



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

TESIS DOCTORAL

**ESTANDARIZACIÓN, EVALUACIÓN Y MEJORA DEL ENTRENAMIENTO
DEPORTIVO DE CANINOS EN CINTA TROTADORA MOTORIZADA
MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3
PRESERVANDO LA CALIDAD ESPERMÁTICA**

MÉD. VET. PELLEGRINO FRANCISCO JAVIER

2016



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de

DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS

**ESTANDARIZACIÓN, EVALUACIÓN Y MEJORA DEL ENTRENAMIENTO DEPORTIVO DE CANINOS EN
CINTA TROTADORA MOTORIZADA MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3
PRESERVANDO LA CALIDAD ESPERMÁTICA**

AUTOR: PELLEGRINO, Francisco Javier, Méd. Vet.

DIRECTORES: CORRADA, Yanina Alejandra, Dr. CsV.; ARIAS, Daniel Osvaldo, Dr. CsV.

CODIRECTOR: BLANCO, Paula Graciela, Dr. CsV.

LUGAR DE TRABAJO:

- **Laboratorio de Fisioterapia Veterinaria (LAFIVET), Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.**

MIEMBROS DEL JURADO:

- **RELLING, Alejandro Enrique, Dr. CsV.**
- **TRIGO, Pablo, Dr. CsV.**
- **WANKE, María Magdalena, Dr. CsV.**

AÑO 2016

PRÓLOGO

El presente trabajo de Tesis es el resultado de un extenso periodo de trabajo conjunto realizado con gran dedicación, esfuerzo y determinación, en un entorno de hermosa calidad humana, con la finalidad de contribuir al conocimiento sobre la fisiología del ejercicio en caninos, un área que se encuentra en pleno crecimiento a nivel mundial. Esta Tesis abarca estudios relacionados al uso de cinta trotadora motorizada para la planificación de programas de entrenamiento y pruebas de ejercicio, teniendo de eje central la inclusión de aceite de pescado en la dieta como suplemento nutricional para mejorar el rendimiento físico, sin descuidar la salud reproductiva del macho canino.

La escritura de la Tesis ha sido organizada en Capítulos con la intención de aportar mayor claridad y principalmente una lectura agradable para el lector. El Capítulo I comprende la introducción general al trabajo de Tesis. A continuación, cada Capítulo representa estudios independientes, pero íntimamente relacionados, en los cuales se detallan minuciosamente las técnicas y metodologías empleadas.

A partir de la amplia difusión y alcance de las diversas competencias deportivas en caninos, hace necesario profundizar en el conocimiento de los cambios fisiológicos relacionados al ejercicio. El autor confía plenamente en que este trabajo de Tesis ahondará en tales aspectos, siendo de gran ayuda y sentando bases para futuras investigaciones.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la Dra. Yanina Corrada, por darme la oportunidad de iniciarme en la investigación científica y, sobre todo, por guiarme con gran dedicación y calidad humana durante todo este largo camino de aprendizaje.

A la Dra. Analía Risso, compañera y amiga que estuvo día a día incondicionalmente, siendo una pieza más que importante en mi formación. Este trabajo también le pertenece.

Al Dr. Alejandro Relling de la Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP/The OSU, Estados Unidos, por su desinteresada y valiosa colaboración con el uso del programa estadístico SAS, utilizado en el análisis de los datos de todos los experimentos de esta Tesis. Asimismo, quiero agradecerle por haberme brindado sus conocimientos que contribuyeron en mi formación profesional.

Al Méd. Vet. Pablo Vaquero, por su gran calidez humana e invaluable ayuda en la realización de uno de los experimentos de esta Tesis.

A mi familia, papá, mamá, mis hermanas, mi hermano, por su apoyo incondicional, por alentarme a seguir y a nunca bajar los brazos.

A mi novia Jimena, por el amor, por la paciencia, por ser mi sostén y estar siempre a mi lado durante este largo recorrido.

A la Dra. Paula Blanco, por brindarme sus conocimientos que fueron de ayuda en la realización de esta Tesis.

Al Dr. Daniel Arias, por darme su apoyo cuando lo necesité.

A los becarios alumnos, Analía, Belén, Damián, Ivana, Julieta y Luis, por su colaboración en los experimentos durante mi trabajo.

A Guada, Jorge, Mateo y Patricio, por compartir sus conocimientos.

A los propietarios, Agustín, Analía, Carlos, Claudio, Daniel, Florencia, Julieta y Nicolás, por permitirme disponer de sus mascotas, por confiar en mí, por el compromiso y la constancia durante todo el estudio.

A todos mis amigos, por estar siempre.

A la Empresa Vitalcan®, por la provisión de alimento balanceado para los animales incluidos en este Trabajo de Tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca otorgada que me permitió llevar adelante este proyecto.

A la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, por permitirme desarrollar profesional y laboralmente.

A las mascotas, porque sin ellas nada de esto hubiera sido posible.

PUBLICACIONES PARCIALES DEL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

CAPÍTULO II

- Pellegrino FJ, Risso A, Corrada Y. Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la frecuencia cardíaca y temperatura rectal en perros sanos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora. *Analecta Veterinaria, Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional de La Plata (UNLP). Artículo de Investigación. 2016; 36(2): 6-10.*
- Pellegrino FJ, Risso A, Corrada Y. Mejora del rendimiento físico en caninos mediante la suplementación de la dieta con aceite de pescado. *Selecciones Veterinarias. Artículo Breve de Investigación. 2016; 23(2): 47-51.*
- Pellegrino FJ, Risso A, Corrada Y. Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la frecuencia cardíaca y temperatura rectal en perros sanos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora motorizada. *XXIV Jornadas Veterinarias en Pequeños Animales. Ciudad Autónoma de Buenos Aires (CABA), Buenos Aires, Argentina. Resumen. 19-20/04/2015.*

CAPÍTULO III

- Pellegrino FJ, Risso A, Corrada Y. Determinación de lactato sanguíneo en perros durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora. Jornadas de Ciencia y Técnica, FCV, UNLP. *Exposición oral*. Resumen. Publicado en *Analecta Veterinaria, Revista de la FCV, UNLP*. 2014; 34(1-2): 74.
- Pellegrino FJ, Risso A, Ponce L, Arizmendi A, Blanco PG, Arias D, Corrada Y. Determinación de lactato sanguíneo en perros durante el entrenamiento en cinta trotadora. XIII Congreso Nacional de la Asociación de Veterinarios Especializados en Animales de Compañía de Argentina (AVEACA). CABA, Buenos Aires, Argentina. Resumen. 19-20/09/2013.

CAPÍTULO IV

- Pellegrino FJ, Risso A, Massieri L, Corrada Y. Concentración de testosterona sérica en perros en entrenamiento suplementados con aceite de pescado. *Selecciones Veterinarias*. Editorial Inter-Médica. Fecha de aceptación: 10/06/2016. Artículo breve de investigación. *En prensa*.
- Pellegrino FJ, Risso A, Massieri L, Corrada Y. Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la concentración de testosterona sérica en perros durante un programa de entrenamiento. XXV Jornadas Veterinarias en Pequeños Animales. CABA, Buenos Aires, Argentina. Resumen. 15-16/05/2016.

- Pellegrino FJ, Risso A, Prío V, De Palma V, Corrada Y. Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre parámetros espermáticos en caninos en entrenamiento. 9nas Jornadas Internacionales de Veterinaria Práctica. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina. Resumen. 28-29/08/2015.
- Risso A, Pellegrino FJ, Relling AE, Pasquale I, Spaini E, Corrada Y. Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la concentración de testosterona sérica en caninos. IV Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), FCV, Universidad de Buenos Aires (UBA). Buenos Aires, Argentina. Resumen. 17/10/2014.
- Risso A, Pellegrino FJ, Martínez B, Relling AE, Corrada Y. Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre características del eyaculado en caninos. XIV Congreso Nacional de la AVEACA y XI Congreso de la Federación Iberoamericana de Asociaciones Veterinarias de Animales de Compañía (FIAVAC). CABA, Buenos Aires. Argentina. Resumen. 11-12/09/2014.

CAPÍTULO V

- Pellegrino FJ, Vaquero PG, Risso A, Pelosi J, Corrada Y. Efecto de ejercicio supramáximo sobre parámetros fisiológicos en perros durante un estudio a campo. VI Jornadas de Jóvenes Investigadores, FCV, UBA. Buenos Aires, Argentina. *Exposición oral*. Resumen. 10/06/2016.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN	1
SUMMARY	3
CAPÍTULO I	
<i>Introducción general</i>	5
CAPÍTULO II	
<i>Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre parámetros fisiológicos en caninos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora</i>	13
CAPÍTULO III	
<i>Uso de una prueba de ejercicio en cinta trotadora antes, durante y después de un programa de entrenamiento para evaluar mejoras en el rendimiento en caninos suplementados con aceite de pescado</i>	31
CAPÍTULO IV	
<i>Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre parámetros espermáticos y concentración de testosterona sérica en caninos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora</i>	42
CAPÍTULO V	
<i>Efecto de una prueba de ejercicio supramáximo sobre parámetros fisiológicos en caninos durante un estudio a campo</i>	58
CONCLUSIONES FINALES	68
PREMIOS A LA INVESTIGACIÓN	70

ABREVIATURAS

FC: frecuencia cardíaca

lpm: latidos por minuto

TR: temperatura rectal

CM: circunferencia de muslos

LS: lactato sanguíneo

PUFA: ácidos grasos poliinsaturados

n-3: omega 3

EPA: ácido eicosapentaenoico

DHA: ácido docosahexaenoico

rpm: revoluciones por minuto

SAS: sistema de análisis estadístico

LSM: medias de mínimos cuadrados

SEM: error estándar de la media

**ESTANDARIZACIÓN, EVALUACIÓN Y MEJORA DEL ENTRENAMIENTO DEPORTIVO DE CANINOS EN
CINTA TROTADORA MOTORIZADA MEDIANTE LA ADMINISTRACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3
PRESERVANDO LA CALIDAD ESPERMÁTICA**

Palabras clave: canino - entrenamiento - parámetros espermáticos - testosterona - nutrición - aceite
de pescado

RESUMEN

La popularidad de las competencias deportivas en caninos ha crecido notablemente. Surge así la necesidad de esclarecer parámetros fisiológicos que permitan evaluar con precisión la condición física. Asimismo, el uso de suplementos nutricionales ha despertado interés para mejorar el rendimiento físico. Aunque el principal objetivo es el éxito deportivo, es importante conservar la salud reproductiva. Por lo expuesto, los objetivos generales de esta Tesis fueron: evaluar el efecto de la suplementación con aceite de pescado en caninos durante un programa de entrenamiento, preservando la salud reproductiva; evaluar el uso de pruebas de ejercicios en cinta trotadora y a campo. En un diseño cruzado, ocho perros fueron asignados a dos grupos, control (CNT) y aceite de pescado (AP). Los animales realizaron un programa de entrenamiento en cinta trotadora durante 12 semanas donde se evaluaron variaciones en la frecuencia cardíaca (FC), temperatura rectal (TR) y circunferencia de muslos (CM). Asimismo, cada 4 semanas se realizó a cada animal una prueba de ejercicio en cinta trotadora, evaluación de parámetros espermáticos y concentración testosterona sérica. Para la prueba

de ejercicio a campo fueron incluidos 9 perros. Durante el transcurso del entrenamiento, el grupo AP tuvo menor FC y TR y mayor CM que el grupo CNT ($P<0,01$), presentó mejoras en parámetros espermáticos y menor concentración de testosterona ($P<0,01$). Además, durante la prueba de ejercicio en cinta trotadora el grupo AP tuvo menor FC y concentración de lactato sanguíneo (LS) ($P<0,01$). En la prueba de ejercicio a campo, la FC, TR y LS incrementaron significativamente finalizada la misma ($P<0,01$). El programa de entrenamiento produjo mejoras en el rendimiento físico. El uso de pruebas de ejercicio permite valorar la respuesta fisiológica al esfuerzo, siendo los parámetros evaluados precisos para ello. La suplementación con aceite de pescado en caninos puede resultar un complemento nutricional beneficioso para mejorar la respuesta al esfuerzo y el rendimiento en entrenamiento, sin afectar la salud reproductiva.

**STANDARDIZATION, ASSESSMENT AND IMPROVEMENT OF CANINE SPORTS TRAINING ON A
MOTORIZED TREADMILL THROUGH THE ADMINISTRATION OF OMEGA-3 FATTY ACIDS, WHILE
PRESERVING SPERM QUALITY**

Key words: canine - training - sperm parameters - testosterone - nutrition - fish oil

ABSTRACT

Dog sport competitions have become greatly popular. It is therefore necessary to identify physiological parameters. In addition, the use of dietary supplements has aroused interest for improving performance. Although the main purpose is to achieve sport success, it is important to preserve reproductive health. Therefore, the aims of this Thesis were: to assess the effect of fish oil supplementation in dogs during a training program, while preserving reproductive health; to assess the use of exercise testing on a treadmill and in the field. In a crossover design, eight dogs were assigned to two groups, namely, control (CNT) and fish oil (FO). All the animals followed a training program on a treadmill for 12 weeks, during which changes in heart rate (HR), rectal temperature (RT) and thigh circumference (TC) were registered. Additionally, every 4 weeks each animal underwent an exercise test on a treadmill, assessment of sperm parameters and of serum testosterone concentration. Field exercise testing involved 9 dogs. During training, the FO group showed a lower HR and RT and a higher TC ($P < 0,01$) than CNT group. Improved sperm parameters ($P < 0,01$) and lower testosterone concentrations ($P < 0,01$) were also found in FO. In addition, during the treadmill exercise

test the FO group showed a lower HR and blood lactate (BL) levels ($P < 0,01$). By the end of the field exercise testing, HR, RT and BL had significantly increased ($P < 0,01$). The training program resulted in improved physical performance. The use of exercise testing helps to evaluate the physiological response to effort, and the parameters assessed accurately evaluated this response. Fish oil supplementation in dogs could be a beneficial dietary supplement for improving the response to effort and performance during training, without affecting reproductive health.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

Los caninos domésticos constituyen una especie mamífera muy heterogénea (Helton, 2011). De allí que, la gran variedad de razas y consecuentemente el amplio espectro de habilidad atlética, ha permitido que se adapten a diferentes actividades de trabajo, caza y deporte (Palmer, 1994). En los últimos 30 años, las competencias deportivas en caninos se han expandido notablemente (Wakshlag y Shmalberg, 2014). Su creciente popularidad ha llevado a incrementar el número de reportes científicos intentando esclarecer los cambios fisiológicos sistémicos producidos por el ejercicio, así como también el tiempo necesario para alcanzar valores de reposo una vez finalizado el mismo (Rovira y col., 2007; Angle y col., 2009; Piccione y col., 2012). El desempeño atlético depende de factores genéticos, de entrenamiento y nutricionales. Si bien, la genética del animal es un factor determinante para lograr el éxito en el atleta canino, variables controlables como el entrenamiento y la nutrición pueden cumplir un importante rol (Wakshlag y Shmalberg, 2014). El entrenamiento consiste en la preparación física del deportista mediante la realización de ejercicios específicos durante un determinado periodo de tiempo, con el propósito de lograr el máximo rendimiento en una determinada disciplina deportiva. Además, con un correcto entrenamiento se puede prevenir la aparición futura de problemas relacionados con el ejercicio que podrían comprometer seriamente la vida deportiva del animal. Por otro lado, se ha extendido el uso de pruebas de ejercicio como complemento en los programas de entrenamiento, convirtiéndose en una herramienta valiosa para evaluar mejoras en el rendimiento y poder llevar un adecuado control de la condición física (Stuewe y

col., 2000; Stuewe y col., 2001). Muchos atletas caninos fallan en su desempeño debido a un entrenamiento incorrecto o ausente, lo cual sucede frecuentemente en perros que pasan gran parte del tiempo en espacios reducidos mientras que en determinados momentos del año concurren a diferentes actividades deportivas. Surge así la necesidad de estandarizar programas de entrenamiento y pruebas de ejercicio fácilmente aplicables en caninos que contribuyan a mejorar el rendimiento físico. Asimismo, propietarios, entrenadores y veterinarios necesitan de parámetros fisiológicos que permitan evaluar con precisión la condición física de los perros (Ferasin y Marcora, 2009).

Actualmente, el uso de cinta trotadora se muestra como una herramienta útil en la medicina del deporte canino (Ferasin y Marcora, 2007; Snigdha y col., 2014; Radin y col., 2015). Permite controlar las condiciones del ejercicio, particularmente velocidad y duración, facilitando la estandarización de pruebas de ejercicio (Ferasin y Marcora, 2009) y de programas de entrenamiento (Pellegrino y col., 2014). Por otro lado, ante la practicidad de poder ser usadas en un entorno cerrado, evita condiciones ambientales desfavorables que pueden afectar el transcurso del entrenamiento. Se ha reportado en perros, que un periodo de adaptación previo al uso de la cinta trotadora favorece la obtención de resultados confiables (Fanchon y Grandjean, 2009). De allí que, su aplicación se muestra con un lugar prometedor en el deporte canino para contribuir en la preparación física de los perros.

Los cambios fisiológicos observados durante el ejercicio varían de acuerdo al tipo, duración e intensidad del esfuerzo realizado, así como también del nivel de entrenamiento previo del animal (Piccione y col., 2012). El entrenamiento de resistencia, caracterizado por ejercicios de prolongada duración a intensidades submáximas de esfuerzo, depende principalmente del metabolismo aeróbico de las grasas como fuente principal de energía para la contracción muscular (de Godoy y col., 2014). Por el contrario, durante ejercicios de menor duración y mayor intensidad, se produce un cambio hacia las vías metabólicas anaeróbicas donde el metabolismo de los carbohidratos adquiere un rol preponderante para mantener el rendimiento (de Godoy y col., 2014). Así, la intensidad y duración del

esfuerzo realizado determinarán el metabolismo energético predominante durante el ejercicio (McArdle y col., 2004). Se ha postulado que, parámetros como la frecuencia cardíaca, temperatura rectal y concentración de lactato sanguíneo son indicadores confiables para evaluar la respuesta fisiológica al ejercicio en cinta trotadora en perros sin entrenamiento deportivo previo, como también para la planificación de rutinas de entrenamiento específicas en cinta trotadora (Piccione y col., 2012).

Si bien en las competencias deportivas el principal objetivo es que el perro resulte ganador, muchos propietarios desean que una vez logrado el éxito individual sea capaz de dejar descendencia. De allí la necesidad de mantener, aún con un entrenamiento físico regular, un estado reproductivo óptimo. Aunque el ejercicio se ha asociado con muchos beneficios sobre la salud (Blair y Morris, 2009), existen situaciones donde el estado reproductivo puede verse comprometido (Wise y col., 2011). En humanos, se ha reportado que el entrenamiento intensivo puede afectar negativamente la calidad del semen (Safarinejad y col., 2009). Hasta el momento, no se dispone de estudios similares en caninos.

Finalmente, en los últimos años también se han ido incrementando los estudios respecto a la nutrición ligada al deporte, en particular aquellos evaluando el uso de suplementos nutricionales y de dietas enriquecidas con el propósito de conseguir mejoras en el rendimiento deportivo canino (Iwashita y col., 2005; Dunlap y col., 2006; Huntingford y col., 2014; de Godoy y col., 2014). A los ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (PUFA n-3) se les atribuyen numerosas propiedades sobre la salud, siendo los ácidos eicosapentaenoico (EPA) y docosahexaenoico (DHA) los PUFA n-3 que presentan los efectos biológicos más beneficiosos (Cao y col., 2006; Stoeckel y col., 2011; Jones y col., 2013). El aceite de pescado es rico en PUFA n-3, siendo la principal fuente de EPA y DHA (Macartney y col., 2014). De allí que, la suplementación de la dieta con aceite de pescado ha despertado un gran interés en la medicina del deporte en diferentes especies (O'Connor y col., 2004; Buckley y col., 2009; Rodacki y col., 2012; Alizadeh y col., 2014). En humanos, la inclusión de aceite de pescado en la dieta como fuente de PUFA n-3 ha mostrado tener un efecto directo de estos ácidos grasos sobre el corazón, reduciendo la

frecuencia cardíaca en reposo (Dallongeville y col., 2003) y durante el ejercicio (Peoples y col., 2008). Asimismo, ha reducido el consumo de oxígeno durante el esfuerzo (Peoples y col., 2008; Kawabata y col., 2014), como también ha mejorado la condición corporal (Hill y col., 2007). Sin embargo, no existen aún estudios sobre su uso como suplemento en la dieta de caninos sometidos a un programa de entrenamiento físico.

Frente a la necesidad de contribuir al mejoramiento deportivo en caninos conservando la calidad reproductiva, los objetivos específicos del siguiente trabajo de Tesis fueron:

- Evaluar el efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre parámetros fisiológicos en caninos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora.
- Valorar el uso de una prueba de ejercicio en cinta trotadora antes, durante y después de un programa de entrenamiento para evaluar mejoras en el rendimiento en caninos suplementados con aceite de pescado.
- Analizar el efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre parámetros espermáticos y concentración de testosterona sérica en caninos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora.
- Evaluar el efecto de una prueba de ejercicio supramáximo sobre parámetros fisiológicos en caninos durante un estudio a campo.

Bibliografia

1. Alizadeh H, Bazgir B, Daryanoosh F, Koushki M, Sobhani V. Effect of aerobic exercise and fish oil supplements on plasma levels of inflammatory indexes in mice. *Med J Islam Repub Iran*. 2014; 28: 6.
2. Angle CT, Wakshlag JJ, Gillette RL, Stokol T, Geske S, Adkins TO, Gregor C. Hematologic, serum biochemical, and cortisol changes associated with anticipation of exercise and short duration high-intensity exercise in sled dogs. *Vet Clin Pathol*. 2009; 38(3): 370-374.
3. Blair SN, Morris JN. Healthy hearts-and the universal benefits of being physically active: physical activity and health. *Ann Epidemiol*. 2009; 19(4):253-256.
4. Buckley JD, Burgess S, Murphy KL, Howe PRC. DHA-rich fish oil lowers heart rate during submaximal exercise in elite Australian Rules footballers. *J Sci Med Sport*. 2009; 12(4): 503-507.
5. Cao J, Schwichtenberg KA, Hanson NQ, Tsai MY. Incorporation and clearance of omega-3 fatty acids in erythrocyte membranes and plasma phospholipids. *Clin Chem*. 2006; 52(12): 2265-2272.
6. Dallongeville J, Yarnell J, Ducimetière P, Arveiler D, Ferrières J, Montaye M, Luc G, Evans A, Bingham A, Hass B, Ruidavets JB, Amouyel P. Fish consumption is associated with lower heart rates. *Circulation*. 2003; 108(7): 820-825.
7. de Godoy MRC, Beloshapka AN, Carter RA, Fascetti AJ, Yu Z, McIntosh BJ, Swanson KS, Buff PR. Acute changes in blood metabolites and amino acid profile post-exercise in Foxhound dogs fed a high endurance formula. *JNS*. 2014; 3(33): 1-6.
8. Dunlap KL, Reynolds AJ, Duffy LK. Total antioxidant power in sled dogs supplemented with blueberries and the comparison of blood parameters associated with exercise. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2006; 143(4): 429-434.
9. Fanchon L, Grandjean D. Habituation of healthy dogs to treadmill trotting: Repeatability assessment of vertical ground reaction force. *Res Vet Sci*. 2009; 87(1): 135-139.

10. Ferasin L, Marcora S. A pilot study to assess the feasibility of a submaximal exercise test to measure individual response to cardiac medication in dogs with acquired heart failure. *Vet Res Commun.* 2007; 31(6): 725-737.
11. Ferasin L, Marcora S. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. *J Comp Physiol B.* 2009; 179(7): 839-845.
12. Helton WS. Performance constraints in strength events in dogs (*Canis lupus familiaris*). *Behav Process.* 2011; 86(1): 149-151.
13. Hill AM, Buckley JD, Murphy KJ, Howe PRC. Combining fish-oil supplements with regular aerobic exercise improves body composition and cardiovascular disease risk factors. *Am J Clin Nutr.* 2007; 85(5): 1267-1274.
14. Huntingford JL, Kirn BN, Cramer K, Mann S, Wakshlag JJ. Evaluation of a performance enhancing supplement in American Foxhounds during eventing. *J Nutr Sci.* 2014; 3(24): 1-6.
15. Iwashita S, Williams P, Jabbour K, Ueda T, Kobayashi H, Baier S, Flakoll PJ. Impact of glutamine supplementation on glucose homeostasis during and after exercise. *J Appl Physiol.* 2005; 99(5): 1858-1865.
16. Jones ML, Mark PJ, Mori TA, Keelan JA, Waddell BJ. Maternal dietary omega-3 fatty acid supplementation reduces placental oxidative stress and increases fetal and placental growth in the rat. *Biol Reprod.* 2013; 88(2): 37, 1-8.
17. Kawabata F, Neya M, Hamazaki K, Watanabe Y, Kobayashi S, Tsujia T. Supplementation with eicosapentaenoic acid-rich fish oil improves exercise economy and reduces exertion during submaximal steady-state exercise in normal healthy untrained men. *Biosci Biotech Bioch.* 2014; 78(12): 2081-2088.

18. Macartney MJ, Hingley L, Brown MA, Peoples GE, McLennan PL. Intrinsic heart rate recovery after dynamic exercise is improved with an increased omega-3 index in healthy males. *Br J Nutr.* 2014; 112(12): 1984-1992.
19. McArdle WD, Katch FI, Katch VL. Transferencia energética durante el ejercicio en el ser humano. En: *Fundamentos de fisiología del ejercicio.* 2da. Edición. Madrid, España, Ed McGraw-Hill, 2004, p. 127-146.
20. O'Connor CI, Lawrence AC, Lawrence KM, Janicki LK, Hayes W, Hayes S. The effect of dietary fish oil supplementation on exercising horses. *J Anim Sci.* 2004; 82(10): 2978-2984.
21. Palmer J. Breed groups. En: *The illustrated encyclopedia of dog breeds.* New Jersey: Wellfleet Press, 1994, p. 16-19.
22. Pellegrino FJ, Risso A, Relling AE, Blanco PG, Arias DO, Corrada Y. Effect of treadmill training on cardiac size, heart rate and muscle mass in healthy dogs. *J Vet Adv.* 2014; 4(9): 686-690.
23. Peoples GE, McLennan PL, Howe PR, Groeller H. Fish oil reduces heart rate and oxygen consumption during exercise. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008; 52(6): 540-547.
24. Piccione G, Casella S, Panzera M, Giannetto C, Fazio F. Effect of moderate treadmill exercise on some Physiological parameters in untrained beagle dogs. *Exp. Anim.* 2012; 61(5): 511-515.
25. Radin L, Belić M, Bottegaro NB, Hrastić H, Torti M, Vučetić V, Stanin D, Vrbanac Z. Heart rate deflection point during incremental test in competitive agility border collies. *Vet Res Commun.* 2015; 39(2): 137-142.
26. Rodacki CLN, Rodacki ALF, Pereira G, Naliwaiko K, Coelho I, Pequito D, Fernandes LC. Fish-oil supplementation enhances the effects of strength training in elderly women. *Am J Clin Nutr.* 2012; 95(2): 428-436.
27. Rovira S, Muñoz A, Benito M. Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. *Vet Clin Pathol.* 2007; 36(1): 30-35.

28. Safarinejad MR, Azma K, Kolahi AA. The effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus-pituitary-testis axis, and semen quality: a randomized controlled study. *J Endocrinol.* 2009; 200(3): 259-271.
29. Snigdha S, de Rivera C, Milgram NW, Cotman CW. Exercise enhances memory consolidation in the aging brain. *Front Aging Neurosci.* 2014; 6: 3.
30. Stoeckel K, Nielsen LH, Fuhrmann H, Bachmann L. Fatty acid patterns of dog erythrocyte membranes after feeding of a fish-oil based DHA-rich supplement with a base diet low in n-3 fatty acids versus a diet containing added n-3 fatty acids. *Acta Vet Scand.* 2011; 53: 57.
31. Stuewe SR, Gwartz PA, Agarwal N, Mallet RT. Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32(6): 903-913.
32. Stuewe SR, Gwartz PA, Mallet RT. Exercise training increases creatine kinase capacity in canine myocardium. *Med Sci Sports Exerc.* 2001; 33(1): 92-98.
33. Wakshlag J, Shmalberg J. Nutrition for working and service dogs. *Vet Clin Small Anim.* 2014; 44(4): 719-740.
34. Wise LA, Cramer DW, Hornstein MD, Ashby RK, Missmer SA. Physical activity and semen quality among men attending an infertility clinic. *Fertil Steril.* 2011; 95(3): 1025-1030.

CAPÍTULO II

EFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ACEITE DE PESCADO SOBRE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS EN CANINOS DURANTE UN PROGRAMA DE ENTRENAMIENTO EN CINTA TROTADORA

Introducción

En los últimos años, el creciente interés por las diferentes disciplinas deportivas en caninos ha llevado a incrementar el número de reportes científicos intentando establecer parámetros fisiológicos que permitan evaluar con precisión la respuesta fisiológica al esfuerzo (Rovira y col., 2007; Baltzer y col., 2012; Radin y col., 2015; Spoo y col., 2015). Entre los parámetros evaluados, la determinación de la frecuencia cardíaca (FC) es ampliamente utilizada para confirmar mejoras en el rendimiento físico. Se ha reportado en perros, reducciones en los valores de FC en reposo por efecto del entrenamiento (Wyatt y Mitchell, 1974; Stepien y col., 1998). Tales reducciones se consideran indicadoras de adaptación cardíaca en respuesta al entrenamiento aeróbico (Stuewe y col., 2000; Evangelista y col., 2005). La disminución de la FC en reposo puede deberse a cambios en la actividad autónoma del corazón, particularmente a una mejora de la actividad parasimpática (Billman y col., 2015) y es frecuentemente utilizada para confirmar que el entrenamiento ha sido eficaz (Billman y Kukielka, 2007). Asimismo, la temperatura corporal en caninos es un parámetro fisiológico que refleja la respuesta termorreguladora al esfuerzo y a estímulos ambientales (Angle y Gillete, 2010), pudiendo ser estimada de forma precisa por termometría rectal (Greer y col., 2007). Durante el ejercicio, la actividad muscular genera calor como un producto derivado de la producción y utilización de

adenosina trifosfato (McNicholl y col., 2016). En los perros, el calor producido por el ejercicio frecuentemente supera su capacidad para disiparlo, haciendo que su temperatura corporal se incremente (Piccione y col., 2012). Durante el transcurso de un programa de entrenamiento, reducciones graduales en los valores de temperatura rectal (TR) podrían indicar un mayor rendimiento al realizar el ejercicio.

Por otro lado, se ha demostrado en humanos a partir de biopsias musculares, que el entrenamiento aeróbico promueve el incremento de la masa muscular debido a la hipertrofia de las fibras musculares tipo I (Harber y col., 2012). Sin embargo, la realización de biopsias constituye un método invasivo, difícil de aplicar de manera frecuente en rutinas de entrenamiento. Existen métodos indirectos no invasivos que pueden resultar confiables y fáciles de realizar al momento de evaluar cambios en la masa muscular. Se ha documentado en perros, el uso de cinta métrica para la medición de circunferencia de muslos (CM) durante un programa de entrenamiento, con el objetivo de evaluar cambios en la masa muscular (Pellegrino y col., 2014). La utilización de puntos de referencia fácilmente palpables puede facilitar la medición y aumentar la precisión en las mismas (Smith y col., 2013; Pellegrino y col., 2014).

Así, la determinación de la FC, TR y CM podría resultar útil al momento de evaluar mejoras en el rendimiento aeróbico como también en determinar la eficacia del programa de entrenamiento.

Por otra parte, se ha estudiado en otras especies el efecto de la suplementación con aceite de pescado, como fuente de ácidos grasos poliinsaturados omega 3 (PUFA n-3), sobre parámetros fisiológicos durante el ejercicio con el objetivo de evaluar posibles mejoras en el rendimiento físico (O'Connor y col., 2004; Hill y col., 2007; Ninio y col., 2008; Alizadeh y col., 2014). Se ha propuesto que, la suplementación de la dieta con PUFA n-3 podría modular la FC a través de diferentes mecanismos, que incluyen cambios en la regulación autónoma del corazón (incremento de la actividad parasimpática y/o reducción de la actividad simpática) y/o reducciones en el ritmo del marcapasos cardíaco intrínseco (Billman y Harris, 2011). Por otro lado, O'Connor y col. (2004) observaron una tendencia de

disminución en el hematocrito durante el ejercicio en cinta trotadora en equinos suplementados con aceite de pescado. Si bien la viscosidad sanguínea no fue evaluada en este estudio, se postuló que la tendencia a tener menor hematocrito podría llevar a una disminución en la viscosidad sanguínea resultando en reducciones de la FC. Por su parte, en humanos se vio que la suplementación con aceite de pescado disminuye el consumo de oxígeno durante el ejercicio sin que esto provoque una baja en el rendimiento (Peoples y col., 2008; Kawabata y col., 2014). Al respecto, Kawabata y col. (2014) proponen que la incorporación del ácido eicosapentaenoico en la membrana del eritrocito es un factor clave para disminuir el consumo de oxígeno. Así, la suplementación con aceite de pescado podría mejorar el rendimiento aeróbico durante el entrenamiento. Hasta el momento, no se dispone de estudios sobre el tema en caninos.

Por lo expuesto, el objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre parámetros fisiológicos en caninos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora.

Materiales y métodos

Animales

Se incluyeron en este estudio 8 perros machos sanos sin entrenamiento deportivo previo, de razas puras: Weimaraner (n = 1), Labrador retriever (n = 2), Ovejero belga (n = 1), Bóxer (n = 1); y mestizos (n = 3), de 2 a 6 años de edad, de 20 a 35 kg de peso y 54 a 68 cm de altura hasta la cruz, provenientes de propietarios particulares. Para evaluar el estado de salud y descartar posibles enfermedades, se realizó a cada animal un examen clínico y ortopédico completo, análisis sanguíneo y bioquímico de rutina, electrocardiograma y radiografía de tórax. Antes de iniciar el estudio los perros tuvieron un periodo de adaptación de cuatro semanas al uso de la cinta trotadora canina motorizada (DobleXX®,

Argentina). El mismo consistió en sesiones de 10 minutos a una velocidad mínima de 2 km/h con una frecuencia de dos veces por semana (Pellegrino y col., 2014). Durante el periodo de adaptación y a lo largo de todo el estudio, los perros fueron alimentados con alimento balanceado comercial (Línea Balanced para perros adultos, Vitalcan®) y agua *ad libitum*. Las raciones diarias de alimento balanceado en kcal/día se controlaron de acuerdo a los requerimientos energéticos de mantenimiento (MER) según la siguiente fórmula: $MER = [130 \times \text{kg de peso metabólico (peso corporal}^{0,75})]$ (Kienzle, 2006). Los propietarios firmaron un consentimiento por escrito antes del experimento y estuvieron presentes a lo largo de todo el estudio. Este estudio fue aprobado por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL, Número T30-1-12) de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Diseño experimental y programa de entrenamiento

En un diseño experimental cruzado, los perros fueron asignados aleatoriamente a dos grupos:

- Grupo control (CNT, n = 7), recibieron diariamente la dieta base de alimento balanceado comercial durante 12 semanas.
- Grupo aceite de pescado (AP, n = 8): recibieron diariamente la dieta base de alimento balanceado comercial más 54 mg de aceite de pescado por kg de peso metabólico durante 12 semanas (Risso y col., 2014). La dosis de aceite de pescado fue administrada oralmente dentro de cápsulas de digestión gástrica. La composición de ácidos grasos en el aceite de pescado se detalla en la tabla II-1.

Tabla II-1. Composición de ácidos grasos (%) en el aceite de pescado.

Ácido graso	%
Mirístico (14:0)	5,8
Palmítico (16:0)	24
Palmitoleico (16:1)	10,1
Esteárico (18:0)	3,4
Oleico (18:1 n-9)	22,3
Vaccénico (18:1 n-7)	3,3
Linoléico (18:2 n-6)	2
α -Linolénico (18:3 n-3)	1,1
Eicosenoico (20:1 n-9)	2,5
Araquidónico (20:4 n-6)	1
Eicosatetraenoico (20:4 n-3)	0,8
Eicosapentaenoico (20:5 n-3)	7,6
Docosapentaenoico (22:5 n-3)	1,2
Docosaheptaenoico (22:6 n-3)	14,9
Σ SFA	33,2
Σ MUFA	38,2
Σ PUFA	28,6
Σ n-6	3
Σ n-3	25,6

SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: ácidos grasos

monoinsaturados; PUFA: ácidos grasos

poliinsaturados; n-6: omega 6; n-3: omega 3.

Durante las 12 semanas de cada periodo del diseño cruzado, todos los perros realizaron un programa de entrenamiento en cinta trotadora. El mismo consistió en sesiones de entrenamiento con una frecuencia de dos veces por semana. Cada sesión incluyó un total de 30 minutos de trote a velocidad constante de 8 km/h, con un grado de inclinación ascendente de la cinta trotadora del 7.5%. Concluida

la sesión, los perros tuvieron una fase de recuperación pasiva de 5 minutos durante la cual mantuvieron reposo en estación o decúbito esternal y se les permitió el consumo de agua. Todos los perros realizaron las sesiones de entrenamiento en los mismos días y horarios en cada semana durante las 12 semanas.

Los perros que en el primer periodo estuvieron en el grupo CNT, en el segundo periodo se incorporaron al grupo AP. Los perros que en el primer periodo estuvieron en el grupo AP, en el segundo periodo se incorporaron al grupo CNT. Se incluyeron 8 semanas de descanso entre periodos, donde los animales no recibieron entrenamiento ni suplementación.

En cada periodo, la primera sesión de entrenamiento para ambos grupos comenzó 48 horas luego de administrar al grupo AP la primera cápsula conteniendo la dosis de aceite de pescado.

El grupo CNT tuvo un n final de 7 debido a que uno de los perros, que en el primer periodo formó parte del grupo AP, no pudo incorporarse en el segundo periodo al grupo CNT por razones ajenas al estudio.

Parámetros evaluados

En cada sesión de entrenamiento se registró de cada animal:

- Frecuencia cardíaca. La FC en latidos por minuto (lpm) fue evaluada por auscultación del área cardíaca previa (FC pre) e inmediatamente posterior (FC post) a cada sesión de entrenamiento y a los 5 minutos (FC post 5') de finalizada la misma para evaluar la fase de recuperación. Antes de determinar la FC pre los perros mantuvieron reposo por 10 minutos.
- Temperatura rectal. La TR en °C fue medida mediante el uso de termómetro digital previa (TR pre) e inmediatamente posterior (TR post) a cada sesión de entrenamiento.
- Circunferencia de muslos. La CM en cm fue medida con cinta métrica en proximal del muslo entre el pliegue de la babilla y el isquion, con el animal en estación (Pellegrino y col., 2014).
- Peso corporal. El peso corporal en kg fue medido mediante el uso de balanza digital.

Análisis estadístico

Los datos se representan como medias de mínimos cuadrados (LSM) \pm el error estándar de las medias (SEM). Se utilizó un diseño cruzado con mediciones repetidas en el tiempo, donde cada animal fue considerado una unidad experimental. Los datos fueron analizados con el Proc Mixed de SAS (versión 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El modelo mixto lineal incluye el efecto aleatorio de los perros, el periodo del diseño cruzado, el efecto fijo del tiempo, tratamiento, interacción entre tiempo y tratamiento, e interacción entre periodo y tratamiento. La opción slice de SAS fue utilizada para detectar los puntos de tiempo cuando en la interacción entre tiempo y tratamiento existieran diferencias significativas. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

No se observaron diferencias significativas entre los valores de FC, TR y CM registrados en la primera sesión de entrenamiento correspondiente a cada periodo ($P > 0,1$; Tabla II-2).

Tabla II-2. Media \pm SEM de los valores de frecuencia cardíaca (lpm), temperatura rectal ($^{\circ}\text{C}$) y circunferencia de muslos (cm) en los 8 perros bajo estudio correspondientes a la primera sesión de entrenamiento de cada periodo del diseño cruzado.

	Primer periodo	Segundo periodo	SEM
	Media	Media	
Frecuencia cardíaca pre	100,57	98,89	5,55
Frecuencia cardíaca post	140,11	141,03	6,24
Frecuencia cardíaca post 5'	115,13	112,87	4,21
Temperatura rectal pre	38,70	38,44	0,10
Temperatura rectal post	39,34	39,33	0,20
Circunferencia de muslos	36,14	35,57	1,24

El grupo AP tuvo menores valores de FC pre y FC post que el grupo CNT ($P < 0,01$; Figura II-1), pero sin observarse efecto en la interacción tiempo por tratamiento ($P > 0,1$). En ambos grupos, la FC pre y la FC post fueron disminuyendo a lo largo de las 12 semanas del programa de entrenamiento ($P \leq 0,03$). No se observó efecto del tiempo, tratamiento o de la interacción entre tiempo y tratamiento en la FC post 5' ($P > 0,1$). En ambos grupos, los valores de FC post 5' fueron más bajos que los valores de FC post ($P < 0,01$), pero se mantuvieron elevados respecto a los valores de FC pre ($P < 0,01$).

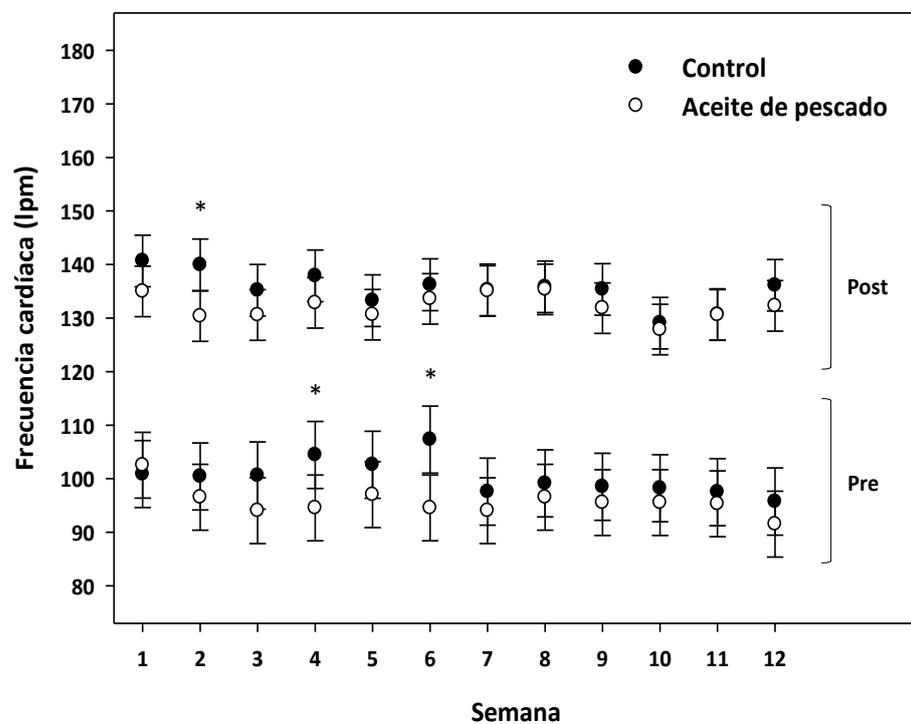


Figura II-1. Media \pm SEM de la frecuencia cardíaca (latidos por minuto) previa (FC pre) e inmediatamente posterior (FC post) a la sesión de entrenamiento en 8 perros pertenecientes a los grupos control (CNT, $n = 7$) y aceite de pescado (AP, $n = 8$) a lo largo de las 12 semanas de un programa de entrenamiento en cinta trotadora. Los valores de FC pre y FC post fueron disminuyendo en ambos grupos durante el transcurso del estudio (efecto del tiempo, $P \leq 0,03$), siendo menores en el grupo AP (efecto del tratamiento, $P < 0,01$). Interacción tiempo por tratamiento, $*P \leq 0,03$.

El grupo AP tuvo menores valores de TR post que el grupo CNT ($P < 0,01$; Figura II-2), pero sin observarse efecto del tiempo o de la interacción ente tiempo y tratamiento ($P > 0,1$).

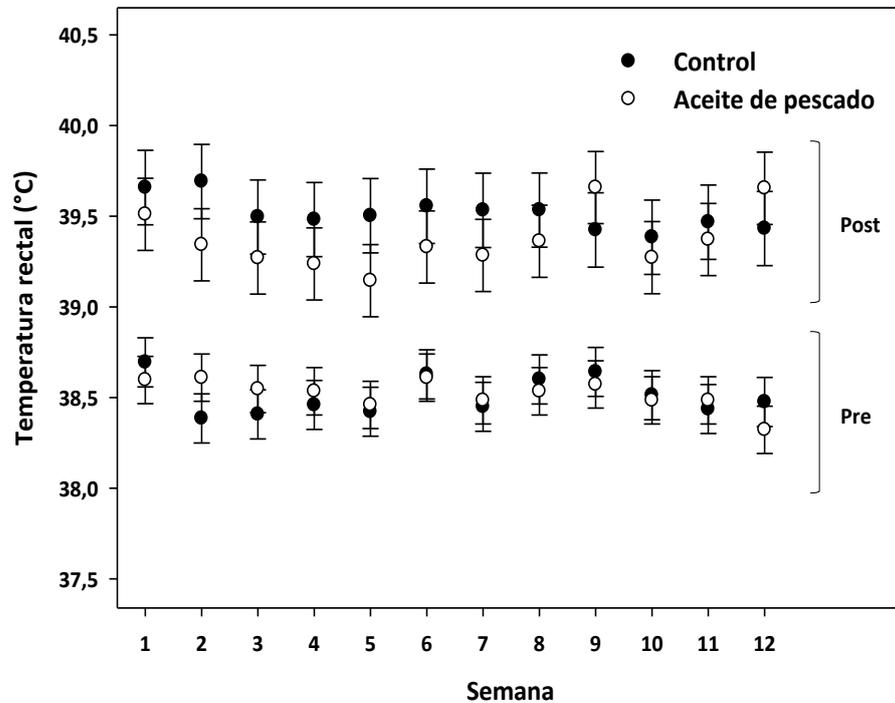


Figura II-2. Media \pm SEM de la temperatura rectal ($^{\circ}\text{C}$) previa (TR pre) e inmediatamente posterior (TR post) a la sesión de entrenamiento en 8 perros pertenecientes a los grupos control (CNT, $n = 7$) y aceite de pescado (AP, $n = 8$) a lo largo de las 12 semanas de un programa de entrenamiento en cinta trotadora. El grupo AP tuvo menor TR post que el grupo CNT (efecto del tratamiento, $P < 0,01$).

En ambos grupos, la CM fue incrementando a lo largo de las 12 semanas del programa de entrenamiento ($P < 0,01$), siendo mayor dicho incremento en el grupo AP ($P < 0,01$; Figura II-3).

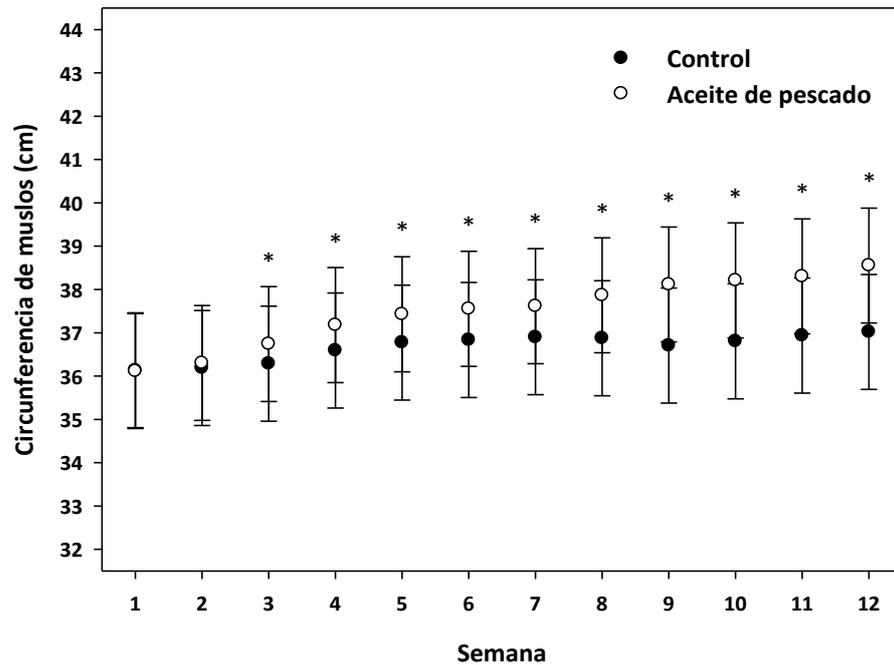


Figura II-3. Media \pm SEM de la circunferencia de muslos (cm) en 8 perros pertenecientes a los grupos control (CNT, n = 7) y aceite de pescado (AP, n = 8) a lo largo de las 12 semanas de un programa de entrenamiento en cinta trotadora. La circunferencia de muslos fue incrementando en ambos grupos durante el transcurso del estudio (efecto del tiempo, $P < 0,01$), siendo mayor en el grupo AP (interacción tiempo por tratamiento, $*P < 0,01$).

No se observó efecto del tiempo, tratamiento o de la interacción entre tiempo y tratamiento en el peso corporal ($P > 0,1$). La media \pm SEM del peso corporal en el grupo CNT fue $26,60 \pm 2,20$ kg y en el grupo AP fue $26,73 \pm 2,20$ kg.

Discusión y conclusión

A lo largo de las 12 semanas del programa de entrenamiento los perros en el grupo AP tuvieron menores valores de FC pre y FC post que en el grupo CNT. La FC pre evaluada antes de iniciar cada sesión de entrenamiento se puede corresponder con valores de FC en reposo, ya que la misma se determinó luego de que los perros mantuvieran un reposo de 10 minutos. Por su parte, la FC post evaluada inmediatamente al finalizar cada sesión, fue considerada en este estudio un reflejo de la FC que los perros tenían durante la sesión de entrenamiento. Estudios previos en humanos, han mostrado que la suplementación con aceite de pescado reduce la FC en reposo, siendo más marcada dicha reducción cuando la duración de la suplementación fue de 12 semanas o más (Mozaffarian y col., 2005). Estudios en humanos (Buckley y col., 2009) y equinos (O'Connor y col., 2004), reportaron reducciones en los valores de FC durante una prueba de ejercicio en cinta trotadora luego de 5 y 9 semanas de suplementación con aceite de pescado, respectivamente. Para la FC en reposo, no observaron diferencias entre grupos tratados y controles. Esto puede deberse a los tiempos de suplementación utilizados en aquellos estudios, que siendo menores a los del presente trabajo podrían condicionar la respuesta biológica en las especies estudiadas. Asimismo, Buckley y col. (2009) han propuesto que la FC evaluada en su estudio no fue una verdadera FC en reposo, pudiendo estar condicionada por la potencial ansiedad de los sujetos a iniciar la prueba de ejercicio. En el presente trabajo, es muy probable que este efecto haya sido contrarrestado por el periodo de reposo previo a la determinación de la FC pre. Otra posible explicación a las diferencias en los resultados obtenidos es que, si bien en aquellos estudios se realizó un programa de entrenamiento controlado durante el periodo de suplementación, el efecto sobre la FC solo se evaluó al final del mismo mediante una prueba de ejercicio y no durante el transcurso del programa de entrenamiento como se hizo en este trabajo. Por lo tanto, los resultados obtenidos sugieren que el aceite de pescado, como fuente de PUFA n-3, tuvo un efecto modulador sobre la FC en reposo y durante el ejercicio en cinta trotadora. Sin embargo,

la ausencia de diferencias significativas entre grupos en la interacción tiempo por tratamiento para la FC pre y FC post, impide afirmar la existencia de una asociación entre la suplementación con aceite de pescado y mejoras en el rendimiento en entrenamiento. No obstante, a partir de las diferencias encontradas entre grupos se podría inferir sobre un posible efecto sinérgico entre el aceite de pescado y el ejercicio que resulta en menores valores de FC en el grupo suplementado, como ha sido propuesto en humanos (Macartney y col., 2014). Igualmente, el hecho que los valores de FC pre y FC post evaluados en cada sesión de entrenamiento fueran disminuyendo en todos los perros durante el transcurso del estudio, sugiere una adecuada adaptación cardíaca en respuesta a el programa de entrenamiento implementado. En cuanto a los valores de FC post 5' registrados durante el transcurso del estudio, se pudo observar en ambos grupos una marcada reducción respecto a los valores de FC obtenidos inmediatamente finalizada cada sesión de entrenamiento. Sin embargo, permanecieron elevados no retornando a valores basales, lo que indica necesariamente una fase de recuperación más amplia. Por consiguiente y en línea con los estudios realizados en humanos (O'Connor y col., 2004) y equinos (Buckley y col., 2009), la suplementación con aceite de pescado no se asoció con mejoras en la FC durante la fase de recuperación.

Los valores más bajos de FC post en el grupo AP se correspondieron con menores valores de TR post a lo largo de las 12 semanas de entrenamiento, sugiriendo una mejor respuesta termorreguladora y un mayor rendimiento en el grupo suplementado. Estudios previos en perros han reportado incrementos en los valores de TR luego del ejercicio, ya sea en pruebas a campo o en cinta trotadora (Ilkiw y col., 1989; Matwichuk y col., 1999; Steiss y col., 2004; Ferasin y Marcora, 2009; Piccione y col., 2012). Sin embargo, existe poca información sobre los cambios en la termorregulación a lo largo de un programa de entrenamiento. Se ha propuesto que la hipertermia producida durante un trabajo muscular prolongado ejerce un efecto adverso sobre el metabolismo muscular, que podría condicionar el rendimiento (Kozłowski y col., 1985). En el presente estudio, los perros en el grupo AP tuvieron menores valores de TR post que el grupo CNT. Esto podría indicar un menor trabajo muscular para el

mismo esfuerzo que resulta en una menor producción de calor por parte de los músculos en actividad y, consecuentemente, en un mayor rendimiento.

Por otra parte, también se pudo apreciar un marcado incremento en la CM en todos los perros durante el transcurso del programa de entrenamiento, siendo mayor dicho incremento en el grupo AP. Estos resultados sugieren un aumento de la masa muscular probablemente debido a la hipertrofia de las fibras musculares inducida por el entrenamiento en cinta trotadora. Asimismo, se ha propuesto que los PUFA n-3 tienen propiedades anabólicas y anti catabólicas intrínsecas en el músculo esquelético (Jeromson y col., 2015). Smith y col. (2011) reportaron que la suplementación de PUFA n-3, principalmente de los ácidos eicosapentaenoico y docosahexaenoico, estimula la síntesis proteica en humanos adultos. Por otro lado, un estudio realizado en equinos mostró incrementos en la concentración de PUFA n-3 dentro del músculo esquelético luego de 90 días de suplementación con aceite de pescado y algas (Hess y col., 2012). Si bien, en el presente trabajo no se evaluó la composición de ácidos grasos en el tejido muscular, probablemente haya existido un incremento en la concentración de PUFA n-3 como consecuencia de la suplementación con aceite de pescado. A partir de los resultados obtenidos y considerando el potencial efecto anabólico de los PUFA n-3 sobre el tejido muscular, podría ser una posible explicación a las diferencias encontradas entre grupos.

En conclusión, la suplementación de la dieta con aceite de pescado en caninos podría resultar un complemento nutricional beneficioso para mejorar el rendimiento en entrenamiento. La determinación de la FC, TR y CM se muestran como parámetros fisiológicos confiables para evaluar mejoras en el rendimiento físico. Finalmente, considerando los resultados obtenidos se puede confirmar una mejora en el rendimiento en todos los perros bajo estudio y, por lo tanto, la eficacia del programa de entrenamiento.

Bibliografia

1. Alizadeh H, Bazgir B, Daryanoosh F, Koushki M, Sobhani V. Effect of aerobic exercise and fish oil supplements on plasma levels of inflammatory indexes in mice. *Med J Islam Repub Iran*. 2014; 28: 6.
2. Angle TC, Gillette RL. Telemetric measurement of body core temperature in exercising unconditioned Labrador retrievers. *Can J Vet Res*. 2011; 75(2): 157-9.
3. Baltzer WI, Firshman AM, Stang B, Warnock JJ, Gorman E, McKenzie EC. The effect of agility exercise on eicosanoid excretion, oxidant status, and plasma lactate in dogs. *BMC Vet Res*. 2012; 8: 249.
4. Billman GE, Kukielka M. Effect of endurance exercise training on heart rate onset and heart rate recovery responses to submaximal exercise in animals susceptible to ventricular fibrillation. *J Appl Physiol*. 2007; 102(1): 231-240.
5. Billman GE, Harris WS. Effect of dietary omega-3 fatty acids on the heart rate and the heart rate variability responses to myocardial ischemia or submaximal exercise. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2011; 300(6): H2288–2299.
6. Billman GE, Cagnoli KL, Csepe T, Li N, Wright P, Mohler, PJ, Fedorov, VV. Exercise training-induced bradycardia: evidence for enhanced parasympathetic regulation without changes in intrinsic sinoatrial node function. *J Appl Physiol*. 2015; 118(11): 1344-1355.
7. Buckley JD, Burgess S, Murphy KL, Howe PRC. DHA-rich fish oil lowers heart rate during submaximal exercise in elite Australian Rules footballers. *J Sci Med Sport*. 2009; 12(4): 503-507.
8. Evangelista FS, Martuchi SED, Negrão CE, Brum PC. Loss of resting bradycardia with detraining is associated with intrinsic heart rate changes. *Braz Med Biol Res*. 2005; 38(7): 1141-1146.

9. Ferasin L, Marcora S. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. *J Comp Physiol B*. 2009; 179(7): 839-845.
10. Greer RJ, Cohn LA, Dodam JR, Wagner-Mann CC, Mann FA. Comparison of three methods of temperature measurement in hypothermic, euthermic, and hyperthermic dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2007; 230(12): 1841-1848.
11. Harber MP, Konopka AR, Udem MK, Hinkley JM, Minchev K, Kaminsky LA, Trappe TA, Trappe S. Aerobic exercise training induces skeletal muscle hypertrophy and age-dependent adaptations in myofiber function in young and older men. *J Appl Physiol*. 2012(9); 113: 1495-1504.
12. Hess TM, Rexford JK, Hansen DK, Harris M, Schaueremann N, Ross T, Engle TE, Allen KG, Mulligan CM. Effects of two different dietary sources of long chain omega-3, highly unsaturated fatty acids on incorporation into the plasma, red blood cell, and skeletal muscle in horses. *J Anim Sci*. 2012; 90(9): 3023-3031.
13. Hill AM, Buckley JD, Murphy KJ, Howe PRC. Combining fish-oil supplements with regular aerobic exercise improves body composition and cardiovascular disease risk factors. *Am J Clin Nutr*. 2007; 85(5): 1267-1274.
14. Ilkiw JE, Davis PE, Church DB. Hematologic, biochemical, blood-gas, and acid-base values in greyhounds before and after exercise. *Am J Vet Res*. 1989; 50(4):583-596.
15. Jeromson S, Gallagher LJ, Galloway SDR, Hamilton DL. Omega-3 fatty acids and skeletal muscle health. *Mar drugs*. 2015; 13(11): 6977-7004.
16. Kawabata F, Neya M, Hamazaki K, Watanabe Y, Kobayashi S, Tsujia T. Supplementation with eicosapentaenoic acid-rich fish oil improves exercise economy and reduces exertion during submaximal steady-state exercise in normal healthy untrained men. *Biosci Biotech Bioch*. 2014; 78(12): 2081-2088.

17. Kienzle E. Energy. In: National Research Council (NRC), editor. Nutrient requirements of dogs and cats. Washington, DC: National Academy Press; 2006. p. 29–48.
18. Kozłowski S, Brzezińska Z, Kruk B, Kaciuba-Uściłko H, Greenleaf JE, Nazar K. Exercise hyperthermia as a factor limiting physical performance: temperature effect on muscle metabolism. *J Appl Physiol.* 1985; 59(3): 766-773.
19. Macartney MJ, Hingley L, Brown MA, Peoples GE, McLennan PL. Intrinsic heart rate recovery after dynamic exercise is improved with an increased omega-3 index in healthy males. *Br J Nutr.* 2014; 112(12): 1984-1992.
20. Matwichuk CL, Taylor S, Shmon CL, Kass PH, Shelton GD. Changes in rectal temperature and hematologic, biochemical, blood gas, and acid-base values in healthy Labrador Retrievers before and after strenuous exercise. *Am J Vet Res.* 1999. 60(1): 88-92.
21. McNicholl J, Howarth GS, Hazel SJ. Influence of the environment on the body temperature of racing Greyhounds. *Front Vet Sci.* 2016; 3: 53.
22. Mozaffarian D, Geelen A, Brouwer IA, Geleijnse JM, Zock PL, Katan MB. Effect of fish oil on heart rate in humans: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Circulation.* 2005; 112(13): 1945-1952.
23. Ninio DM, Hill AM, Howe PR, Buckley JD, Saint DA. Docosahexaenoic acid-rich fish oil improves heart rate variability and heart rate responses to exercise in overweight adults. *Br J Nutr.* 2008; 100(5): 1097-1103.
24. O'Connor CI, Lawrence LM, Lawrence ACSt, Janicki KM, Warren LK, Hayes S. The effect of dietary fish oil supplementation on exercising horses. *J Anim Sci.* 2004; 82(10): 2978-2984.
25. Pellegrino FJ, Risso A, Relling AE, Blanco PG, Arias DO, Corrada Y. Effect of treadmill training on cardiac size, heart rate and muscle mass in healthy dogs. *J Vet Adv.* 2014; 4(9): 686-690.
26. Peoples GE, McLennan PL, Howe PR, Groeller H. Fish oil reduces heart rate and oxygen consumption during exercise. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2008; 52(6): 540-547.

27. Piccione G, Casella S, Panzera M, Giannetto C, Fazio F. Effect of moderate treadmill exercise on some physiological parameters in untrained beagle dogs. *Exp Anim.* 2012; 61(5): 511-515.
28. Radin L, Belić M, Bottegaro NB, Hrastić H, Torti M, Vučetić V, Stanin D, Vrbanac Z. Heart rate deflection point during incremental test in competitive agility border collies. *Vet Res Commun.* 2015; 39(2): 137-142.
29. Risso A, Pellegrino FJ, Relling AE, Pasquale I, Spaini E, Corrada Y. Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la concentración de testosterona sérica en caninos. IV Jornadas Internacionales del Instituto de Investigación y Tecnología en Reproducción Animal (INITRA), 2014, Resumen, p. 22, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, CABA, Buenos Aires, Argentina.
30. Rovira S, Muñoz A, Benito M. Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. *Vet Clin Pathol.* 2007; 36(1): 30-35.
31. Smith GI, Atherton P, Reeds DN, Mohammed BS, Debbie Rankin, Rennie MJ, Mittendorfer B. Dietary omega-3 fatty acid supplementation increases the rate of muscle protein synthesis in older adults: a randomized controlled trial. *Am J Clin Nutr.* 2011; 93(2): 402-412.
32. Smith TJ, Baltzer WI, Jelinski SE, Salinardi BJ. Inter- and intratester reliability of anthropometric assessment of limb circumference in Labrador retrievers. *Vet Surg.* 2013; 42(3): 316-321.
33. Spoo JW, Zoran DL, Downey RL, Bischoff K, Wakshlag JJ. Serum biochemical, blood gas and antioxidant status in search and rescue dogs before and after simulated fieldwork. *Vet J.* 2015; 206(1): 47-53.
34. Steiss J, Ahmad HA, Cooper P, Ledford C. Physiologic responses in healthy Labrador retrievers during field trial training and competition. *J Vet Intern Med.* 2004; 18(2): 147-151.
35. Stepien RL, Hinchcliff KW, Constable PD, Olson J. Effect of endurance training on cardiac morphology in Alaskan sled dogs. *J Appl Physiol.* 1998; 85(4): 1368-1375.

36. Stuewe SR, Gwartz, PA, Agarwal N, Mallet RT. Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32(2): 903-913.
37. Wyatt HL, Mitchell JH. Influences of physical training on the heart of dogs. *Circ Res.* 1974; 35(6): 883-889.

CAPÍTULO III

USO DE UNA PRUEBA DE EJERCICIO EN CINTA TROTADORA ANTES, DURANTE Y DESPUÉS DE UN PROGRAMA DE ENTRENAMIENTO PARA EVALUAR MEJORAS EN EL RENDIMIENTO EN CANINOS SUPLEMENTADOS CON ACEITE DE PESCADO

Introducción

En caninos, las pruebas de ejercicio en cinta trotadora han sido ampliamente utilizadas para evaluar la respuesta al esfuerzo en diferentes parámetros fisiológicos (Kittleson y col., 1997; Ferasin y Marcora, 2007; Radin y col., 2015). Este tipo de pruebas consiste en el incremento en velocidad e inclinación de la cinta trotadora por etapas, generalmente de tiempo constante, y un intervalo entre ellas para la toma de muestras (Ferasin y Marcora, 2009). Entre los parámetros fisiológicos evaluados, la determinación de la frecuencia cardíaca (FC) y de la concentración de lactato sanguíneo (LS) se muestran como indicadores confiables al momento de valorar el esfuerzo realizado. También, se ha documentado en perros, el uso de pruebas de ejercicio en cinta trotadora antes y después de un programa de entrenamiento para evaluar el grado de adaptación cardíaca (Stuewe y col., 2000). En dicho estudio, los valores de FC en reposo y durante la prueba de ejercicio disminuyeron luego del programa de entrenamiento, indicando mejoras en el rendimiento. Por su parte, la concentración de LS durante el ejercicio se considera un índice de actividad glucolítica en el músculo esquelético, que depende de la intensidad del esfuerzo y del nivel de entrenamiento previo del animal (Rovira y col., 2007; Baltzer y col., 2012). Asimismo, existen mecanismos que intervienen en el transporte de lactato

desde el músculo a la circulación sanguínea como también de su degradación a nivel intracelular y hepático, condicionando finalmente la concentración de LS durante el esfuerzo (Ghosh, 2004; Ferasin y Marcora, 2009). En la medicina del deporte, suele emplearse el término umbral de lactato para indicar el punto de transición entre el metabolismo aeróbico y anaeróbico y ha sido establecido en humanos con una concentración de LS de 4 mmol/L (Ghosh, 2004). Ejercicios a intensidades por encima del umbral demandarán un mayor consumo de hidratos de carbono y una mayor contribución del metabolismo anaeróbico en la obtención de energía, siendo la producción de lactato muscular proporcional a la intensidad del esfuerzo. Por el contrario, ejercicios a intensidades por debajo del umbral tienen mayor contribución del metabolismo aeróbico, dependiendo principalmente de carbohidratos y grasas para la producción energética (Rovira y col., 2007). El entrenamiento de resistencia lleva a adaptaciones metabólicas que disminuyen la acumulación de LS (Ghosh, 2004), de forma que ante un mismo esfuerzo su concentración en sangre será menor. Así, la intensidad y duración del ejercicio determinan el tipo de metabolismo energético predominante, condicionando la producción muscular de lactato y consecuentemente, su concentración sanguínea. Por lo tanto, conociendo la concentración de LS durante el ejercicio se puede indicar el tipo de esfuerzo realizado y, conjuntamente con la FC, predecir mejoras en el rendimiento aeróbico.

Por otro lado, las pruebas de ejercicio en cinta trotadora también han sido utilizadas para evaluar mejoras en el rendimiento por efecto de la suplementación con aceite de pescado en respuesta a programas de entrenamiento aeróbico, tanto en equinos (O'Connor y col., 2004) como en humanos (Ninio y col., 2008; Buckley y col., 2009). Entre los principales parámetros evaluados se encuentran la FC y el LS y los resultados obtenidos son controversiales. En humanos, observaron reducciones en los valores de FC en el grupo suplementado durante una prueba de ejercicio en cinta trotadora, pero sin encontrar diferencias entre grupos para la FC previo al inicio de la prueba o luego de concluida la misma (Buckley y col., 2009). Por su parte, Ninio y col. (2008) reportaron reducciones de la FC tanto en reposo como durante la prueba de ejercicio en cinta trotadora en los sujetos suplementados con aceite de

pescado. En otro estudio, Kawabata y col. (2014) no hallaron diferencias entre grupos durante una prueba de ejercicio para los valores de FC y LS antes y después de 8 semanas de suplementación. Por el contrario, otros trabajos en humanos reportaron reducciones de la FC en el grupo suplementado al realizar la prueba de ejercicio (Peoples y col., 2008; Macartney y col., 2014). Finalmente, en equinos se vieron reducciones en los valores de FC en el grupo suplementado con aceite de pescado durante una prueba de ejercicio en cinta trotadora, pero sin encontrar diferencias entre grupos sobre los valores de FC antes o después de la prueba, así como tampoco se vio afectada la concentración de LS por el tratamiento (O'Connor y col., 2004). Hasta el momento, no se dispone de estudios sobre el uso pruebas de ejercicio en cinta trotadora para evaluar mejoras en el rendimiento en perros en entrenamiento suplementados con aceite de pescado. Por lo expuesto, el objetivo del presente estudio fue valorar en perros suplementados con aceite de pescado, el uso de una prueba de ejercicio antes, durante y después de un programa de entrenamiento para evaluar mejoras en el rendimiento mediante la determinación de FC y LS.

Materiales y métodos

Animales y prueba de ejercicio en cinta trotadora

En las semanas -1, 4 y 12 de cada periodo del diseño cruzado, los perros de los grupos control (CNT) y aceite de pescado (AP) correspondientes al capítulo II fueron sometidos a una prueba de ejercicio en cinta trotadora motorizada. En la semana -1, la prueba de ejercicio fue realizada 48 horas antes de administrar la primera cápsula conteniendo la dosis de aceite de pescado. Considerando que la sesión de entrenamiento descrita en el capítulo 1 tuvo una frecuencia de dos veces por semana, la prueba de ejercicio en las semanas 4 y 12 fue realizada a cada perro a las 48 horas de concluir la segunda sesión de entrenamiento correspondiente a dichas semanas.

La prueba de ejercicio incluyó un total de 10 etapas con una duración de 3 minutos cada una. Las etapas 1 a 5 fueron de velocidad creciente y sin pendiente, mientras que las etapas 6 a 10 fueron de velocidad fija y pendiente creciente. El tiempo para alcanzar la velocidad esperada fue de 10 segundos. Un minuto de pausa entre etapas fue necesario para la toma de muestras. Concluida la prueba, los perros tuvieron una fase de recuperación pasiva de 10 minutos durante la cual mantuvieron reposo en estación o decúbito esternal y se les permitió el consumo de agua. Tabla III-1.

Tabla III-1. Prueba de ejercicio en cinta trotadora.

ETAPA	VELOCIDAD (km/h)	PENDIENTE (%)
1	2	0
2	4	0
3	6	0
4	8	0
5	10	0
6	10	2,5
7	10	3,75
8	10	5
9	10	6,25
10	10	7,5

Toma de Muestras

Previo al inicio de la prueba de ejercicio (pre), en el intervalo entre cada etapa, inmediatamente finalizada la etapa 10 y a los 5 (post 5´) y 10 (post 10´) minutos de la fase de recuperación, se realizaron los siguientes muestreos:

- Frecuencia cardíaca. La FC en latidos por minutos (lpm) fue determinada por auscultación del área cardíaca. Antes de determinar la FC pre los perros mantuvieron reposo por 10 minutos.

- Lactato sanguíneo. La concentración de LS en mmol/L fue determinada por método enzimático colorimétrico mediante el analizador de lactato StatStrip X-Press de Nova Biomedical (Bonaventura y col., 2015). En cada muestreo se tomaron 50 μ l de sangre entera por venopunción de las venas safenas de los miembros posteriores.

Análisis estadístico

Los datos se representan como medias de mínimos cuadrados (LSM) \pm el error estándar de las medias (SEM). Se utilizó un diseño cruzado con mediciones repetidas en el tiempo, donde cada animal fue considerado una unidad experimental. Los datos fueron analizados con el Proc Mixed de SAS (versión 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El modelo mixto lineal incluye el efecto aleatorio de los perros, el periodo del diseño cruzado, el efecto fijo del tiempo (semanas -1 vs 4 vs 12), tratamiento (CNT vs AP), interacción entre tiempo y tratamiento, e interacción entre periodo y tratamiento. La opción slice de SAS fue utilizada para detectar los puntos de tiempo cuando en la interacción entre tiempo y tratamiento existieran diferencias significativas. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

En la semana -1, no hubo diferencias entre grupos para los valores de FC y LS previo al inicio de la prueba de ejercicio, durante el transcurso de la misma o en la fase de recuperación ($P > 0,1$).

En ambos grupos, la FC incrementó progresivamente desde los valores de reposo conforme al incremento de la carga de trabajo en cada etapa durante la prueba de ejercicio ($P < 0,01$). El retorno de la FC a valores de reposo una vez finalizada la prueba de ejercicio se produjo en ambos grupos a los 10 minutos de la fase de recuperación.

No hubo diferencias entre grupos para los valores de FC pre, FC post 5' y FC post 10' en las semanas 4 y 12 ($P > 0,1$). El grupo AP tuvo menores valores de FC y LS que el grupo CNT durante el transcurso de la prueba de ejercicio en las semanas 4 y 12 ($P \leq 0,03$; Figuras III-1 y 2).

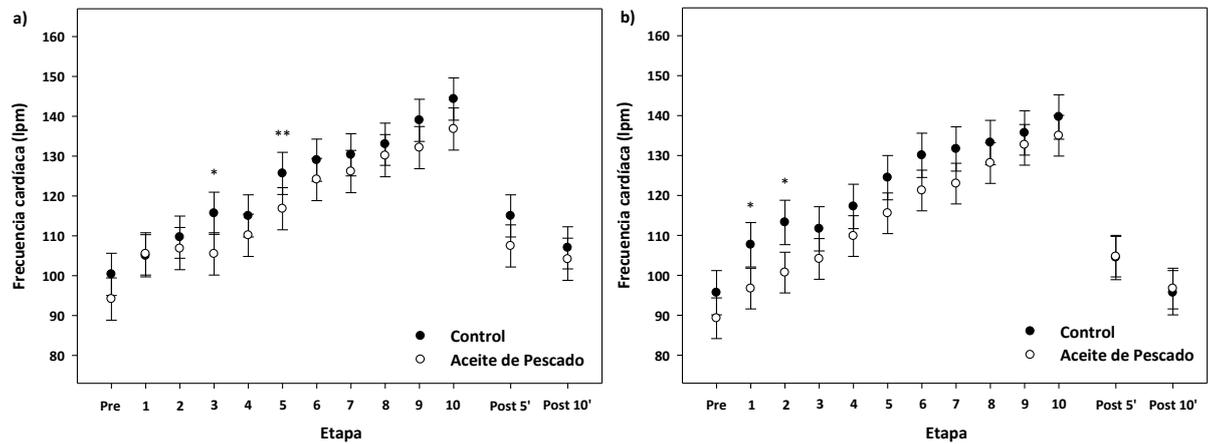


Figura III-1. Media \pm SEM de la frecuencia cardíaca (latidos por minuto) evaluada antes (Pre), durante y a los 5 (Post 5') y 10 (Post 10') minutos de finalizada la prueba de ejercicio en cinta trotadora correspondiente a las semanas 4 (a) y 12 (b) de un programa de entrenamiento de 12 semanas de duración, en 8 perros pertenecientes a los grupos control (CNT) y aceite de pescado (AP). El grupo AP tuvo menores valores de FC durante el transcurso de la prueba de ejercicio ($P < 0,01$). Interacción tiempo por tratamiento, * $P \leq 0,05$, ** $P = 0,09$.

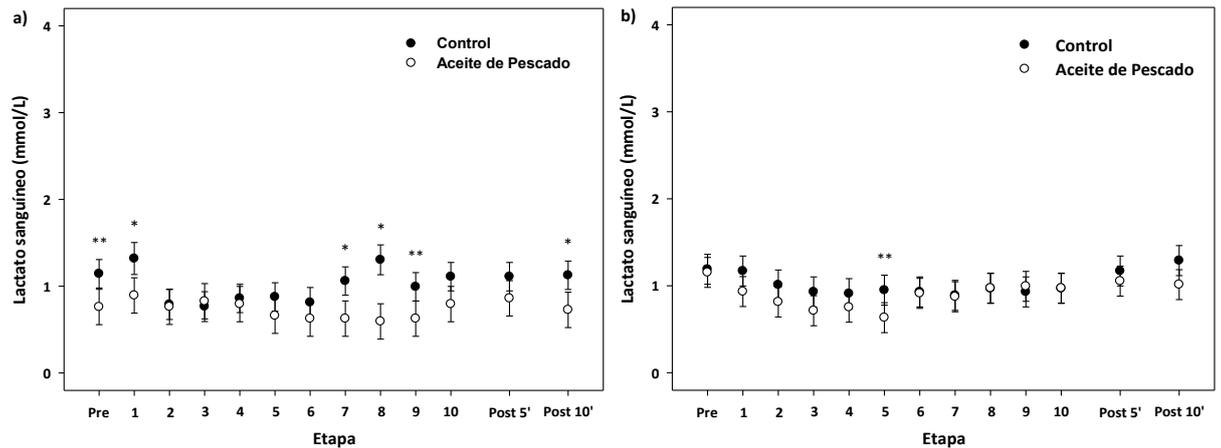


Figura III-2. Media \pm SEM de la concentración de lactato sanguíneo (mmol/L) evaluada antes (Pre), durante y a los 5 (Post 5') y 10 (Post 10') minutos de finalizada la prueba de ejercicio en cinta trotadora correspondiente a las semanas 4 (a) y 12 (b) de un programa de entrenamiento de 12 semanas de duración, en 8 perros pertenecientes a los grupos control (CNT) y aceite de pescado (AP). El grupo AP tuvo menores valores de LS durante el transcurso de la prueba de ejercicio ($P < 0,01$). Interacción tiempo por tratamiento, * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,08$.

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio podrían indicar un mayor rendimiento en los perros suplementados con aceite de pescado al realizar la prueba de ejercicio en cinta trotadora. Esto sugiere una mayor respuesta adaptativa al programa de entrenamiento en el grupo AP. Sin embargo, los valores más bajos de FC observados durante el transcurso de la prueba de ejercicio en el grupo AP no fueron asociados con menores valores de FC en reposo o durante la fase de recuperación. Por otro lado, el retorno de la FC en ambos grupos a valores de reposo cumplidos los 10 minutos de finalizada la prueba de ejercicio, sugiere que el tiempo propuesto para la fase de recuperación fue el adecuado. Los resultados de este estudio se encuentran en línea con lo observado en otras especies (O'Connor y

col., 2004; Ninio y col., 2008; Buckley y col., 2009). En humanos, Buckley y col., (2009) evaluaron mediante el uso de una prueba de ejercicio en cinta trotadora antes y después de un programa de entrenamiento aeróbico, mejoras en el rendimiento luego de 5 semanas de suplementación con aceite de pescado. En dicho estudio, el grupo suplementado tuvo menores valores de FC durante la prueba de ejercicio en la semana 5. Sin embargo, y en concordancia con el presente trabajo, este mayor rendimiento durante la prueba no fue asociado con menores valores de FC en reposo o durante la recuperación. En otro estudio, sujetos con sobrepeso suplementados durante 12 semanas con aceite de pescado y sometidos a un entrenamiento aeróbico regular, mostraron reducciones en los valores de FC en reposo y durante el transcurso de una prueba de ejercicio en cinta trotadora realizada en las semanas 6 y 12 (Ninio y col., 2008). En línea con el presente trabajo, los resultados obtenidos en aquel estudio muestran que la suplementación con aceite de pescado actúa atenuando la respuesta de la FC al ejercicio (Ninio y col., 2008). Por su parte, un estudio en equinos avaluó el efecto de 9 semanas suplementación con aceite de pescado en respuesta a un programa de entrenamiento, mediante el uso de una prueba de ejercicio en cinta trotadora al final del periodo de suplementación (O'Connor y col., 2004), siendo los resultados obtenidos similares a los del presente trabajo. Así, los valores de FC durante la prueba de ejercicio fueron menores en los caballos suplementados, pero sin observarse diferencias entre grupos para la FC en reposo ni durante la fase de recuperación (O'Connor y col., 2004). Asimismo, en aquel estudio también evaluaron la concentración de LS durante la prueba de ejercicio sin encontrar diferencias entre grupos ya sea en reposo, durante el transcurso de la prueba o en la fase de recuperación. Contrariamente, en el presente estudio se observaron diferencias entre grupos en la concentración de LS previo al inicio de la prueba de ejercicio correspondiente a la semana 4, como también durante la fase de recuperación, siendo menor en el grupo AP. Además, se pudo apreciar que la media de los valores de LS durante el transcurso de la prueba en las semanas 4 y 12 fue menor en el grupo suplementado con aceite de pescado. En ninguno de los perros bajo estudio se produjo un incremento abrupto en la concentración de LS durante la prueba, no habiendo superado

en ninguna etapa la concentración de 4 mmol/L. A partir de ello y del equilibrio observado en la concentración de LS a través de la prueba, se puede inferir en que el metabolismo energético predominante durante la misma fue el aeróbico.

En conclusión, la prueba de ejercicio en cinta trotadora puede resultar una herramienta útil al momento de valorar la respuesta al esfuerzo y evaluar mejoras en el rendimiento en perros sometidos a un programa de entrenamiento. Al respecto, la determinación de la FC y de la concentración de LS se muestran como parámetros confiables para ello. Finalmente, los resultados obtenidos sugieren que la suplementación con aceite de pescado disminuye los valores de FC y LS en respuesta al ejercicio en cinta trotadora, lo que podría asociarse a mejoras en rendimiento físico.

Bibliografia

1. Baltzer WI, Firshman AM, Stang B, Warnock JJ, Gorman E, McKenzie EC. The effect of agility exercise on eicosanoid excretion, oxidant status, and plasma lactate in dogs. *BMC Vet Res.* 2012; 8: 249.
2. Bonaventura JM, Sharpe K, Knight E, Fuller KL, Tanner RK, Gore CJ. Reliability and Accuracy of Six Hand-Held Blood Lactate Analysers. *J Sports Sci Med.* 2015, 14(1): 20 -214.
3. Buckley JD, Burgess S, Murphy KJ, Howe PRC. DHA-rich fish oil lowers heart rate during submaximal exercise in elite Australian Rules footballers. *J Sci Med Sport.* 2009; 12(4): 503-507.
4. Ferasin L, Marcora S. A pilot study to assess the feasibility of a submaximal exercise test to measure individual response to cardiac medication in dogs with acquired heart failure. *Vet Res Commun.* 2007; 31(6): 725-737.
5. Ferasin L, Marcora S. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. *J Comp Physiol B.* 2009; 179(7): 839-845.
6. Ghosh AK. Anaerobic threshold: its concept and role in Endurance sport. *Malays J Med Sci.* 2004; 11(1): 24-36.
7. Kawabata F, Neya M, Hamazaki K, Watanabe Y, Kobayashi S, Tsujia T. Supplementation with eicosapentaenoic acid-rich fish oil improves exercise economy and reduces exertion during submaximal steady-state exercise in normal healthy untrained men. *Biosci Biotech Bioch.* 2014; 78(12): 2081-2088.
8. Kittleson MD, Johnson LE, Pion PD. Submaximal exercise testing using lactate threshold and venous oxygen tension as endpoints in normal dogs and in dogs with heart failure. *J Vet Intern Med.* 1996; 10(1): 21-27.

9. Macartney MJ, Hingley L, Brown MA, Peoples GE, McLennan PL. Intrinsic heart rate recovery after dynamic exercise is improved with an increased omega-3 index in healthy males. *Br J Nutr.* 112(12): 1984-1992.
10. Ninio DM, Hill AM, Howe PR, Buckley JD, Saint DA. Docosahexaenoic acid-rich fish oil improves heart rate variability and heart rate responses to exercise in overweight adults. *Br J Nutr.* 2008; 100(5): 1097-1103.
11. O'Connor CI, Lawrence AC, Lawrence KM, Janicki LK, Hayes W, Hayes S. The effect of dietary fish oil supplementation on exercising horses. *J Anim Sci.* 2004; 82(10): 2978-2984.
12. Peoples GE, McLennan PL. Dietary fish oil reduces skeletal muscle oxygen consumption, provides fatigue resistance and improves contractile recovery in the rat in vivo hindlimb. *Br J Nutr.* 2010; 104(12): 1771-1779.
13. Piccione G, Casella S, Panzera M, Giannetto C, Fazio F. Effect of moderate treadmill exercise on some Physiological parameters in untrained beagle dogs. *Exp. Anim.* 2012; 61(5), 511-515.
14. Radin L, Belić M, Bottegaro NB, Hrastić H, Torti M, Vučetić V, Stanin D, Vrbanac Z. Heart rate deflection point during incremental test in competitive agility border collies. *Vet Res Commun.* 2015; 39(2): 137-142.
15. Rovira S, Muñoz A, Benito M. Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. *Vet Clin Pathol.* 2007; 36(1): 30-35.
16. Stuewe SR, Gwartz, PA, Agarwal N, Mallet RT. Exercise training enhances glycolytic and oxidative enzymes in canine ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32(6): 903-913.

CAPÍTULO IV

EFFECTO DE LA SUPLEMENTACIÓN CON ACEITE DE PESCADO SOBRE PARÁMETROS ESPERMÁTICOS Y CONCENTRACIÓN DE TESTOSTERONA SÉRICA EN CANINOS DURANTE UN PROGRAMA DE ENTRENAMIENTO EN CINTA TROTADORA

Introducción

Los espermatozoides de las especies mamíferas se caracterizan por contener en sus membranas celulares una alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), los cuales juegan un rol fundamental durante el proceso de fertilización (Wathes y col., 2007; Esmaeili y col., 2015). Las proporciones de los diferentes PUFA en los tejidos del tracto reproductivo reflejan las cantidades consumidas en la dieta (Wathes y col., 2007). El incremento en la proporción de PUFA omega 3 (n-3) en la membrana espermática puede mejorar la calidad del semen (Rooke y col., 2001). De allí que, se han incrementado los estudios sobre la suplementación de la dieta con aceite de pescado, como fuente de PUFA n-3, con el objetivo de evaluar mejoras en la calidad espermática y otros parámetros reproductivos en varias especies (Blesbois y col., 2004; Samadian y col., 2010; Yeste y col., 2011; Risso y col., 2016). Sin embargo, los resultados obtenidos al respecto son controversiales. En cerdos, se reportaron mejoras en la calidad espermática luego de 6 semanas de suplementación, que incluyeron el incremento en los porcentajes de espermatozoides con motilidad progresiva y con morfología normal (Rooke y col., 2001). Un estudio en pavos, reportó un porcentaje mayor de espermatozoides vivos en las aves suplementadas con aceite de pescado (Zaniboni y col., 2006). Asimismo, en ovinos se

han observado incrementos en la concentración de espermatozoides, como también en los porcentajes de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva (Samadian y col., 2010). Por el contrario, otros estudios realizados en cerdos no hallaron efecto de la suplementación sobre la calidad del semen (Castellano y col., 2010; Yeste y col., 2011). Adicionalmente, Castellano y col. (2011) observaron reducciones en la concentración de testosterona testicular en cerdos suplementados con aceite de pescado, pero sin que esto afectara la calidad espermática. Por su parte en caninos, un reciente estudio reportó incrementos en parámetros espermáticos como el porcentaje de espermatozoides móviles y el recuento total de espermatozoides por eyaculado en animales suplementados (Risso y col., 2016). En este estudio, la suplementación con aceite de pescado disminuyó la concentración de testosterona sérica.

Por otra parte, se sabe que la actividad física puede tener efectos beneficiosos sobre la salud (Blair y Morris, 2009). Sin embargo, en humanos se ha descrito que el entrenamiento físico puede afectar negativamente la calidad reproductiva (Safarinejad y col., 2009; Hajizadeh Maleki y Tartibian, 2015). Safarinejad y col. (2009) reportaron que el ejercicio de alta intensidad en cinta trotadora disminuyó los porcentajes de espermatozoides móviles y con morfología normal, el recuento total de espermatozoides y la concentración de testosterona sérica. Por el contrario, Hejazi y Hosseini (2012) reportaron incrementos en los niveles de testosterona sérica luego de 14 semanas de entrenamiento. Finalmente, en otro estudio no observaron variaciones en la concentración de testosterona sérica en reposo luego de un programa de entrenamiento de moderada intensidad y baja frecuencia (Hiruntrakul y col., 2010). Hasta el momento, no se dispone de estudios que evalúen el efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre parámetros espermáticos y concentración de testosterona sérica en caninos sometidos a un entrenamiento físico. Por lo expuesto, el objetivo del presente estudio fue analizar el efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre parámetros espermáticos y concentración de testosterona sérica en caninos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora.

Materiales y métodos

Animales

Todos los perros fueron sanos al examen clínico y reproductivo. Para facilitar el manejo de los animales y la correcta toma de muestras, cuatro semanas antes de iniciar el estudio y con una frecuencia de dos veces por semana, los perros fueron entrenados para la recolección de semen mediante estimulación manual (Kutzler, 2005).

En las semanas -1, 4, 8 y 12 de cada periodo del diseño cruzado, los perros de los grupos control (CNT) y aceite de pescado (AP) correspondientes al capítulo II fueron sometidos a la recolección de semen para la evaluación de parámetros espermáticos y de muestras sanguíneas para la determinación de testosterona sérica.

Evaluación de semen

La recolección de semen se realizó en un ambiente confortable con el animal en estación. Todo el equipamiento utilizado para la recolección de las muestras de semen, así como también para su posterior evaluación, estuvo atemperado a 37°C. De cada muestra de semen se obtuvo solamente la segunda fracción (espermática), discontinuando la recolección al momento de la eyaculación de la tercera fracción (prostática). Inmediatamente después de la recolección, el volumen de la fracción espermática (mL) fue determinado usando un tubo graduado y los parámetros espermáticos evaluados fueron los siguientes:

- Porcentaje de espermatozoides móviles. El porcentaje de espermatozoides móviles fue determinado a partir de una gota de semen correspondiente a la fracción espermática. La misma fue colocada entre portaobjeto y cubreobjeto sobre platina térmica y evaluada mediante el uso de microscopio óptico a 400X en un total de 10 campos.

- Porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva. La motilidad progresiva fue definida como un movimiento rápido, progresivo, hacia adelante (Freshman, 2002). El porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva fue determinado a partir de una gota de semen correspondiente a la fracción espermática. La misma fue colocada entre portaobjeto y cubreobjeto sobre platina térmica y evaluada mediante el uso de microscopio óptico a 400X en un total de 10 campos.
- Vigor. El vigor fue definido como la calidad e intensidad del movimiento espermático. Fue clasificado en una escala de 0 a 5, donde 0 representa espermatozoides sin movimiento y 5 espermatozoides con movimiento progresivo muy rápido. El vigor fue determinado a partir de una gota de semen correspondiente a la fracción espermática, que fue colocada entre portaobjeto y cubreobjeto sobre platina térmica y evaluada mediante el uso de microscopio óptico a 400X en un total de 10 campos.
- Porcentaje de espermatozoides vivos. El porcentaje de espermatozoides vivos fue determinado mediante tinción supravital de eosina-nigrosina a microscopía óptica de 1000X (Díaz, 2015).
- Porcentaje de espermatozoides con morfología normal. El porcentaje de espermatozoides con morfología normal fue determinado mediante tinción de Rosa de Bengala a microscopía óptica de 1000X (Mota Filho y col., 2014).
- Concentración de espermatozoides por mL. La concentración de espermatozoides por mL fue determinada mediante el uso de cámara de Neubauer a microscopía óptica de 400X de acuerdo a lo descrito por Freshman (2002).
- Recuento total de espermatozoides. El recuento total de espermatozoides se obtuvo a partir de multiplicar la concentración de espermatozoides por el volumen de la fracción espermática obtenida en cada muestra (Freshman, 2002).

Las evaluaciones se realizaron por duplicado, contando en cada una de ellas 200 células espermáticas.

Determinación de testosterona sérica

Para las extracciones de muestras sanguíneas los perros tuvieron un ayuno previo de al menos 8 horas. En cada muestreo, se tomaron de cada animal 7 muestras de sangre por venopunción periférica a los 0, 20, 40, 60, 80, 100 y 120 minutos, comenzando a las 09:00 AM. Esta ventana de 120 minutos fue utilizada para atenuar los cambios en la concentración de testosterona sérica y el promedio de los valores obtenidos de cada perro durante dicha ventana fue utilizado para el análisis estadístico. Para reducir el daño potencial en las sucesivas extracciones de sangre, fueron utilizadas ambas venas cefálicas y safenas. Luego de la extracción la sangre fue centrifugada a 3500 rpm durante 5 minutos y el suero fue recolectado y almacenado a -18°C hasta su posterior análisis en el laboratorio. La concentración de testosterona sérica (nmol/L) se determinó mediante electroquimioluminiscencia (Elecsys®, Cobas®, West Sussex, Inglaterra).

Análisis estadístico

Los datos se representan como medias de mínimos cuadrados (LSM) \pm el error estándar de las medias (SEM). Se utilizó un diseño cruzado con mediciones repetidas en el tiempo, donde cada animal fue considerado una unidad experimental. Los datos fueron analizados con el Proc Mixed de SAS (versión 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El modelo mixto lineal incluye el efecto aleatorio de los perros, el periodo del diseño cruzado, el efecto fijo del tiempo (semanas -1 vs 4 vs 8 vs 12), tratamiento (CNT vs AP), interacción entre tiempo y tratamiento, e interacción entre periodo y tratamiento. La opción slice de SAS fue utilizada para detectar los puntos de tiempo cuando en la interacción entre tiempo y tratamiento existieran diferencias significativas. Un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Evaluación del semen

No se observó efecto del entrenamiento sobre los parámetros espermáticos evaluados en reposo ($P>0,1$). No hubo diferencias entre grupos en el volumen de la fracción espermática ($P>0,1$). El % de espermatozoides móviles y con motilidad progresiva fue mayor en el grupo AP en comparación con el grupo CNT en las semanas 8 y 12 (interacción tiempo por tratamiento, $P\leq 0,05$; Figura IV-1 y 2).

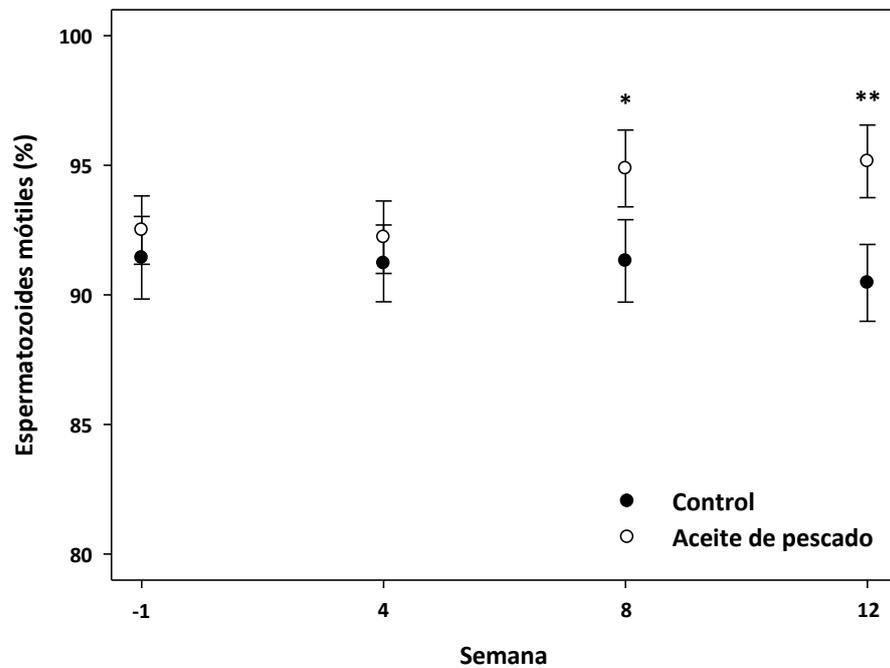


Figura IV-1. Media \pm SEM del porcentaje de espermatozoides móviles (%) en 8 perros pertenecientes a los grupos control (CNT, n = 7) y aceite de pescado (AP, n = 8) a lo largo de las 12 semanas de un programa de entrenamiento en cinta trotadora. Interacción tiempo por tratamiento, * $P=0,05$, ** $P<0,01$.

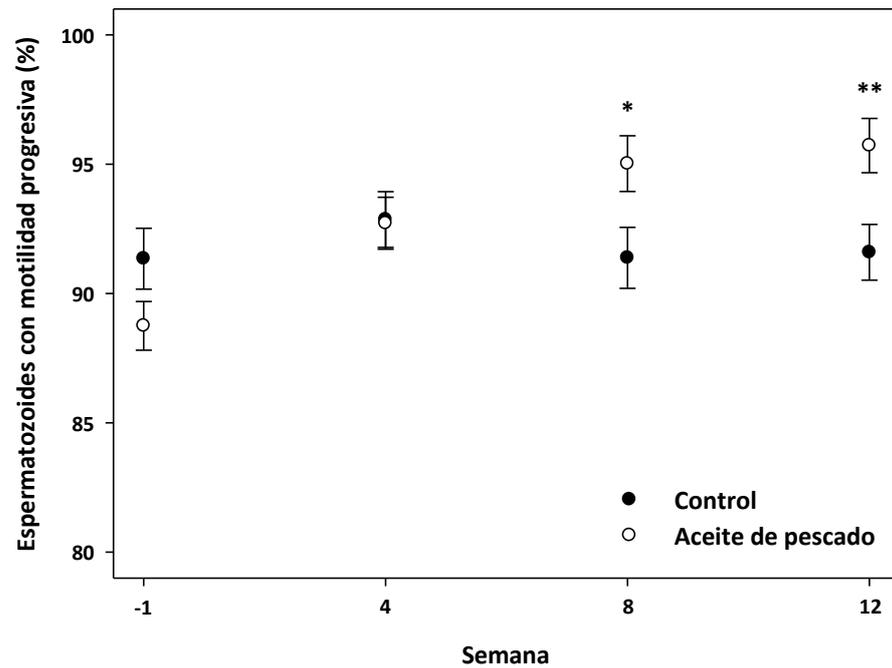


Figura IV-2. Media \pm SEM del porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (%) en 8 perros pertenecientes a los grupos control (CNT, n = 7) y aceite de pescado (AP, n = 8) a lo largo de las 12 semanas de un programa de entrenamiento en cinta trotadora. Interacción tiempo por tratamiento, *P=0,01, **P<0,01.

El vigor fue mayor en el grupo AP que en el CNT en las semanas 4, 8 y 12 (interacción tiempo por tratamiento, P<0,01; Figura IV-3).

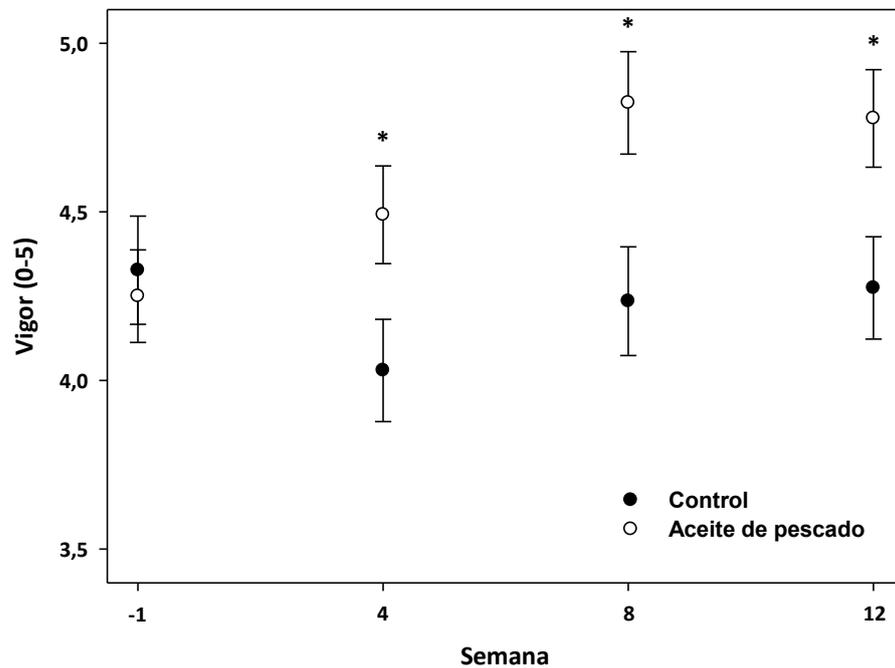


Figura IV-3. Media \pm SEM del vigor (0-5) en 8 perros pertenecientes a los grupos control (CNT, n = 7) y aceite de pescado (AP, n = 8) a lo largo de las 12 semanas de un programa de entrenamiento en cinta trotadora. Interacción tiempo por tratamiento, * $P < 0,01$.

No se observaron diferencias entre grupos en el % de espermatozoides vivos ($P > 0,1$). El % de espermatozoides con morfología normal fue mayor en el grupo CNT en comparación con el grupo AP en la semana 8 (interacción tiempo por tratamiento, $P < 0,05$). Se observó un incremento en la concentración de espermatozoides ($10^6/\text{ml}$) en el grupo AP a la semana 8 (interacción tiempo por tratamiento, $P = 0,06$; Figura IV-4), coincidente con un incremento en el recuento total de espermatozoides por eyaculado en la misma semana (interacción tiempo por tratamiento, $P < 0,05$; Figura IV-5).

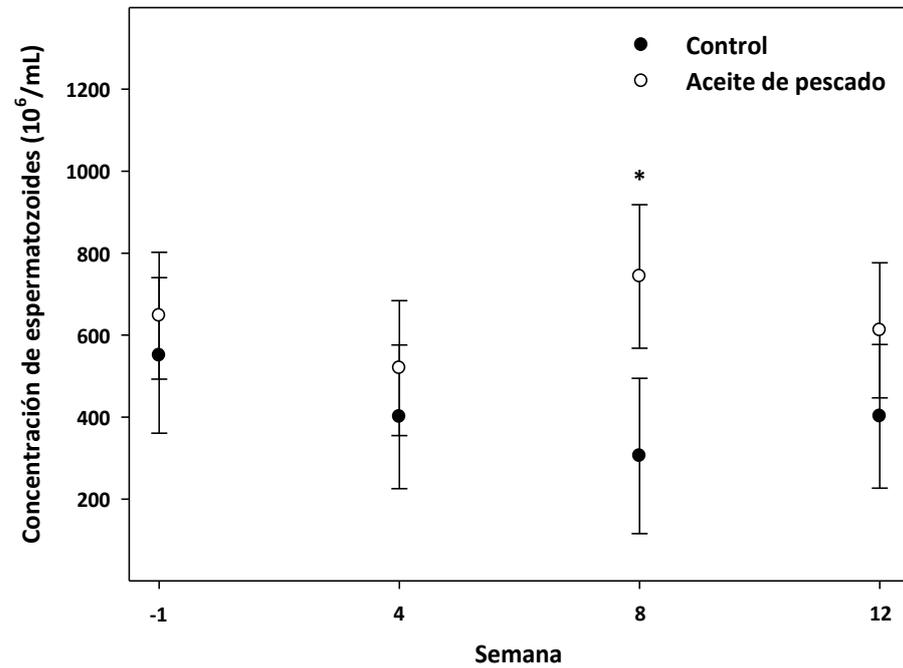


Figura IV-4. Media \pm SEM de la concentración de espermatozoides ($10^6/\text{mL}$) en 8 perros pertenecientes a los grupos control (CNT, $n = 7$) y aceite de pescado (AP, $n = 8$) a lo largo de las 12 semanas de un programa de entrenamiento en cinta trotadora. Interacción tiempo por tratamiento, * $P=0,06$.

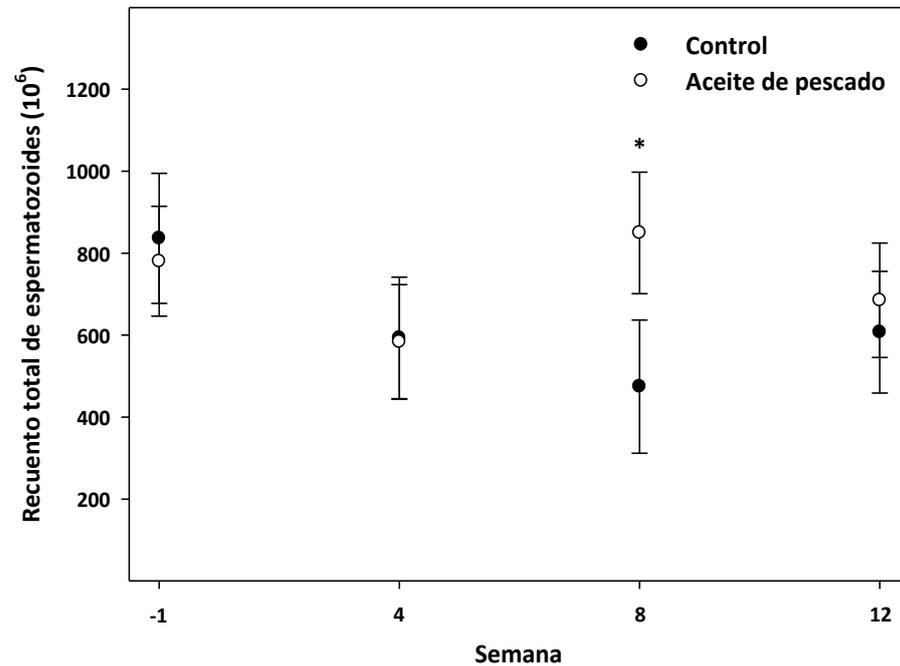


Figura IV-5. Media \pm SEM del recuento total de espermatozoides (10^6) en 8 perros pertenecientes a los grupos control (CNT, $n = 7$) y aceite de pescado (AP, $n = 8$) a lo largo de las 12 semanas de un programa de entrenamiento en cinta trotadora. Interacción tiempo por tratamiento, * $P < 0,05$.

Concentración de testosterona sérica

No se observó efecto del entrenamiento sobre la concentración de testosterona sérica en reposo ($P > 0,1$). En la semana -1, no hubo diferencias entre grupos en la concentración de testosterona (CNT, $12,20 \pm 2,43$ nmol/L; AP, $12,18 \pm 2,37$ nmol/L), mientras que en las semanas 4, 8 y 12 la concentración de testosterona en el grupo AP fue menor que en el grupo CNT (interacción tiempo por tratamiento, $P < 0,01$; Figura IV-6).

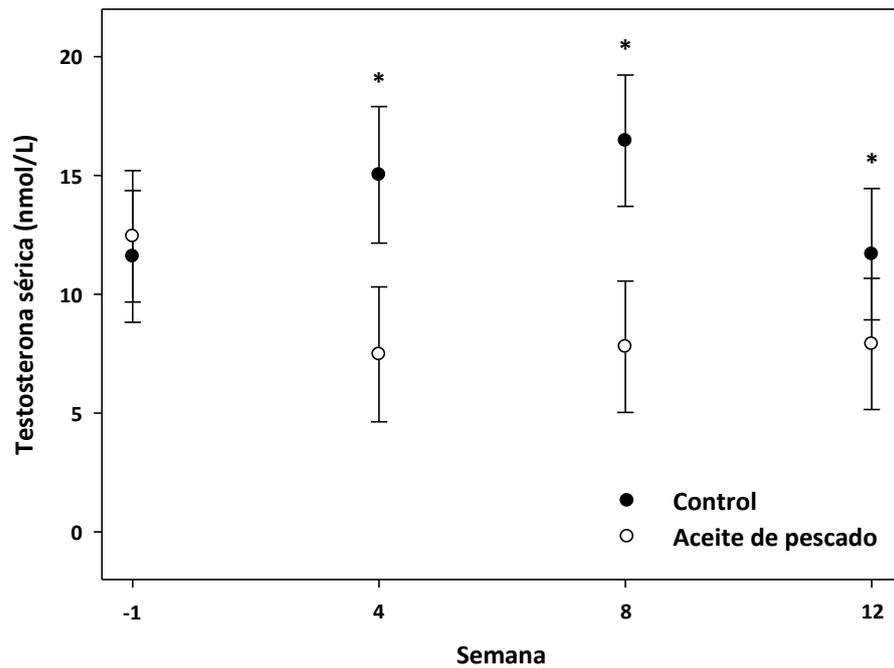


Figura IV-6. Media \pm SEM de la concentración de testosterona sérica (nmol/L) en 8 perros pertenecientes a los grupos control (CNT, n = 7) y aceite de pescado (AP, n = 8) a lo largo de las 12 semanas de un programa de entrenamiento en cinta trotadora. Interacción tiempo por tratamiento, *P<0,01.

Discusión y conclusión

Los resultados obtenidos muestran que la suplementación con aceite de pescado mejora parámetros espermáticos en caninos en entrenamiento. Estos hallazgos concuerdan con lo descrito en estudios previos, donde la suplementación con aceite de pescado mejoró parámetros espermáticos en porcinos (Rooke y col., 2001), pavos (Zaniboni y col., 2006), ovinos (Samadian y col., 2010) y caninos (Risso y col., 2016). En coincidencia con lo reportado previamente en perros (Risso y col., 2016), no se observaron diferencias entre grupos en el volumen de semen. Por el contrario, a diferencia de lo

reportado en ese trabajo, el porcentaje de espermatozoides vivos en el presente estudio no se vio afectado por la suplementación con aceite de pescado. Es importante destacar que, si bien en aquel estudio reportaron un menor porcentaje de espermatozoides vivos en los perros tratados, el recuento total de espermatozoides en el grupo suplementado con aceite de pescado fue mayor, coincidente con los resultados obtenidos en este trabajo. Por otro lado, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal en la semana 8 fue mayor en el grupo CNT que en el grupo AP. Sin embargo, el porcentaje de espermatozoides con morfología normal en el grupo AP no disminuyó, por el contrario, el mismo fue incrementando hacia la semana 12. En estudios previos, la suplementación con aceite de pescado produjo cambios en la proporción de los ácidos grasos que componen las membranas espermáticas, principalmente un incremento en el total de PUFA n-3 (Rooke y col., 2001; Samadian y col., 2010; Castellano y col., 2010). Se ha postulado que el incremento en el total de PUFA n-3 en la membrana espermática podría mejorar el movimiento flagelar característico de los espermatozoides (Strzeżek y col., 2004). Si bien, en el presente estudio no se evaluó la composición de ácidos grasos en las membranas espermáticas, las mejoras encontradas en el grupo AP podrían ser atribuidas a un incremento en la proporción de PUFA n-3 por efecto de la suplementación con aceite de pescado.

Por otro lado, a lo largo de este estudio no se observó efecto del entrenamiento sobre los parámetros reproductivos evaluados en reposo. Esto particularmente se ve reflejado en el grupo CNT, en el cual no se pudo apreciar efecto del tiempo en los parámetros evaluados. Los resultados obtenidos concuerdan con un estudio previo en humanos, donde el entrenamiento físico en diferentes disciplinas deportivas no afectó parámetros espermáticos ni la concentración de testosterona sérica (Lucía y col., 1996). Contrariamente, en el estudio realizado por Safarinejad y col. (2009), se observó un efecto perjudicial del entrenamiento en cinta trotadora sobre la calidad del semen y la concentración de testosterona sérica. Sin embargo, en aquel estudio tanto la intensidad como la duración del entrenamiento realizado fue marcadamente superior a la del presente trabajo. Por otro lado, Hiruntrakul y col. (2010) no observaron cambios en la concentración de testosterona sérica en reposo

luego de un programa entrenamiento de moderada intensidad, el cual tuvo una duración de doce semanas con una frecuencia de una vez por semana. De allí que, la intensidad y duración del programa de entrenamiento empleado podría ser una posible explicación a las diferencias encontradas entre estudios.

En línea con estudios previos en cerdos (Castellano y col., 2011) y perros (Risso y col., 2016), la suplementación con aceite de pescado disminuyó la concentración de testosterona. Se sabe que la falta de producción de testosterona puede resultar en una deficiente espermatogénesis (Castellano y col., 2011). Sin embargo, en este trabajo la calidad espermática no se vio afectada. Esto quizás pueda deberse a que, si bien la concentración de testosterona sérica disminuyó en el grupo AP, la misma permaneció dentro del rango normal descrito para la especie (Feldman y Nelson, 2007). El mecanismo a través del cual la suplementación con aceite de pescado, como fuente de PUFA n-3, puede influenciar la esteroidogénesis no está claro aún. Una posible explicación es la inhibición en la producción de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico debido a la suplementación con EPA/DHA (Castellano y col., 2011).

En conclusión, la suplementación con aceite de pescado mejora parámetros espermáticos y disminuye la concentración de testosterona sérica en caninos en entrenamiento.

Bibliografía

1. Blair SN, Morris JN. Healthy hearts--and the universal benefits of being physically active: physical activity and health. *Ann Epidemiol.* 2009; 19(4):253-256.
2. Blesbois E, Douard V, Germain M, Boniface P, Pellet F. Effects of n-3 polyunsaturated dietary supplementation on the reproductive capacity of male turkeys. *Theriogenology.* 2004; 61(2-3): 537-549.
3. Castellano CA, Audet I, Bailey JL, Chouinard PY, Laforest JP, Matte JJ. Effect of dietary n-3 fatty acids (fish oils) on boar reproduction and semen quality. *J Anim Sci.* 2010. 88(7): 2346-2355.
4. Castellano CA, Audet I, Laforest JP, Matte JJ, Suh M. Fish oil diets alter the phospholipid balance, fatty acid composition, and steroid hormone concentrations in testes of adult pigs. *Theriogenology.* 2011; 76(6): 1134-1145.
5. Díaz JD. Desarrollo de diluyentes de baja complejidad y costo para la preservación a corto y mediano plazo de semen canino. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2015.
6. Esmaeili V, Shahverdi AH, Moghadasian MH, Alizadeh AR. Dietary fatty acids affect semen quality: a review. *Andrology.* 2015; 3(3): 450-461.
7. Feldman EC, Nelson RW. *Endocrinología y Reproducción canina y felina.* 3ra Edición. Buenos Aires, Argentina, Ed Inter-Médica, 2007, p. 1055.
8. Freshman JL. Clinical techniques in small animal practice. 2002; 17(3): 104-107.
9. Hajizadeh Maleki B, Tartibian B. Long-term low-to-intensive cycling training: impact on semen parameters and seminal cytokines. *Clin J Sport Med.* 2015; 25(6): 535-540.
10. Hejazi K, Hosseini SRA. Influence of selected exercise on serum immunoglobulin, testosterone and cortisol in semi-endurance elite runners. *Asian J Sports Med.* 2012; 3(3): 185-192.

11. Hiruntrakul A, Nanagara R, Emasithi A, Borer KT. Effect of endurance exercise on resting testosterone levels in sedentary subjects. *Cent Eur J Public Health*. 2010; 18(3): 169-172.
12. Kutzler MA. Semen collection in the dog. *Theriogenology*. 2005; 64: 747-754.
13. Lucía A, Chicharro JL, Pérez M, Serratosa L, Bandrés F, Legido JC. Reproductive function in male endurance athletes: sperm analysis and hormonal profile. *J Appl Physiol*. 1996; 81(6): 2627-2636.
14. Mota Filho AC, Silva HV, Nunes TG, de Souza MB, de Freitas LA, de Araújo AA, da Silva LD. Cryopreservation of canine epididymal sperm using ACP-106c and TRIS. *Cryobiology*. 2014; 69(1): 17-21.
15. Risso A, Pellegrino FJ, Relling AE, Corrada Y. Effect of long-term fish oil supplementation on semen quality and serum testosterone concentrations in male dogs. *Int J Ferti Steril*. 2016; 10(2): 223-231.
16. Rooke JA, Shao CC, Speake BK. Effects of feeding tuna oil on the lipid composition of pig spermatozoa and in vitro characteristics of semen. *Reproduction*. 2001; 121(2): 315-322.
17. Safarinejad MR, Azma K, Kolahi AA. The effects of intensive, long-term treadmill running on reproductive hormones, hypothalamus–pituitary–testis axis, and semen quality: a randomized controlled study. *J Endocrinol*. 2009; 200(3): 259-271.
18. Samadian F, Towhidi A, Rezayazdi K, Bahreini M. Effects of dietary n-3 fatty acids on characteristics and lipid composition of ovine sperm. *Animal*. 2010; 4(12): 2017-2022.
19. Strzezek J, Fraser L, Kuklińska M, Dziekońska A, Lecewicz M. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Reprod Biol*. 2004; 4(3): 271-287.
20. Wathes DC, Abayasekara DR, Aitken RJ. Polyunsaturated fatty acids in male and female reproduction. *Biol Reprod*. 2007; 77(2): 190-201.

21. Yeste M, Barrera X, Coll D, Bonet S. The effects on boar sperm quality of dietary supplementation with omega-3 polyunsaturated fatty acids differ among porcine breeds. *Theriogenology*. 2011; 76(1): 184-196.
22. Zaniboni L, Rizzi R, Cerolini S. Combined effect of DHA and a-tocopherol enrichment on sperm quality and fertility in the turkey. *Theriogenology*. 2006; 65(9): 1813-1827.

CAPÍTULO V

EFFECTO DE UNA PRUEBA DE EJERCICIO SUPRAMÁXIMO SOBRE PARÁMETROS FISIOLÓGICOS EN CANINOS DURANTE UN ESTUDIO A CAMPO

Introducción

En caninos, el ejercicio produce respuestas agudas en parámetros fisiológicos como la frecuencia cardíaca (FC), temperatura rectal (TR) y lactato sanguíneo (LS) (Baltzer y col., 2012; Radin y col., 2015). En el deporte canino, contar con valores de referencia para cada tipo de actividad permite realizar una correcta evaluación de la condición física del animal, ya que la respuesta observada varía según el tipo, duración e intensidad del esfuerzo realizado (Piccione y col., 2012). Durante ejercicios de tipo supramáximo, la intensidad de trabajo supera el consumo máximo de oxígeno provisto por el metabolismo aeróbico, por lo que se requiere de un metabolismo anaeróbico predominante como fuente de energía (Crisafulli y col., 2004). Estudios previos en galgos, han reportado el efecto de ejercicios supramáximos sobre numerosos parámetros fisiológicos inmediatamente luego de completar diferentes distancias de carrera y tiempos de recuperación (Snow y col., 1988; Ilkiw y col., 1989; Rose y Bloomberg, 1989; Holloway y col., 1996). En estos estudios, se destaca el marcado incremento de la FC, TR, LS, además de otros parámetros bioquímicos y hematológicos, una vez finalizado el esfuerzo. Por otro lado, el retorno a valores basales de los parámetros evaluados durante la fase de recuperación puede resultar de utilidad para valorar el nivel de entrenamiento en perros deportistas. Se ha propuesto que, reducciones en la concentración de LS durante la fase de

recuperación puede indicar una adecuada adaptación de los perros al esfuerzo realizado (Rovira y col., 2007). Por lo expuesto, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de una prueba de ejercicio supramáximo sobre la FC, TR y LS en caninos durante un estudio a campo.

Materiales y métodos

Animales

Se incluyeron en este estudio 9 perros sanos, machos ($n = 3$) y hembras ($n = 6$), de raza Galgo, de 2 a 5 años de edad, de 25 a 33 kg de peso y 59 a 70 cm de altura hasta la cruz, provenientes de propietarios particulares. Todos los perros mantenían un entrenamiento regular dirigido por su propietario, que consistía en actividades físicas de 30 a 60 minutos de duración con una frecuencia de al menos 3 veces por semana. Para evaluar el estado de salud y descartar posibles enfermedades que pudieran comprometer el desarrollo del estudio, se realizó a cada animal un examen clínico y ortopédico completo. Los propietarios firmaron un consentimiento por escrito y estuvieron presentes durante el estudio.

Prueba de ejercicio a campo

Todos los perros fueron sometidos a una única prueba de ejercicio supramáximo. La misma se realizó entre las 09:00 AM y 11:00 AM e incluyó un total de 100 metros de distancia a máxima velocidad sobre terreno de tierra. Concluida la prueba, los perros tuvieron una fase de recuperación pasiva de 10 minutos durante la cual mantuvieron reposo en estación o decúbito esternal y se les permitió el consumo de agua.

Toma de muestras

Previo al inicio de la prueba de ejercicio (Pre), inmediatamente finaliza la misma (Post) y a los 5 (Post 5') y 10 (Post 10') minutos de la fase de recuperación, se realizaron los siguientes muestreos:

- Frecuencia cardíaca. La FC en latidos por minutos (lpm) fue determinada por auscultación del área cardíaca.
- Temperatura rectal. La TR en °C fue medida mediante el uso de termómetro digital.
- Lactato sanguíneo. La concentración de LS en mmol/L fue determinada por método enzimático colorimétrico mediante el analizador de lactato StatStrip X-Press de Nova Biomedical (Bonaventura y col., 2015). En cada muestreo se tomaron 50 µl de sangre entera por venopunción de las venas safenas de los miembros posteriores.

Análisis estadístico

Los datos se representan como medias de mínimos cuadrados (LSM) \pm el error estándar de las medias (SEM). Se utilizó un diseño con mediciones repetidas en el tiempo, donde cada animal fue considerado una unidad experimental. Los datos fueron analizados con el Proc Mixed de SAS (versión 9.4; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). El modelo mixto lineal incluye el efecto aleatorio de los perros y el efecto fijo del tiempo (Pre vs Post vs Post 5' vs Post 10'). Para el efecto principal (tiempo) un valor de $P < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Los valores de FC, TR y LS aumentaron significativamente finalizada la prueba de ejercicio ($P < 0,01$). La FC se mantuvo aumentada a los 5 minutos de la fase de recuperación ($P < 0,01$), retornando a valores basales a los 10 minutos. La TR y la concentración de LS se mantuvieron aumentadas tanto a los 5 como

a los 10 minutos durante la fase de recuperación ($P<0,01$). Los valores más altos de TR y LS se registraron a los 5 minutos de finalizado el ejercicio. Figuras V-1, 2 y 3.

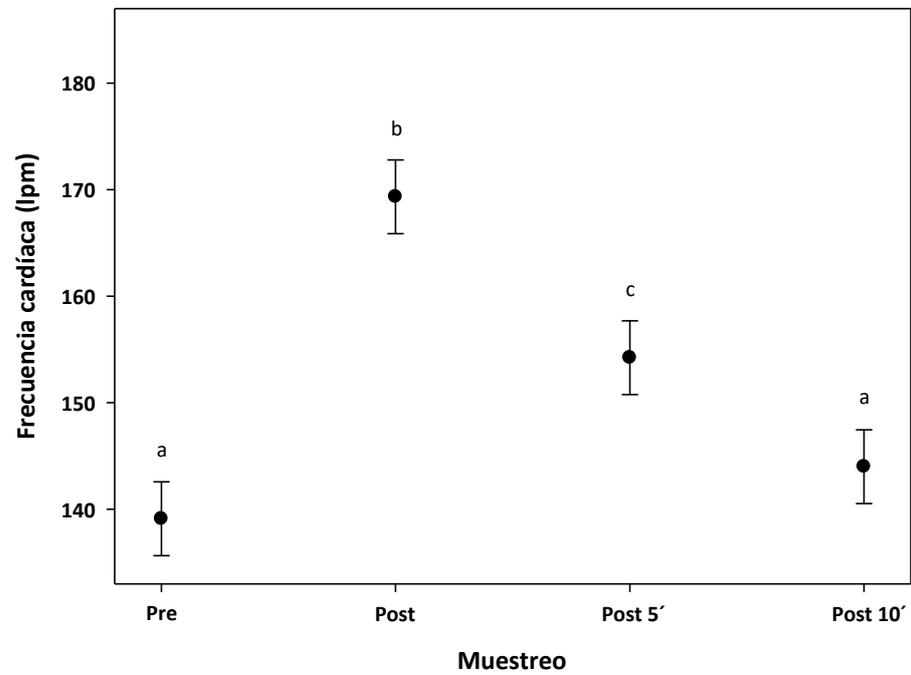


Figura V-1. Media \pm SEM de la frecuencia cardíaca (latidos por minuto) antes (Pre), inmediatamente después (Post) y a los 5 (Post 5') y 10 (Post 10') minutos de finalizada una prueba de ejercicio supramáximo en 9 galgos durante un estudio a campo. Las diferentes letras indican diferencias ($P<0,01$) entre tiempos.

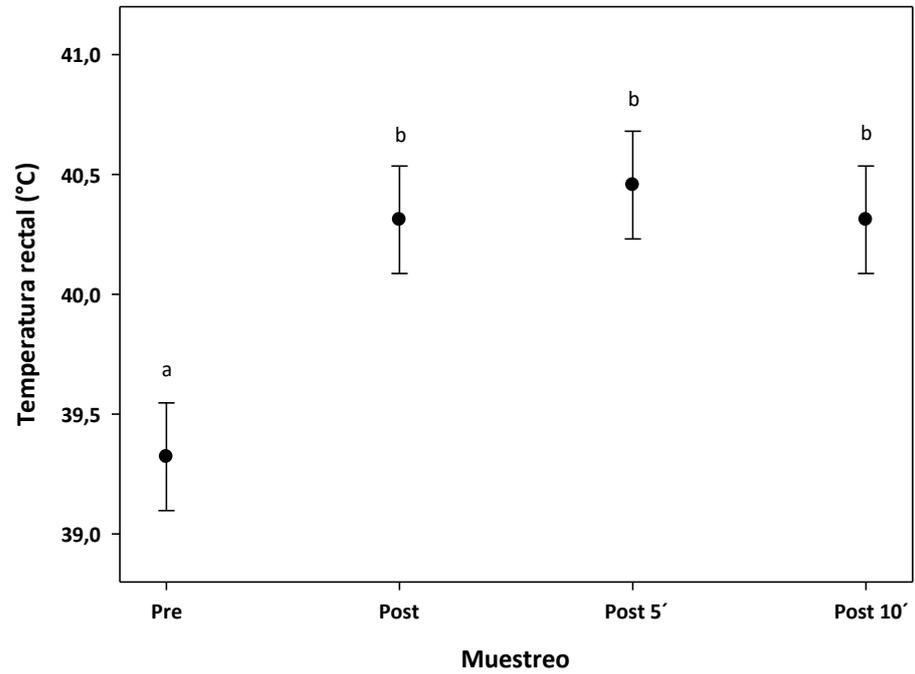


Figura V-2. Media \pm SEM de la temperatura rectal ($^{\circ}$ C) antes (Pre), inmediatamente después (Post) y a los 5 (Post 5') y 10 (Post 10') minutos de finalizada una prueba de ejercicio supramáximo en 9 galgos durante un estudio a campo. Las diferentes letras indican diferencias ($P < 0,01$) entre tiempos.

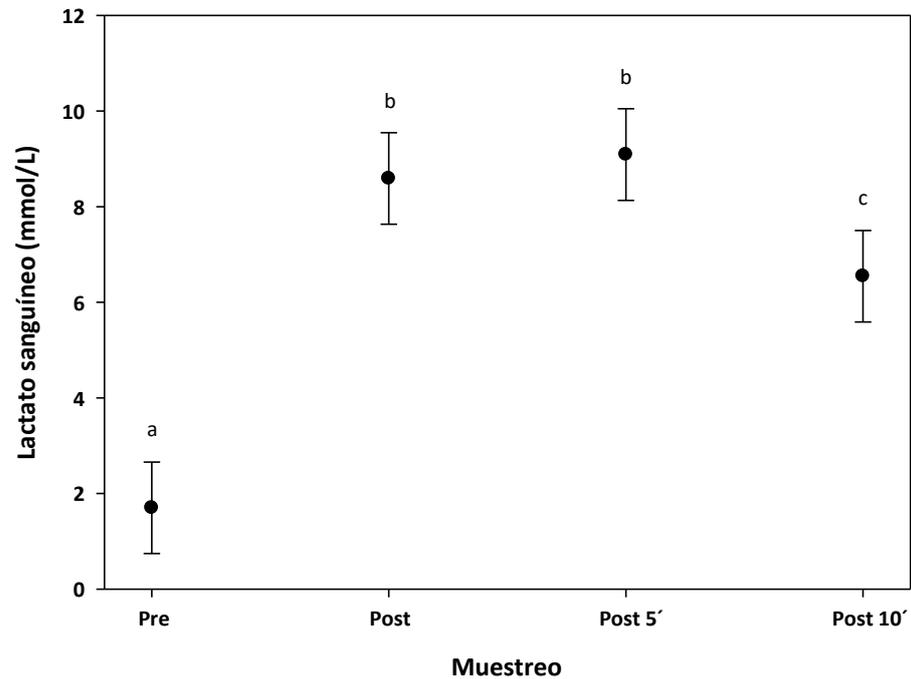


Figura V-3. Media \pm SEM de la concentración de lactato sanguíneo (mmol/L) antes (Pre), inmediatamente después (Post) y a los 5 (Post 5') y 10 (Post 10') minutos de finalizada una prueba de ejercicio supramáximo en 9 galgos durante un estudio a campo. Las diferentes letras indican diferencias ($P < 0,01$) entre tiempos.

Discusión y conclusión

Los valores de FC y TR registrados previo al inicio de la prueba de ejercicio supramáximo probablemente reflejen una respuesta anticipada en los perros bajo estudio (Steiss y col., 2004), dada la potencial ansiedad a iniciar la misma. Sin embargo, esto parece no haber influido sobre los valores obtenidos luego de realizar la prueba, donde se pudo apreciar un incremento significativo en los parámetros evaluados. El abrupto incremento en los valores de FC, TR y LS observado inmediatamente al finalizar la prueba sugiere que el esfuerzo realizado fue de alta intensidad. A los 5 minutos de la fase

de recuperación, los valores de FC disminuyeron significativamente con respecto a los obtenidos una vez concluida la prueba. No obstante, continuaron elevados con respecto a los valores registrados previo al inicio de la misma. Por el contrario, a los 10 minutos de la fase recuperación se pudo observar que los valores de FC fueron retornando hacia valores basales, lo que sugiere la recuperación de los perros luego de la prueba. El incremento en la concentración de LS al finalizar ejercicios de alta intensidad se debe principalmente a la liberación de lactato desde los músculos previamente involucrados durante el esfuerzo (Maciejewski y col., 2016). Esto muy probablemente sea el resultado de un metabolismo anaeróbico predominante en la contracción muscular durante ejercicios de velocidad (Baltzer y col., 2012). Un estudio previo en galgos, ha mostrado que esta raza tiene mayor porcentaje en sus extremidades de fibras musculares tipo IIA de contracción rápida, muy próximo al 100% (Guy y col., 1981). En otro estudio más reciente, también se han determinado los tipos de fibras musculares que componen los músculos de diferentes razas caninas, indicando que la fibra tipo IIA es la más abundante en los músculos del tronco y extremidades (Toniolo y col., 2007). Este tipo de fibras presentan una notable capacidad glucolítica por lo que son capaces de producir grandes cantidades de lactato durante ejercicios de alta intensidad (Essén y col., 1975). Si bien, en el presente trabajo no se evaluó la cantidad relativa de los tipos de fibras musculares en los perros bajo estudio, es esperable que presenten mayor proporción de fibras musculares tipo II, las cuales hayan dado lugar al incremento de lactato en sangre al finalizar la prueba de ejercicio. El incremento en la concentración de LS durante los primeros minutos recuperación se explica por el hecho de que la aparición de lactato en sangre excede transitoriamente su eliminación (Maciejewski y col., 2016). Asumiendo que la producción de lactato se interrumpe una vez finalizado el esfuerzo, el pico observado en los valores de LS a los 5 minutos de la fase de recuperación puede deberse a una liberación retrasada de lactato desde los músculos a la circulación sanguínea. Esto podría ser causado por una baja densidad en los músculos de las proteínas involucradas en el transporte de lactato y/o a un limitado metabolismo intracelular (Ferasin y Marcora, 2009). Los resultados del presente trabajo se encuentran en línea con

un estudio previo en galgos, en el cual el pico en la concentración de LS luego de un ejercicio de alta intensidad se produjo a los 5 minutos de recuperación, no retornando a valores basales hasta 30 minutos de finalizado el ejercicio (Rose y Bloomberg, 1989). Por su parte, la TR mostró un comportamiento similar al LS durante la fase de recuperación. En la raza galgo, aproximadamente el 60% del peso corporal total corresponde a masa muscular, por lo que es factible esperar que ante un ejercicio de alta intensidad genere calor a un ritmo elevado (McNicholl y col., 2016). Asimismo, es posible que la temperatura ambiental haya influido sobre la temperatura corporal luego del ejercicio (McNicholl y col., 2016), condicionando el proceso de termorregulación durante la recuperación. A pesar de observarse en los perros un leve descenso en la media de los valores de TR y LS a los 10 minutos de la fase de recuperación, estos fueron significativamente más altos que los obtenidos previo al inicio de la prueba de ejercicio. Al respecto, otros estudios en perros, han reportado tiempos de recuperación más extensos para que los parámetros fisiológicos evaluados retornen a valores basales luego de realizar ejercicios de tipo supramáximos (Ilkiw y col., 1989; Rose y Bloomberg, 1989).

En conclusión, la FC, TR y LS se muestran como parámetros confiables en caninos al momento de valorar la respuesta fisiológica luego de un ejercicio a campo de alta intensidad. A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se puede inferir en la necesidad de una fase de recuperación más amplia para permitir un completo retorno de los parámetros evaluados a valores basales luego de realizar pruebas de ejercicio supramáximo, particularmente para la temperatura corporal y la concentración de lactato en sangre.

Bibliografia

1. Baltzer WI, Firshman AM, Stang B, Warnock JJ, Gorman E, McKenzie EC. The effect of agility exercise on eicosanoid excretion, oxidant status, and plasma lactate in dogs. *BMC Vet Res.* 2012; 8: 249.
2. Bonaventura JM, Sharpe K, Knight E, Fuller KL, Tanner RK, Gore CJ. Reliability and accuracy of six hand-held blood lactate analysers. *J Sports Sci Med.* 2015; 14(1): 203-214.
3. Crisafulli A, Carta C, Melis F, Tocco F, Frongia F, Santoboni UM, Pagliaro P, Concu A. Haemodynamic responses following intermittent supramaximal exercise in athletes. *Exp Physiol.* 2004; 89(6): 665-674.
4. Essén B, Jansson E, Henriksson J, Taylor AW, Saltin B. Metabolic characteristics of fibre types in human skeletal muscle. *Acta Physiol Scand.* 1975; 95(2):153-165.
5. Ferasin L, Marcora S. Reliability of an incremental exercise test to evaluate acute blood lactate, heart rate and body temperature responses in Labrador retrievers. *J Comp Physiol B.* 2009; 179(7): 839-845.
6. Guy PS, Snow DH. Skeletal muscle fibre composition in the dog and its relationship to athletic ability. *Res Vet Sci.* 1981; 31(2): 244-248.
7. Holloway SA, Sundstrom D, Senior DF. Effect of acute induced metabolic alkalosis on the acid/base responses to sprint exercise of six racing greyhounds. *Res Vet Sci.* 1996; 61(3): 245-251.
8. Ilkiw JE, Davis PE, Church DB. Hematologic, biochemical, blood-gas, and acid-base values in greyhounds before and after exercise. *Am J Vet Res.* 1989; 50(4): 583-6.
9. Maciejewski H, Bourdin M, Féasson L, Dubouchaud H, Denis C, Freund H, Messonnier LA. Muscle MCT4 content is correlated with the lactate removal ability during recovery following all-out supramaximal exercise in highly-trained rowers. *Front Physiol.* 2016; 7: 223.

10. McNicholl J, Howarth GS, Hazel SJ. Influence of the environment on the body temperature of racing Greyhounds. *Front Vet Sci.* 2016; 3: 53.
11. Piccione G, Casella S, Panzera M, Giannetto C, Fazio F. Effect of moderate treadmill exercise on some physiological parameters in untrained beagle dogs. *Exp Anim.* 2012; 61(5): 511-515.
12. Radin L, Belić M, Bottegaro NB, Hrastić H, Torti M, Vučetić V, Stanin D, Vrbanac Z. Heart rate deflection point during incremental test in competitive agility border collies. *Vet Res Commun.* 2015; 39(2): 137-142.
13. Rose RJ, Bloomberg MS. Responses to sprint exercise in the greyhound: effects on haematology, serum biochemistry and muscle metabolites. *Res Vet Sci.* 1989; 47(2): 212-218.
14. Rovira S, Muñoz A, Benito M. Hematologic and biochemical changes during canine agility competitions. *Vet Clin Pathol.* 2007; 36(1): 30-35.
15. Snow DH, Harris RC, Stuttard E. Changes in haematology and plasma biochemistry during maximal exercise in greyhounds. *Vet Rec.* 1988; 123(19): 487-9.
16. Steiss J, Ahmad HA, Cooper P, Ledford C. Physiologic responses in healthy Labrador retrievers during field trial training and competition. *J Vet Intern Med.* 2004; 18(2): 147-151.
17. Toniolo L, Maccatrozzo L, Patruno M, Pavan E, Caliaro F, Rossi R, Rinaldi C, Canepari M, Reggiani C, Mascarello F. Fiber types in canine muscles: myosin isoform expression and functional characterization. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292(5): C1915-C1926.

CONCLUSIONES FINALES

- El uso de cinta trotadora motorizada permite controlar las condiciones del ejercicio, particularmente velocidad, duración y grado de inclinación, facilitando la planificación e implementación de programas de entrenamiento y pruebas de ejercicio específicas.
- El programa de entrenamiento propuesto produjo mejoras en el rendimiento físico de todos los perros bajo estudio, sin afectar los parámetros espermáticos evaluados ni la concentración de testosterona sérica.
- La frecuencia cardíaca, temperatura rectal y circunferencia de muslos son parámetros fisiológicos confiables para evaluar mejoras en el rendimiento físico en caninos sometidos a programas de entrenamiento en cinta trotadora motorizada.
- La prueba de ejercicio en cinta trotadora motorizada fue una herramienta fácilmente aplicable para valorar la respuesta al esfuerzo y evaluar mejoras en el rendimiento en caninos en entrenamiento. Al respecto, la determinación de la frecuencia cardíaca y de la concentración de lactato sanguíneo son indicadores precisos para ello.
- Tanto el programa de entrenamiento como la prueba de ejercicio en cinta trotadora se mostraron confiables y factibles para su uso en caninos. Asimismo, pueden resultar un complemento beneficioso en la preparación física de perros que participan en actividades

deportivas, de trabajo, en aquellos que concurren a exposiciones o bien, para mantener un estado físico saludable en perros de compañía.

- La suplementación de la dieta con aceite de pescado, en dosis de 54 mg/kg de peso metabólico/día, se muestra como un complemento nutricional beneficioso en caninos para mejorar ya sea la respuesta fisiológica al ejercicio como el rendimiento en entrenamiento. Su uso como suplemento puede ser de interés en aquellas disciplinas deportivas que requieren de un esfuerzo físico de mediana y baja intensidad durante extensos periodos de tiempo.
- La suplementación de la dieta con aceite de pescado en el macho canino, en dosis de 54 mg/kg de peso metabólico/día, mejora parámetros espermáticos. Son necesarias futuras investigaciones.
- En caninos sometidos a pruebas de ejercicio a campo de alta intensidad, la determinación de la frecuencia cardíaca, temperatura rectal y concentración de lactato sanguíneo permiten evaluar con precisión la respuesta fisiológica al esfuerzo. Asimismo, es necesario un periodo de recuperación pasiva mayor a 10 minutos para el completo retorno de los parámetros evaluados a valores de reposo, particularmente para la temperatura corporal y la concentración de lactato sanguíneo.
- El uso de pruebas de ejercicio a campo de alta intensidad puede ser de interés para llevar un adecuado control de la condición física en perros de deporte, fundamentalmente durante la fase de preparación.

PREMIOS A LA INVESTIGACIÓN

- Pellegrino FJ, Risso A, Corrada Y. Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la frecuencia cardíaca y temperatura rectal en perros sanos durante un programa de entrenamiento en cinta trotadora motorizada. XXIV Jornadas Veterinarias en Pequeños Animales. CABA, Buenos Aires, Argentina. Resumen. 20/04/2015. *Primer Premio*.
- Pellegrino FJ, Risso A, Massieri L, Corrada Y. Efecto de la suplementación con aceite de pescado sobre la concentración de testosterona sérica en perros durante un programa de entrenamiento. XXV Jornadas Veterinarias en Pequeños Animales. CABA, Buenos Aires, Argentina. Resumen. 16/05/2016. *Primer Premio*.