo significante no momento Após. No estudo de Aguilera-Tejero et al. (1997) também foi encontrado menor $pvCO_2$ e maior pH em cães idosos (10 a 16 anos) em relação aos mais jovens (4 anos), porém sem diferença estatística, assim como encontrado no momento Antes do presente estudo. A diferença intergrupo significativa no momento Após pode ser explicada junto aos resultados de EE, no qual no aumento

de maior carga houve maior hiperventilação nos cães I (escore 3) em relação ao A (escore 2), dessa forma, promovendo redução mais intensa de $pvCO_2$ em I e maior alcalose.

Nos resultados de Turgor os cães do grupo I apresentam menor elasticidade da pele (maior tempo no teste de turgor cutâneo) em relação a A e essa diferença não foi encontrada no Após, essa alteração é possivelmente decorrente ao efeito da própria idade, uma vez que indivíduos idosos apresentam menor elasticidade da pele e hidratação comparada aos mais jovens (Mosier, 1989). Na avaliação intragrupo houve redução nos valores de Turgor, sendo essa não significativa, resultado semelhante foi encontrado no estudo de Goucher et al. (2019) realizado durante o treinamento em cães de trabalho de busca e resgate. O resultado pode ser explicado pela perda evaporativa que ocorre nos cães para controle térmico durante a ventilação respiratória, também detectado em EE. No entanto, a redução no tempo de teste de Turgor não foi significativo e não indicou desidratação, resultado apoiado pelo resultado do hemograma e de PT realizado nos animais adultos Antes e Após, no qual não foi encontrado alterações significativas no número de hemácias, hematócrito, neutrófilos e PT.

Por fim, os resultados EE indicam que a avaliação comportamental de percepção de esforço, já muito utilizada em humanos, pode ser de grande utilidade em cães idosos, auxiliando na percepção de esforço realizada pelos cães e evitando exercício extenuantes, que podem ser prejudiciais ou inviáveis, principalmente para cães idosos ou com debilidades como obesidade ou problemas ortopédicos. Por meio do EE foi possível detectar sinais de esforço como hiperventilação e tentativa de redução da marcha (notado quando os cães passavam a caminhar mais para o fim da esteira e não respondiam mais ao estímulo de oferecer alimento à frente para estimular que caminhassem). A comparação com o estado do cão no momento de aquecimento foi fundamental para melhor aplicação do escore, uma vez que alguns cães já se apresentavam ofegantes no início do exercício devido a agitação e expectativa. Dessa forma, foi possível observar mudanças no comportamento desses ao longo das fases incrementais do TCI, como hiperventilação mais consistente e relutância de caminhar e buscar o alimento. Alguns outros comportamentos foram visualizados durante o teste como indicativos de esforço e cansaço nos cães como

redução da altura da posição da cabeça e cauda, que poderiam ser incluídos nos escores para formação de uma avaliação mais detalhada que a proposta por Swanson et al. (2019). Ainda em relação a aplicação do escore proposto por esses autores, no presente estudo não foi visualizado aumento na agitação dos cães em escores mais elevados e sim redução da agitação. No entanto, a aplicação de EE foi plenamente satisfatória e permitiu detectar o esforço dos cães durante o TCI e notar a diferença entre a intensidade de esforço realizada pelo grupo de cães adultos e idosos, sendo notado que os cães do grupo I realizaram mais esforço que A para realização do TCI e que, diferente do grupo A, não recuperaram durante o Desaq, resultando nessa etapa diferença intragrupo.

Algumas limitações fizeram parte desse estudo, como pequeno valor amostral de animais, pois, apesar de estar coerente com outras publicações sobre fisiologia do exercício em cães (Parkinson et al., 2018; Soroko et al., 2021; Shull et al.,2021) um valor amostral maior poderia ter gerado maiores esclarecimentos.; animais idosos com afecções cardíacas, pois mesmo que medicados dificilmente podemos prever as possíveis modificações nos resultados; o comportamento individual dos cães podem ter influenciado no resultado de algumas coletas como FC, GLI, CK e AST, uma vez que alguns cães se apresentavam mais agitados soltos na sala ou contidos por guia, ou mesmo nas bais, enquanto que outros permaneciam mais calmos, sendo adultos ou idosos.

6. CONCLUSÃO

Os cães idosos apresentaram diferentes respostas ao TCI em relação aos adultos. Ademais, o protocolo de TCI aplicado do presente estudo se mostra eficiente para gerar esforço físico moderado em cães idosos, além seguro e prático, uma vez que induziu alterações transitórias das variáveis fisiológicas analisadas e não houve alterações significantes nos valores de referência da espécie para nenhum parâmetro analisado.

7. REFERÊNCIAS

Aarskog, R., Wisnes, A., Wilhelmsen, K., Skogen, A., Bjordal, J. M. (2012). Comparison of two resistance training protocols, 6RM versus 12RM, to increasethe 1RM in healthy young adults. A single-blind, randomized controlledtrial. **Physiotherapy Research International**, 17:179-186.

Adamu, L., Noraniza, M. A., Rasedee, A., Bashir, A. (2013). Effect of age and performance on physical, hematological, and biochemical parameters in endurance horses**. Journal of equine veterinary science**, 33:415-420

Aguilera-Tejero, E., Fernandez, H., Estepa, J.., Mayer-Valor, R., Rodríguez, M. (1997). Arterial blood gases and acid-base balance in geriatric dogs. **Research in Veterinary Science**, 63:253–256.

Aktas, M., Auguste, D., Lefebvre, H.P., Toutain, P.L., Braun, J.P., 1993. Creatine kinase in the dog: a review. **Veterinary Research Communications**, 17, 353-369.

Alves, J., Santos, A., Brites, P., Ferreira-Dias, G. (2012). Evaluation of physical fitness in police dogs using an incremental exercise test. **Comparative Exercise Physiology**, *8*: 219-226.

Aune, D., Norat, T., Leitzmann, M., Tonstad, S., Vatten, L.J. (2015). Physical activity and the risk of type 2 diabetes: a systematic review and dose–response meta-analysis. **European journal of epidemiology,** 30:529-542.

AVMA 2017: Total pet ownership and pet population. In: US pet ownership and demographics sourcebook. Schaumburg, Ill: 6–23

Baker, M.A., Doris, P.A., Hawkins, M. (1983). Effect of dehydration and hyperosmolality on thermoregulatory water losses in exercising dogs**. American Journal of Physiology**, 244: 516–21.

Baker, M. A. (1984). Thermoregulatory responses to exercise in dehydrated dogs. **Journal of Applied Physiology**, 56:635-640.

Bartges, J., Boynton, B., Vogt, A. H., Krauter, E., Lambrecht, K., Svec, R., & Thompson, S. (2012). AAHA canine life stage guidelines. **Journal of the American Animal Hospital Association**, *48*: 1-11.

Bentley, D. J., Newell, J., Bishop, D. (2007). Incremental exercise test design and analysis. **Sports medicine**, *37*: 575-586.

Beydoun, M.A., Beydoun, H.A., Gamaldo, A.A., Teel, A., Zonderman, A.B., Wang, Y. (2014). Epidemiologic studies of modifiable factors associated with cognition and dementia: systematic review and meta-analysis. **BMC public health**, 14: 1-33.

Berkman, C., Teixeira, L.G., Pereira, M.C., Bernardi, N.S., Neto, A.D.Q., Ferraz, G.D.C. (2015). Distance exercised during submaximal training on race winnings for thoroughbred racehorses. **Ciência Rural**, *45*:1268-1273.

Bichay, A. A. F., Ramírez, J. M., Núñez, V. M., Lancho, C., Poblador, M. S., Lancho, J. L. (2016). Efficacy of treadmill exercises on arterial blood oxygenation, oxygen consumption and walking distance in healthy elderly people: a controlledtrial. **BMC Geriatrics**, 16:110.

Boddy, K. N., Roche, B. M., Schwartz, D. S., Nakayama, T., & Hamlin, R. L. (2004). Evaluation of the six-minute walk test in dogs. **American journal of veterinary research**, 65, 311-313.

Booth, F. W., Roberts, C. K., Laye, M. J. (2012). Lack of exercise is a major cause of chronic diseases. **Comprehensive physiology**, 2:1143-1211.

Booth, F. W., Roberts, C. K., Thyfault, J. P., Ruegsegger, G. N., & Toedebusch, R. G. (2017). Role of inactivity in chronic diseases: evolutionary insight and pathophysiological mechanisms. **Physiological reviews**, 97:1351-1402.

Borg, G. (1998). Perceived exertion. In: Borg's Perceived Exertion and Pain Scales. Human Kinetics, Champaign,IL, **Human Kinetics**, 2-9.

Bouzid, M. A., Hammouda, O., Matran, R., Robin, S., Fabre, C. (2014). Changes in oxidative stress markers and biological markers of muscle injury with aging at rest and in response to an exhaustive exercise**. PloS one**, 9: e90420.

Boyle, T., Keegel, T., Bull, F., Heyworth, J, Fritschi, L. (2012). Physical activity and risks of proximal and distal colon cancers: a systematic review and meta-analysis. **Journal of the national cancer institute**, 104:1548-156.

Brito, L. C., Peçanha, T., Fecchio, R. Y., Pio-Abreu, A., Silva, G., Mion-Junior, D.,Forjaz, C. L. (2021). Comparison of morning versus evening aerobic-exercise training on heart rate recovery in treated hypertensive men: a randomized controlled trial. **Blood Pressure Monitoring**, 26:388-392.

Brooks, D., Churchill, J., Fein, K., Linder, D., Michel, K. E., Tudor, K., Witzel, A. (2014). AAHA weight management guidelines for dogs and cats**. Journal of the American Animal Hospital Association**, 50: 1-11.

Brooks, G. A. (2018). The science and translation of lactate shuttle theory. **Cell metabolism**, 27:757-785.

Bruchim, Y., Klement, E., Saragusty, J., Finkeilstein, E., Kass, P., Aroch, I. (2006). Heat stroke in dogs: a retrospective study of 54 cases (1999–2004) and analysis of risk factors for death. **Journal of veterinary internal medicine**, 20:38-46.

Buchanan, J. B., Peloso, E., Satinoff, E. (2003). Thermoregulatory and metabolic changes during fever in young and old rats. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, 285:1165-1169.

Carraro, U., Gava, K., Musumeci, A., Baba, A., Piccione, F., Marcante, A. (2018). Safe antiaging full-body in-bed gym and FES for lazy persons: home in-bed exercises for fighting muscle weakness in advanced age. In: Masiero, S., Carraro, U. (eds) **Rehabilitation medicine for elderly patients**, 43–52.

Cerda-Gonzalez, S., Talarico, L., Todhunter, R. (2016). Noninvasive assessment of neuromuscular disease in dogs: use of the 6-minute walk test to assess submaximal exercise tolerance in dogs with centronuclear myopathy. **Journal of veterinary internal medicine**, 30:808-812.

Cerqueira, J. A., Restan, W. A. Z., Fonseca, M. G., Catananti, L. A., de Almeida, M. L. M., Junior, W. H. F., Ferraz, G. C. (2018). Intense exercise and endurance-training program influence serum kinetics of muscle and cardiac biomarkers in dogs. **Research in veterinary science**, 121:31-39.

Codella, R., Ialacqua, M., Terruzzi, I.,Luzi, L. (2018). May the force be with you: why resistance training is essential for subjects with type 2 diabetes mellitus without complications. **Endocrine**, 62:14-25.

Cottriall, S. (2014). The geriatric canine and physiotherapy. Companion Animal, 19(6), 296-300.; Saunders, D. G. (2007). Therapeutic exercise**. Clinical techniques in small animal practice**, 22:155-159.

Cruz-Jentoft, A. J., Baeyens, J. P., Bauer, J. M., Boirie, Y., Cederholm, T., Landi, F., Zamboni, M. (2010). Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosisReport of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. **Age and ageing**, 39:412-423.

Cunha, R.R., de Carvalho Cunha, V.N., Segundo, P.R., Moreira, S.R., Kokubun, E., Campbell, C.S.G., de Oliveira, R.J., Simões, H.G. (2009). Determination of the lactate threshold and maximal blood lactate steady state intensity in aged rats. **Cell Biochemistry. Function,** 27:351–357.

Da Ponte, A., Giovanelli, N., Antonutto, G., Nigris, D., Curcio, F., Cortese, P., Lazzer, S. (2018). Changes in cardiac and muscle biomarkers following an uphill-only marathon. **Research in Sports Medicine**, 26:100-111.

Devall, V. C., Goggs, R., Hansen, C., Frye, C. W., Letendre, J. A., Wakshlag, J. J. (2018). Serum myoglobin, creatine kinase, and cell-free DNA in endurance sled dogs and sled dogs with clinical rhabdomyolysis. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care**, 28:310-316.

Dieli-Conwright, C. M., Courneya, K. S., Demark-Wahnefried, W., Sami, N., Lee, K., Buchanan, T. A., Mortimer, J. E. (2018). Effects of aerobic and resistance exercise

on metabolic syndrome, sarcopenic obesity, and circulating biomarkers in overweight or obese survivors of breast cancer: a randomized controlled trial**. Journal of Clinical Oncology**, 36:875-883.

Elias, B., Starling, M., Wilson, B., McGreevy, P. (2021). Influences on Infrared Thermography of the Canine Eye in Relation to the Stress and Arousal of Racing Greyhounds. **Animals**, 11:103.

El-Sayed, M.S., George, K.P. Dyson, K. (1993). The influence of blood sampling site on lactate concentration during submaximal exercise at 4 mmol 1−1 lactate level. **Europe Journal of Applied Physiology**, 67:518–522.

Ferasin, L., Marcora, S. (2009).Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador Retrievers. **Journal of Compomparative Physiology**, 179:839–845.

Ferguson B.S, Rogatzki M.J, Goodwin M.L, Kane D.A, Rightmire Z, Gladden L.B. (2018). Lactate metabolism: historical context, prior misinterpretations, and current understanding. **Europe Journal of Applied Physiology,** 118:691–728.

Ferraz, G. C., Teixeira-Neto, A. R., Lacerda-Neto, J. C., Pereira, G. T., & Queiroz-Neto, A. (2008). Aminophylline affects glycemia control and increases anaerobic glycolysis in horses during incremental exercise. Journal of Equine Veterinary Science, 28:403-407

Ferraz, G., Teixeira-Neto, A. R., de Freitas D'Angelis, F. H., de Lacerda-Neto, J. C., Queiroz-Neto, A. (2009). Alterações hematológicas e cardíacas em cavalos Árabes submetidos ao teste de esforço crescente em esteira rolante. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, 46: 431-437.

Ferraz, G. C., Brito, H. C., Berkman, C., Albernaz, R. M., Araújo, R. A., Silva, M. H.,Queiroz-Neto, A. (2013). Low dose of dichloroacetate infusion reduces blood lactate after submaximal exercise in horses**. Pesquisa Veterinária Brasileira**, 33: 57-60.

Freeman, L. M. (2012). Cachexia and sarcopenia: emerging syndromes of importance in dogs and cats. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, 26:3-17.

Glancy, B., Kane, D. A., Kavazis, A. N., Goodwin, M. L., Willis, W. T., Gladden, L. B. (2021). Mitochondrial lactate metabolism: history and implications for exercise and disease. **The Journal of Physiology**, 599:863-888.

Gokce, G., Citil, M., Gunes, V., Atalan, G. (2004). Effect of time delay and storage temperature on blood gas acid-base values of bovine venous blood. Research in Veterinary Science. 76:121–127.

Goldberg, M.B., Langman, V.A., Taylor, C.R. (1981). Panting in dogs: paths of air flow in response to heat and exercise. **Respiration Physiology**, 43:327–38.

Gonçalves, A.K., Florêncio, G.L., de Atayde Silva, M.J., Cobucci, R.N., Giraldo, P.C., Cote, N.M. (2014). Effects of physical activity on breast cancer prevention: a systematic review. **Journal of physical activity and health**, 11: 445-454.

Goucher, T. K., Hartzell, A. M., Seales, T. S., Anmuth, A. S., Zanghi, B. M., Otto, C. M. (2019). Evaluation of skin turgor and capillary refill time as predictors of dehydration in exercising dogs. **American Journal of Veterinary Research**, 80:123-128.

Gremeaux, V., Gayda, M., Lepers, R., Sosner, P., Juneau, M., Nigam, A. (2012). Exercise and longevity. **Maturitas**, 73:312-317.

Haidet, George C.; Parsons, Dorabeth. (1991) Reduced exercise capacity in senescent beagles: an evaluation of the periphery. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 260:173-182.

Hall, E. J., Carter, A. J. (2017). Comparison of rectal and tympanic membrane temperature in healthy exercising dogs. Comparative Exercise Physiology, 13: 37-44.

Hargreaves, M., Spriet, L. L. (2020). Skeletal muscle energy metabolism during exercise. **Nature Metabolism**, 2: 817-828

Herold, F., Törpel, A., Schega, L., Müller, N. G. (2019). Functional and/or structural brain changes in response to resistance exercises and resistance training lead to cognitive improvements–a systematic review. **European review of aging and physical activity**, 16:1-33.

Holowatz, L. A., Thompson-Torgerson, C., & Kenney, W. L. (2010). Aging and the control of human skin blood flow. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**,15: 718-2010.

Hubbard, J.L. (1973).The effect of exercise on lactate metabolism. **Journal Physiology**, 231:1-18.

Hutchinson, D., Sutherland-Smith, J., Watson, A. L., Freeman, L. M. (2012). Assessment of methods of evaluating sarcopenia in old dogs. **American Journal of Veterinary Research**, 73:1794–1800.

Kennedy, C. R., Babyak, J. M., Rozanski, E. A. (2021). The accuracy of tactile assessment of canine nose temperature to identify rectal hyperthermia and hypothermia in dogs presenting on an emergency basis. Canadian Journal of Veterinary Research, 85:205-209.

Keogh, J.W., Grigg, J., Vertullo, C.J. (2018). Is high-intensity interval cycling feasible and more beneficial than continuous cycling for knee osteoarthritic patients? Results of a randomised control feasibility trial. **PeerJ**, e4738.

Kerrigan, L. (2017). How to maintain joint health in the ageing canine. **The Veterinary Nurse**, *8*: 37-44.

Kim, K. M., Kang, H. J. (2020). Effects of resistance exercise on muscle mass, strength, and physical performances in elderly with diagnosed sarcopenia: a systematic review and meta-analysis. **Exercise science**, 29:109-120.

Kirwan, R., McCullough, D., Butler, T., de Heredia, F. P., Davies, I. G., Stewart, C. (2020). Sarcopenia during COVID-19 lockdown restrictions: long-term health effects of short-term muscle loss. **GeroScience**, 42:1547-1578.

Kozłowski, S., Brzezińska, Z., Kruk, B., Kaciuba-Uściłko, H., Greenleaf, J.E., Nazar, K. (1985). Exercise hyperthermia as a factor limiting physical performance: temperature effect on muscle metabolism. **Journal of Applied Physiology**, 59:766–73.

Krug, F. D. M., Tillmann, M. T., Piñeiro, M. B. C., Mendes, C. B. M., Capella, S. O., Bruhn, F. R. P., Nobre, M. O. (2018). Diagnostic evaluation of canine cognitive dysfunction syndrome. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 70:1723-1730.

Laflamme, D. P. (1997) Development and validation of a body condition score system for dogs: a clinical tool. Canine Practice, Santa Barbara, 22: 10-15.

Laflamme, D. P. (2012). Nutritional care for aging cats and dogs. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, 42:769-791.

Lantis, D. J., Farrell III, J. W., Cantrell, G. S., Larson, R. D. (2017). Eight weeks of high-volume resistance training improves onset of blood lactate in trained individuals. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, 31:2176-2182.

Lindner, A., Hatzipanagiotou, A. (1998). Effect of age and of performance parameters on CK, LDH and AST activities in plasma of standardbred horses during exercise. **Pferdeheilkunde**, 14:456-460.

Lippi, G., Schena, F., Ceriotti, F. (2019). Diagnostic biomarkers of muscle injury and exertional rhabdomyolysis. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine** (CCLM), 57:175-182.

Lustosa, L. P., Pereira, D. A. G., Parentoni, A. N., Dias, R. C., Dias, J. M. D. (2015). Impact of aerobic training associated with muscle strengthening in elderly individuals at risk of sarcopenia: a clinical trial. **Journal Gerontology & Geriatric Research**, 4:208.

Manens, J., Ricci, R., Damoiseaux, C., Gault, S., Contiero, B., Diez, M., Clercx, C. (2014). Effect of body weight loss on cardiopulmonary function assessed by 6-minute walk test and arterial blood gas analysis in obese dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, 28:371-378.

Matwichuk, C.L., Taylor, S., Shmon, C.L., Kass, P.H., Shelton, G.D. (1999). Changes in rectal temperature and hematologic, biochemical, blood gas, and acid-base values in healthy Labrador Retrievers before and after strenuous exercise. **American Journal of Veterinary Research***,* 60:88–92.

McGowan, C. (2008). Clinicalpathology in theracinghorse: the role of clinical pathology in assessing fitness and performance in the race horse. **Veterinary Clinical of North American: Equine Practice,** 24:405-421.

McKendry, J., Currier, B. S., Lim, C., Mcleod, J. C., Thomas, A. C., Phillips, S. M. (2020). Nutritional supplements to support resistance exercise in countering the sarcopenia of aging. **Nutrients**, 127: 2057.

McKenzie, E.C., Jose-Cunilleras, E., Hinchcliff, K.W., Holbrook, T.C., Royer, C., Payton, M.E., Williamson, K., Nelson, S., Willard, M.D., Davis, M.S., (2007). Serum chemistry alterations in Alaskan sled dogs during five successive days of prolonged endurance exercise. **Journal American Veteterinary Medicine Association**, 230: 1486–1492.

Medbø, J. I., Jebens, E., Noddeland, H., Hanem, S. Toska, K. (2006) Lactate elimination and glycogen resynthesis after intense bicycling. **Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation,**. 66:211–226.

Mendoza-Lara, M., Orozco-Gregorio, H., Ramírez-Necoechea, R., Caballero-Chacón, S., Hernández-González, R., Becerril-Herrera, M., Mota-Rojas, D. (2012). Perfil fisiometabólico de perros Pastor Belga Malinois y Pastor Holandés de alto rendimiento en respuesta a una sesión de entrenamiento para Ring Francés. **Archivos de medicina veterinaria**, *44*:137-144.

Melli, G.; Chaudhry, V.; Cornblath, D. R. (2005). Rhabdomyolysis: an evaluation of 475 hospitalized patients. **Medicine**, 84: 377-385.

Menchetti, L., Guelfi, G., Speranza, R., Carotenuto, P., Moscati, L., Diverio, S. (2019). Benefits of dietary supplements on the physical fitness of German Shepherd dogs during a drug detection training course. **PloS one**, 14:218-275.

Metzger, F. L. (2005). Senior and Geriatric Care Programs for Veterinarians. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice***,* 35:743–753*.*

Meyer, D.J., Harvey, J.W. (1992). Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis. 2rd ed. Saunders, Philadelphia., 350.

Middelbos, I. S., Vester, B. M., Karr-Lilienthal, L. K., Schook, L. B., Swanson, K. S. (2009). Age and diet affect gene expression profile in canine skeletal muscle. **Plos One**, 4: e4481.

Miller, J.B. (2009). Hyperthermia and fever. In: Silverstein, D.C. and Hopper, K. (eds.) Small animal critical care medicine. Saunders Elsevier, MO, USA, 21-26.

Minson, C. T., Wladkowski, S. L., Cardell, A. F., Pawelczyk, J. A., Kenney, W. L. (1998). Age alters the cardiovascular response to direct passive heating. **Journal of applied physiology**, 84:1323-1332.

Miró, F., Galisteo, A. M., Garrido-Castro, J. L., Vivo, J. (2020). Surface Electromyography of the Longissimus and Gluteus Medius Muscles in Greyhounds Walking and Trotting on Ground Flat, Up, and Downhill. **Animals**, 10:968

Monemi, M., Eriksson, P.O, Eriksson A, Thornell L.E. (1998) Adverse changes in fibre type composition of the human masseter versus biceps brachii muscle during aging. **Journal Neurological Science** 154: 35–48.

Morello, F., Piler, P., Novak, M., Kruzliak, P. (2014). Biomarkers for diagnosis and prognostic stratification of aortic dissection: challenges and perspectives. **Biomarker Medicine**, 8:931–41.

Moriarty, T., Bourbeau, K., Mermier, C., Kravitz, L., Gibson, A., Beltz, N., Zuhl, M. (2020). Exercise-Based Cardiac Rehabilitation Modulates Prefrontal Cortex Oxygenation during Submaximal Exercise Testing in Cardiovascular Disease Patients. **Behavioral Sciences**, 10:104.

Mosier, J. E. (1989). Effect of Aging on Body Systems of the Dog. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, 19: 1–12.

Mugele, H., Plummer, A., Baritello, O., Towe, M., Brecht, P., Mayer, F. (2018). Accuracy of training recommendations based on a treadmill multistage incremental exercise test. **Plos One**, *13*:e0204696.

Ninomiya, H., Yamazaki, K., Inomata, T. (2013). Comparative anatomy of the vasculature of the dog (Canis familiaris) and domestic cat (Felis catus) paw pad **Open Journal of Veterinary Medicine**, 3:11-15.

Nascimento, C. M., Ingles, M., Salvador-Pascual, A., Cominetti, M. R., Gomez-Cabrera, M. C., Viña, J. (2019). Sarcopenia, frailty and their prevention by exercise. **Free radical biology and medicine**, 13: 42-49.

O'Leary, D. S., Rossi, N. F., Churchill, P. C. (1997). Substantial cardiac parasympathetic activity exists during heavy dynamic exercise in dogs. American **Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, 273:2135-2140.

Pagano, T. B., Wojcik, S., Costagliola, A., De Biase, D., Iovino, S., Iovane, V., Paciello, O. (2015). Age related skeletal muscle atrophy and upregulation of autophagy in dogs. **The Veterinary Journal**, 206:54-60.

Parkinson, S., Wills, A. P., Tabor, G., & Williams, J. M. (2018). Effect of water depth on muscle activity of dogs when walking on a water treadmill. **Comparative Exercise Physiology**, 14: 79-89

Pellegrino, F. J., Risso, A., Relling, A. E., Corrada, Y. (2019). Physical response of dogs supplemented with fish oil during a treadmill training programme**. Journal of animal physiology and animal nutrition**, 103: 653-660.

Pelosi, A., Rosenstein, D., Abood, S. K., Olivier, B. N. (2013). Cardiac effect of short-term experimental weight gain and loss in dogs. **Veterinary Record**,172:153.

Perez, R., García, M., Cabezas, I., Guzmán, R., Merino, V., Valenzuela, S., Gonzalez, C.(1997). Actividad física y cambios cardiovasculares y bioquímicos del caballo chileno a la competencia de rodeo. **Archivos de medicina veterinária**, 29:21–234.

Periard, J. D., Eijsvogels, T. M. H., Daanen, H. A. M. (2021). Exercise under heat stress: thermoregulation, hydration, performance implications and mitigation strategies. **Physiological Reviews**.

Piccione, G., Casella, S., Panzera, M., Giannetto, C., Fazio, F. (2012). Effect of moderate treadmill exercise on some physiological parameters in untrained Beagle dogs. **Experimental animals**, 61: 511-515.

Prioux, J., Ramonatxo, M., Hayot, M., Mucci, P.,Préfaut, C. (2000). Effect of ageing on the ventilatory response and lactate kinetics during incremental exercise in man. **European journal of applied physiology**, 81: 100-107.

Queiroz, R. W., Silva, V. L., Rocha, D. R., Costa, D. S., Turco, S. H. N., Silva, M. T. B., Palheta-Junior, R. C. (2018). Changes in cardiovascular performance, biochemistry, gastric motility and muscle temperature induced by acute exercise on a treadmill in healthy military dogs. **Journal of animal physiology and animal nutrition**, 102:122-130.

Radin, L., Belić, M., Bottegaro, N. B., Hrastić, H., Torti, M., Vučetić, V., Vrbanac, Z. (2015). Heart rate deflection point during incremental test in competitive agility border collies. **Veterinary research communications**, *39*: 137-142.

Redaelli, V., Tanzi, B., Luzi, F., Stefanello, D., Proverbio, D., Crosta, L., Di Giancamillo, M. (2014). Use of thermographic imaging in clinical diagnosis of small animal: preliminary notes. **Annali dell'Istituto superiore di sanità**, 50:140-146.

Repac, J., Alvarez, L. X., Lamb, K., Gillette, R. L. (2020). Evaluation of thermographic imaging in canine hindlimb muscles after 6 min of walking—A pilot study. **Frontiers in Veterinary Science**, 7: 224.

Restan, A. Z., Zacche, E., Da Silva, S. B., Cerqueira, J. A., Carfiofi, A. C., Queiroz-Neto, A., Ferraz, G. C. (2019). Lactate and glucose thresholds and heart rate

deflection points for Beagles during intense exercise. **American journal of veterinary research**, 80:284-293.

Restan, A. Z., Camacho, A. A., Cerqueira, J. A., Zacché, E., Kirnew, M. D., Loureiro, B. A., Ferraz, G. C. (2020). Effect of a lactate-guided conditioning program on heart rate variability obtained using 24-Holter electrocardiography in Beagle dogs**. Plos one**, 15:e0233264

Rikli, R. E., Jones, C. J. (1999). Development and validation of a functional fitness test for community-residing older adults. **Journal of aging and physical activity**, *7*: 129-161.

Rizzo, M., Arfuso, F., Alberghina, D., Giudice, E., Gianesella, M., Piccione, G. (2017). Monitoring changes in body surface temperature associated with treadmill exercise in dogs by use of infrared methodology. **Journal of Thermal Biology**, *69*:64-68.

Roberts, B.M., Lavin, K.M., Many, G.M., Thalacker-Mercer, A., Merritt, E.K., Bickel, C.S., Mayhew, D.L., Tuggle, S.C., Cross, J.M., Kosek, D.J., Petrella, J.K., Brown, C.J., Hunter, G.R., Windham, S.T., Allman, R.M., Bamman, M.M. (2018). Human neuromuscular aging: Sex differences revealed at the myocellular level. **Experimental gerontology**, 106:116–124.

Robertshaw, D. (1971). The evolution of thermoregulatory sweating in man and animals. **International journal of biometeorology**, 15: 263-267.

Rovira, S., Munoz, A., Benito, M. (2007). Fluid and electrolyte shifts during and after agility competitions in dogs. **Journal of veterinary medical science**, *69*:31-35.

Santos, I.; Rahal, S.; Santos, A.; Inamassu, L.; Rodrigues, M.; Tsunemi, M.; Sato, T. (2019). Whole-body vibration on leg muscles thermography and femoral resistive index of in adult healthy dogs. **Research in veterinary science**, *122*:118-123.

Sayed, R. K., de Leonardis, E. C., Guerrero-Martínez, J. A., Rahim, I., Mokhtar, D. M., Saleh, A. M., Acuña-Castroviejo, D. (2016). Identification of morphological markers of sarcopenia at early stage of aging in skeletal muscle of mice. **Experimental gerontology**, 83: 22-30.

Schuch, F.B., Vancampfort, D., Richards, J., Rosenbaum, S., Ward, P.B., Stubbs, B. (2016). Exercise as a treatment for depression: a meta-analysis adjusting for publication bias. **Journal of psychiatric research**, 77: 42-51.

Shull, S. A., Rich, S. K., Gillette, R. L., Manfredi, J. M. (2021). Heart Rate Changes Before, During, and After Treadmill Walking Exercise in Normal Dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, 8

Silva, F. O. C.; Macedo, D. V. (2011). Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Revista Brasileira de Cineantropomorfismo e Desempenho Humano,**13:320-328.

Simões, H. G., Campbell C. S., Baldissera V.,Denadai B. S., Kokubun E. (1998). Determinação do limiar anaeróbio por meio de dosagens glicêmicase lactacidêmicas em teste de pista para corredores**. Revista Paulista de Educação Fisica**,12:17- 30

Snijders, T., Verdijk, L. B., van Loon, L. J. (2009). The impact of sarcopenia and exercise training on skeletal muscle satellite cells. **Ageing research reviews**, 8: 328-338.

Soroko, M., Howell, K., Dudek, K., Wilk, I., Zastrzeżyńska, M., Janczarek, I. (2018). A pilot study in to the utility of dynamic infrared thermography for measuring body surface temperature changes during treadmill exercise in horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, *62*: 44-46.

Soroko, M., Górniak, W., Howell, K., Zielińska, P., Dudek, K., Eberhardt, M., Korczyński, M. (2021). Changes in Body Surface Temperature Associated with High-Speed Treadmill Exercise in Beagle Dogs Measured by Infrared Thermography. **Animals**, 11:2982

Speretta, G. F. F., Leite, R. D., de Oliveira Duarte, A. C. G. (2014). Obesity, inflammation and exercise: focus on TNF-alpha and IL-10/Obesidade, inflamacao e exercicio: foco sobre o TNF-alfa e IL-10. **Revista HUPE**, 13:61-70.

Spriet, L. L., Howlett, R. A. Heigenhauser, G. J. F. (2000) An enzymatic approach to lactate production in human skeletal muscle during exercise**. Medicine Science Sports Exercise**, 32:756–763.

Sutayatram, S., Buranakarl, C., Kijtawornrat, A., Soontornvipart, K., Boonpala, P., Pirintr, P. (2018). The effects of submaximal exercise training on cardiovascular functions and physical capacity in dogs with myxomatous mitral valve disease. **The Thai Journal of Veterinary Medicine**, 48, 433-441.

Sutherland-Smith, J., Hutchinson, D.,Freeman, L. M. (2019). Comparison of computed tomographic attenuation values for epaxial muscles in old and young dogs**. American journal of veterinary research**, 80:174-177.

Swanson, K. D. J., Harper, T. A. M., McMichael, M., Fries, R. C., Lascola, K. M., Chandler, C., Chinnadurai, S. K. (2019). Development of a perceived exertion scale for dogs using selected physiologic parameters. **Journal of Small Animal Practice**, *60*:247-253.

Swimmer, R. A., Rozanski, E. A. (2011). Evaluation of the 6-minute walk test in pet dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, 25: 405-406.

Takahashi, H., Alves, C. R., Stanford, K. I., Middelbeek, R. J., Nigro, P., Ryan, R. E.,Goodyear, L. J. (2019). TGF-β2 is an exercise-induced adipokine that regulates glucose and fatty acid metabolism. **Nature metabolism**, 1:291-303.

Teixeira-Neto, A. R.; Ferraz, G. D. C.; Moscardini, A. R. C.; Balsamão, G. M.; Souza, J. C. F.; Queiroz-Neto, A. D. (2008). Alterations in muscular enzymes of horses competing long-distance endurance rides under tropical climate. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 60:543-549.

Travain, T., Colombo, E. S., Heinzl, E., Bellucci, D., Previde, E. P., & Valsecchi, P. (2015). Hot dogs: Thermography in the assessment of stress in dogs (Canis familiaris)—A pilot study. **Journal of veterinary behavior**, 10: 17-23.

Travain, T., Colombo, E. S., Grandi, L. C., Heinzl, E., Pelosi, A., Previde, E. P., & Valsecchi, P. (2016). How good is this food? A study on dogs' emotional responses to a potentially pleasant event using infrared thermography. **Physiology & Behavior**, 159:80-87.

Uribe, J. H., Vitger, A. D., Ritz, C., Fredholm, M., Bjørnvad, C. R., Cirera, S. (2016). Physical training and weight loss in dogs lead to transcriptional changes in genes involved in the glucose-transport pathway in muscle and adipose tissues. **The Veterinary Journal**, 208:22-27.

Vainionpää, M., Tienhaara, E. P., Raekallio, M., Junnila, J., Snellman, M., Vainio, O. (2012). Thermographic Imaging of the Superficial Temperature in Racing Greyhounds before and after the Race. **The Scientific World Journal**.

Vitger, A. D., Stallknecht, B. M., Nielsen, D. H., & Bjornvad, C. R. (2016). Integration of a physical training program in a weight loss plan for overweight pet dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, 248, 174-182.

Wallis, L. J., Szabó, D., Erdélyi-Belle, B., Kubinyi, E. (2018). Demographic change across the life span of pet dogs and their impact on health status. **Frontiers in Veterinary Science**, *5*:200.

Wasserman, K., McIlroy, M. B. (1964). Detecting the threshold of anaerobic metabolism in cardiac patients during exercise. **The American journal of cardiology**, 14: 844-852.

Wasserman K, Whipp BJ, Koyl SN, Beaver WL (1973). Anaerobic threshold and respiratory gas exchange during exercise. **Journal of Applied Physiology**, 35:236–24.

Wasserman D. H, Connolly C. C., Pagliassoti M. J. (1991). Regulation of hepatic lactate balance during exercise. **Medicine Science Sports Exercise,** 2:, 912-9.

WHO, World Health Organization. (2010). Global recommendations on physical activity for health, 60.

Zhang, Y., Zou, L., Chen, S. T., Bae, J. H., Kim, D. Y., Liu, X., & Song, W. (2021). Effects and Moderators of Exercise on Sarcopenic Components in Sarcopenic Elderly: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Frontiers in medicine**, *8*:571.