UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLINICAS VETERINARIAS



Estudio del Síndrome de Disfunción Cognitiva en el Perro

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN VETERINARIA
POR LA LICENCIADA

ANGELA GONZALEZ MARTINEZ

LUGO, JUNIO DE 2014

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS CLINICAS VETERINARIAS

FACULTADE DE VETERINARIA
CAMPUS DE LUGO
27002 LUGO

Pedro Pesini Ruiz, Doctor en Veterinaria, Director de Investigación y Desarrollo en Araclon Biotech S.L., Germán Santamarina Pernas y María Luisa Suárez Rey, Profesores Titulares del Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias de la Universidad de Santiago de Compostela.

INFORMAN:

Que el presente trabajo presentado por Dña. Ángela González Martínez, con el título **"Estudio del Síndrome de Disfunción Cognitiva en el Perro"**, ha sido realizado bajo nuestra dirección y consideramos que cumple todos los requisitos para optar al grado de Doctor.

Y para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente informe en Lugo a 23 de junio de 2014.

Fdo.: Pedro Pesini Ruiz

Fdo.: German Santamarina Pernas

Fdo.: María Luisa Suárez Rey

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Estudio del Síndrome de Disfunción Cognitiva en el Perro

Ángela González Martínez

Este trabajo se ha realizado en las instalaciones y con los medios de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Santiago de Compostela (Hospital Veterinario Universitario Rof Codina), en la Facultad de Veterinaria de Zaragoza y en los laboratorios de la empresa de Investigación Araclon Biotech S.L



USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

AGRADECIMIENTOS

Es complicado pararse y pensar en todas aquellas personas a las que has de agradecer "algo" a lo largo de tu vida. Puedo considerarme afortunada dado que en el transcurso de estos años han sido muchas.

En primer lugar, agradecer a las tres personas sin las cuales esta tesis no se podría haber llevado a cabo Pedro Pesini, Germán Santamarina y Maruska Suárez. El primero por su apoyo en la distancia y a los segundos por toda la ayuda y oportunidades que me ofrecen cada día que trabajamos juntos.

A mis compañeros HVU Rof Codina: gerente, director veterinario, jefes de servicio, facultativos, internos (antiguos y nuevos), SAC, personal de administración, recepción, farmacia, laboratorio y limpieza. Por su ayuda en este trabajo y conseguir que cada día sea divertido.

Al equipo de Araclon Biotech, una inspiración para los que luchan por sus sueños.

A mis compañeros de la facultad de Zaragoza por ser parte de este proyecto y por lo mucho que me cuidan cuando estoy allí y por Skype.

Si hay una persona que se merezca un agradecimiento especial es Belén Rosado, coautora de cada una de las publicaciones de esta tesis e investigadora fundamental de este proyecto.

A todos los dueños y perros que han participado en el proyecto, por su paciencia y amabilidad.

A mis padres, hermanas y sobrino, porque gracias es una palabra que se queda muy corta.

A mis amigos porque siempre están ahí aunque se encuentren lejos o al lado de casa.

A mi marido, Javier, por su ayuda en este trabajo y en cada día que vivo a su lado.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una de las patologías neurodegenerativas más comunes en humanos. Se ha comprobado que los perros ancianos sufren alteraciones cognitivas y neuropatológicas similares a las fases tempranas de EA. Neuropatológicamente se observa disminución del volumen cerebral, daños oxidativos, patología amiloide, pérdida de neuronas y alteración de la neurogénesis. Este síndrome, conocido como Síndrome de Disfunción Cognitiva (SDC), incluye una amplia gama de cambios de comportamiento siendo los más comunes: alteración del ciclo sueño-vigilia, disminución de la interacción social, eliminación inadecuada, desorientación y cambios en los niveles de actividad.

La mayoría de los estudios realizados que han utilizado el perro como modelo de EA se han llevado a cabo con animales de laboratorio en vez de mascotas. Sin embargo estas últimas ofrecen una serie de ventajas para el estudio de EA ya que perros y humanos conviven en un ambiente común lo que hace que estén sometidos a estresores ambientales similares durante el proceso de envejecimiento.

Resulta interesante comentar que las intervenciones terapéuticas en EA han de hacerse en fases tempranas de la enfermedad, incluso presintomáticos. Así mismo, un diagnóstico temprano y un protocolo de tratamiento adecuado de SDC puede ayudar a mejorar la calidad de vida de los perros ancianos así como su relación con sus propietarios.

Los objetivos de la presente tesis son desarrollar un protocolo diagnóstico que sea capaz de identificar fases tempranas de la enfermedad mediante el uso de un cuestionarios realizados a los propietarios, cuya interpretación es comparada con métodos más objetivos como el test de open-field y dos test sencillos realizados en el ambiente clínico; y estudiar del comportamiento del amiloide plasmático en perros con la finalidad de utilizarlo en el diagnóstico y caracterización de la patología.

Los resultados obtenidos nos muestran que los niveles de amiloide oscilan con la edad, de manera que los animales jóvenes tienen valores mayores que los ancianos. Además, de forma similar a lo que ocurre en humanos, los perros con disfunción cognitiva leve tienen niveles de beta amiloide mayores que los animales dementes.

Además, los animales con SDC presentan una mayor actividad locomotora repetitiva, menor respuesta al aislamiento social y un déficit de habituación al reflejo de su imagen en un

espejo. También los animales con disfunción cognitiva severa tuvieron peores puntuaciones en el test de buscar comida en el suelo.

Estos resultados son congruentes con las puntuaciones del cuestionario lo que complementa el diagnóstico e indirectamente valida el cuestionario como herramienta.

SUMMARY

The Alzheimer's disease (AD) is one of the most common neurodegenerative disorders in humans. Aging dogs naturally demonstrate cognitive impairment and neuropathology that model early AD. Such neuropathology includes amiloid pathology, reduced brain volume, oxidative damage, neuronal loss, and impaired neurogenesis. This syndrome, known as Cognitive dysfunction syndrome (CDS), comprehends a number of behavioural signs such as changes in the sleep-wake cycle, decreased social interaction, loss of prior housetraining, disorientation and changes in the level of activity.

Research on the canine model of AD has been extensively conducted using laboratory beagle dogs rather than pet/companion dogs. However, the latter population may offer additional contributions to the investigation of AD because these dogs share a common environment with humans and, therefore, encounter similar environmental stressors during the aging process.

Interestingly, it appears that early diagnosis of AD, even at presymptomatic stages, is essential for effective therapeutic intervention. And also an earlier diagnosis and adequate therapeutic protocol could help to improve the quality of life of the dogs as well as the relationships with their owners.

The aims of the present study were to develop a new objective diagnosis protocol in order to could indentify early stages of cognitive dysfunction syndrome by the use of a owners-based questionnaire, which performance could compare with more objective test like open-field and simple task that could be conducted in the clinical setting; and the study of the plasma amyloid behavior in dogs in order to use it the diagnosis and characterization of the pathology.

The results obtained in this study showed that amyloid levels oscillate with the age. So, young animals had higher levels than old ones. Also, similar to humans, dogs who suffered mild cognitive dysfunction had higher levels than animals with severe cognitive dysfunction or impaired aged dogs.

Also impairment animals showed higher levels of repetitive locomotor activity, lower response to social isolation and a deficient habituation to mirror reflection. Besides severe cognitive impairment dogs obtained the worst punctuations in the food search test.

These results were congruent with the proposed questionnaire scores. That complements the diagnosis and indirectly validates the questionnaire scores.

ESTA TESIS ES EL RESULTADO DE LA SIGUIENTES PUBLICACIONES

1 ***Plasma β-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease.*** González-Martínez, A.; Rosado, B.; Pesini, P.; Suárez, ML.; Santamarina, G.; García-Belenguer, S.; Villegas, A.; Monleón, I.; Sarasa, M. *Experimental Gerontology*, 2011; 46(7): 590-596.

2 ***Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs - Part 1: Locomotor and exploratory behaviour.*** Rosado, B.; González-Martínez, A.; Pesini, P.; García-Belenguer, S.; Palacio, J.; Villegas, A.; Suárez, ML.; Santamarina, G.; Sarasa, M. *The Veterinary Journal,* 2012, 194: 189-195.

3 ***Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs - Part 2: Social responsiveness***. Rosado, B.; González-Martínez, A.; Pesini, P.; García-Belenguer, S.; Palacio, J.; Villegas, A.; Suárez, ML.; Santamarina, G.; Sarasa, M. *The Veterinary Journal,* 2012, 194: 196-201.

4 ***Effect of age and severity of cognitive dysfunction on two simple cognitive tasks in pet dogs.*** González-Martínez, A.; Rosado, B.; Pesini, P.; García-Belenguer, S.; Palacio, J.; Villegas, A.; Suárez, ML.; Santamarina, G.; Sarasa, M. *The Veterinary Journal,* 2013, 198: 176-181.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

TABLA DE CONTENIDO

Resumen ..... **VII**
Summary ..... **IX**
Tabla de Contenido ..... **XIII**
Abreviaturas utilizadas ..... **XV**
1. Introducción **3**
1.1. El perro como modelo de Enfermedad de Alzheimer 5
1.2. Síndrome de Disfunción Cognitiva en el Perro 7
1.3. Diagnóstico del Síndrome de Disfunción Cognitiva en el perro 8
1.3.1. Cuestionarios 8
1.3.2. Test 11
1.3.2.1. Test de aprendizaje y memoria 11
1.3.2.2. Test no cognitivos 12
Open-field 12
Test del canil 13
1.3.3. Biomarcadores 14
1.3.4. Diagnóstico por imagen 16
Tomografía axial computarizada 16
Resonancia magnética 16
Tomografía por emisión de positrones 18
Tomografía computarizada por emisión de fotones individuales 19
2. Justificacion del Tema **23**
3. Objetivos **27**
4. Material y Metodos **31**
4.1. Plasma β-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease. 32
4.2. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs. Locomotor and exploratory behavior (part I). Social responsiveness (part II). 33
4.3. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on two simple cognitive tasks in pet dogs. 37
5. Resultados **43**
5.1. Publicación 1: Plasma β-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease. 43
5.2. Publicación 2: Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs: Locomotor and exploratory behaviour 44
5.3. Publicación 3: Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs: Social responsiveness. 44
5.4. Publicación 4: Effect of age and severity of cognitive dysfunction on two simple cognitive tasks in pet dogs. 44
6. Discusion **49**
6.1. Plasma β-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease. 49
6.2. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs: Locomotor and exploratory behaviour. 50
6.3. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs: Social responsiveness. 52
6.4. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on two simple cognitive tasks in pet dogs. 53
6.5. Contribuciones de nuestros estudios 54
7. Conclusiones **59**
8. Anexos **63**
Anexo 1: Efectos que las condiciones médicas pueden tener en el comportamiento. 63

Anexo 2: Cuestionario Disfunción Cognitiva 66
Anexo 3: Publicación en la Revista Clínica Veterinaria de Pequeños Animales. Síndrome de disfunción cognitiva en el perro geriátrico. 69
9. Bibliografia 83
10. Publicaciones 97
10.1. Plasma β-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease 101
10.2. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs: Locomotor and exploratory behaviour. 111
10.3. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs: Social responsiveness. 121
10.4. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on two simple cognitive tasks in pet dogs. 129

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

ABREVIATURAS UTILIZADAS

Aβ: β-amiloide

AL: Actividad locomotora

APP: Proteina precursora de amiloide

CI: Demente (del inglés cognitively impaired)

CU: Cognitively unimpaired (sin demencia)

DCL: Deterioro cognitivo leve

EA: Enfermedad de Alzheimer

EVEC: Evaluación del envejecimiento emocional y cognitivo

FS: Test de búsqueda de comida (del inglés food searching)

LCR: Líquido cefalorraquídeo

MA: Mediana edad (del inglés middle age)

MAO-B: Monoamino oxidasa B

mCI: Disfunción cognitiva leve (del inglés mild cognitively impaired)

OF: Open-field

PET: Tomografía por emisión de positrones (del inglés positron emission tomography)

PS: Test de resolución de problemas (del inglés problem solving)

RM: Resonancia magnética

sCI Disfunción cognitiva severa (del inglés severe cognitively impaired)

SDC: Síndrome de disfunción cognitiva

SPECT: Tomografía computarizada por emisión de fotones individuales (del inglés single photon emission computed tomography)

TAC: Tomografía axial computarizada

TC: Test de curiosidad

TDS: Puntuación total de disfunción cognitiva (del inglés total dysfunction score)

TE: Test del espejo

TIH: Test de interacción con humano

TOC: Trastorno obsesivo compulsivo

YG: Jóvenes (del inglés young)

YM: Animales jóvenes y de mediana edad (del inglés young and mature)

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

INTRODUCCION

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

INTRODUCCIÓN

El envejecimiento en el ser humano se asocia generalmente con el deterioro de las funciones cognitivas tales como memoria, aprendizaje, función visuoespacial, lenguaje, velocidad en el procesamiento de información y funciones ejecutivas (Huppert y Wilcock 1997). No obstante, más allá de lo que puede considerarse el deterioro normal debido al envejecimiento, estas alteraciones se presentan con una velocidad e intensidad desigual en la población distinguiéndose actualmente entre las personas que sufren deterioro cognitivo leve (DCL) y las que sufren demencia.

La demencia senil es un síndrome, de causas muy variadas, que constituye una de las patologías más prevalentes en la población geriátrica. Se la define como el deterioro adquirido de la memoria y otras capacidades cognitivas que entorpece la realización satisfactoria de las actividades cotidianas (Knopman 1998).

La demencia se considera hoy en día un grave problema de sanidad pública, y su desarrollo e incidencia aumenta de forma progresiva sobre todo en sociedades desarrolladas y con una tasa de envejecimiento de la población importante. La asistencia de estos pacientes es muy costosa, no solo en el plano económico, sino también en el social, con la necesidad de, en función del grado de dependencia que presentan, dedicación de muchas horas por parte de familiares y cuidadores en la atención de estos pacientes.

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más común de demencia y es la responsable del 60 al 80% de los casos de demencia en los países desarrollados (Evans et al. 1989; Hendrie et al. 1995; White et al. 1996). Se trata de un proceso neurodegenerativo caracterizado por un deterioro cognitivo y conductual de inicio insidioso y progresivo

provocado por el acúmulo en el cerebro de depósitos amiloides extracelulares, constituidos fundamentalmente por un péptido de 40-42 aminoácidos denominado β-amiloide (Aβ), y por la presencia ovillos neurofibrilares de proteína TAU fosforilada.

Actualmente, el diagnóstico de la EA, se basa en la aplicación de criterios clínicos, siendo los más utilizados los NINCDS-ADRDA, que incluyen alteración de la memoria (deterioro de la capacidad para aprender información nueva o para recordar información aprendida previamente) y una o más de las siguientes alteraciones cognoscitivas: afasia (trastorno del lenguaje), apraxia (deterioro de la capacidad para llevar a cabo actividades motoras pese a estar intacta la función motora), agnosia (fallo en el reconocimiento o identificación de objetos pese a estar intacta la función sensorial) y/o alteración en la función ejecutiva (por ejemplo: planificación, organización, secuenciación o abstracción).

En un intento para identificar más precozmente la EA se creó el concepto de Deterioro Cognitivo Leve (DCL), el cual hace referencia a los déficits cognitivos que superan al proceso de envejecimiento fisiológico normal pero que no cumplen los criterios de demencia (Schroder et al. 1998). Como tal se trata de una condición caracterizada por el déficit en una sola función cognitiva no asociado a otros signos de deterioro cognitivo o discapacidad en las actividades de la vida diaria (Petersen et al. 2001). Este concepto y la identificación del proceso a nivel clínico es especialmente importante ya que el DCL se presenta en las fases tempranas de la EA (Almkvist et al. 1998; Petersen et al. 1997) en las que se podría intervenir terapéuticamente para tratar de frenar el desarrollo de la enfermedad.

Si bien a nivel clínico sabemos que este deterioro cognitivo leve es el preámbulo en muchos pacientes de una EA, determinar cuándo y cómo se desencadenan los procesos de neurodegeneración y el papel que desempeñan en el curso de la enfermedad es a día de hoy una de las áreas de mayor interés. Desafortunadamente la información que se obtiene de la mayor parte de las muestras de tejidos humanos disponibles proceden de individuos fallecidos tras un tiempo prolongado de enfermedad, por lo que resulta muy difícil sacar conclusiones respecto a las fases iniciales de esta.

Disponer de un modelo animal natural en el que poder analizar los procesos que conducen a la enfermedad, y que sea de fácil acceso para su análisis, puede ayudar en gran medida a aportar información a este respecto. Hasta hace poco, los modelos más comunes eran los roedores y los primates no humanos. En ambos encontramos ventajas y desventajas, así, los roedores presentan alteraciones del comportamiento relacionadas con la edad, pero resulta complicado establecer la analogía entre estos y los que aparecen en humanos con EA, además su neuropatología es diferente. No obstante, pueden ser modificados

genéticamente para producir las proteínas relacionadas con la etiología de la EA. Hablamos, por supuesto, de modelos transgénicos. Sin embargo, la heterogeneidad de estos modelos es considerada como un posible factor de confusión. Esto genera dudas cuando las observaciones hechas en seres humanos deben interpretarse a la luz de los resultados conseguidos en estos animales y resulta difícil extrapolar la eficacia de nuevas terapias para EA probadas en ratones transgénicos (Sarasa y Pesini 2009).

Los primates no humanos presentan déficits cognitivos muy similares a los humanos con demencia y también muestran el mismo tipo de alteraciones neuroanatómicas. Sin embargo, son sumamente caros, difíciles de obtener y de mantener y tienen una vida media larga que dificulta realizar con ellos estudios longitudinales. Por otra parte, el uso de estos animales en experimentación es éticamente cada vez más controvertido (Adams et al. 2000a).

El perro ha sido propuesto como un excelente modelo natural para el estudio de la EA. Se trata de una especie que convive con nosotros desde la prehistoria lo que la hace muy cercana al hombre en su comportamiento y costumbres. La enorme población de perros domésticos permite acceder con relativa facilidad a individuos de todas las edades. En virtud de los avances veterinarios se ha alargado considerablemente la esperanza de vida de estos animales con lo cual aumenta la prevalencia de las enfermedades asociadas al envejecimiento. Además varios estudios han sugerido que el envejecimiento cognitivo en perros, de forma similar a lo que ocurre con seres humanos, puede ser clasificado en “envejecimiento normal o exitoso”, deterioro cognitivo leve y disfunción cognitiva o demencia (Adams et al. 2000a).

1.1. EL PERRO COMO MODELO DE ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

El perro se considera un modelo especialmente apropiado para el estudio del envejecimiento cerebral humano y también para enfermedades neurodegenerativas pues puede desarrollar, de forma natural, una disfunción cognitiva relacionada con la edad que es similar en muchos aspectos a la EA (Cummings et al. 1996b; Adams et al. 2000a; Head et al. 2002; Cotman y Head 2008; Head 2013). Son muchos los estudios que utilizaron al perro como modelo poniendo de manifiesto el deterioro de memoria, aprendizaje y otros déficits cognitivos, que aparecen en estos animales al envejecer (Cummings et al. 1996a; Cummings et al. 1996b; Adams et al. 2000b; Bain et al. 2001; Tapp et al. 2003; Siwak et al. 2005; Sarasa y Pesini 2009). Así mismo, tanto veterinarios como propietarios observaron cómo algunos ejemplares ancianos desarrollaban cambios comportamentales a menudo descritos como “seniles” para los que no se les encontraba una causa orgánica o estructural

obvia. Ruehl y sus colaboradores propusieron el término Síndrome de Disfunción Cognitiva (SDC) para describir estos déficits (Ruehl et al. 1995).

Este deterioro cognitivo en perros se ha relacionado con la extensión de depósitos amiloides en la corteza cerebral (Cummings et al. 1996c; Head et al. 1998; Colle et al. 2000; Bernedo et al. 2009). Curiosamente, se han encontrado depósitos de Aβ en la corteza cerebral, tanto en perros como humanos sin alteraciones cognitivas. Varios trabajos han sugerido que la patología amiloide es anterior a la sintomatología, en base a lo cual se diferencian tres estados en la EA: pre-sintomática, prodrómica (o deterioro cognitivo leve) y demencia.

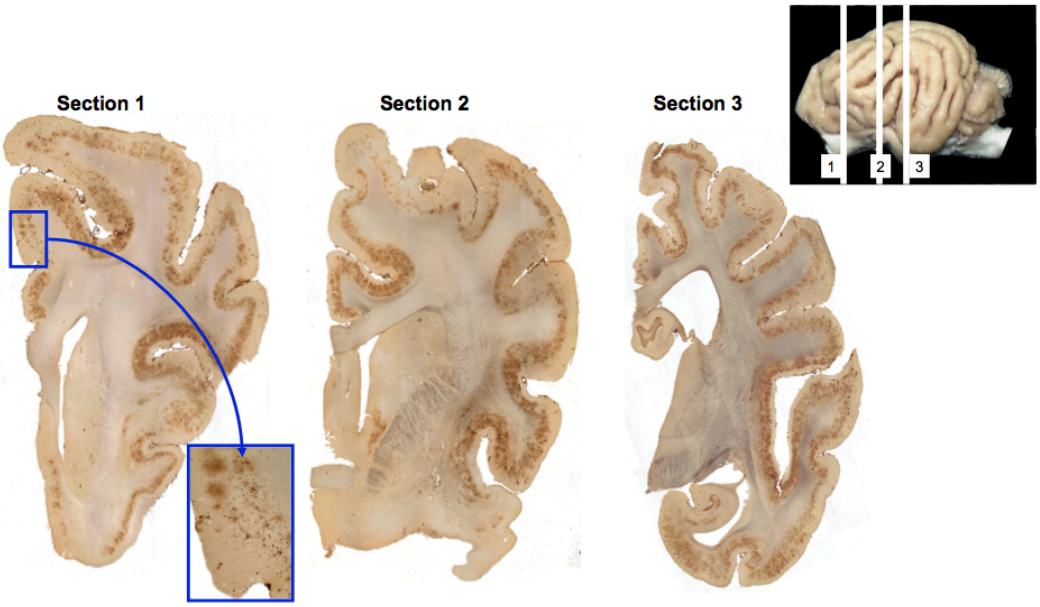


Figura 1: Secciones del cerebro de un perro pequinés de 20 años con deterioro cognitivo. El nivel de cada sección se muestra sobre la vista lateral del cerebro. Los depósitos de β-amiloide, visualizados mediante inmunohistoquímica con anticuerpo monoclonal 6E10 (Signet Lab. Dedham, EE.UU.), ocupan la mayor parte de la corteza cerebral y se localizan principalmente en las capas más profundas, cerca de la materia blanca. Estos depósitos se acompañan por la acumulación de amiloide en torno arteriolas y capilares (recuadro de Sección 1).

Se ha visto que en el cerebro de humanos y perros se producen cambios muy similares al envejecer, entre ellos además de los ya mencionados depósitos de Aβ (Wisniewski et al. 1970; Wisniewski et al. 1990; Cummings et al. 1993) encontramos cambios en los vasos cerebrales como fibrosis de las paredes vasculares, proliferación endotelial, mineralización, microhemorragias y angiopatía amiloide (Uchida et al. 1990; Sobin et al. 1992; Borrás et al. 1999), que van a comprometer el flujo sanguíneo cerebral y el uso de la glucosa. También encontramos, atrofia cortical (Su et al. 1998; Tapp et al. 2004), espesamiento y calcificación de las meninges, dilatación de los ventrículos (Shimada et al. 1992; Borrás et al. 1999), ampliación de los surcos y retracción de las circunvoluciones, reactividad de la glía (Shimada et al. 1992; Borrás et al. 1999), acúmulos de lipofuscina en las neuronas (Ferrer et

al. 1993), deterioro del sistema lisosomal (Migheli et al. 1992), pérdida de neuronas (Siwak-Tapp et al. 2008; Bernedo et al. 2009; Insua et al. 2010; Insua et al. 2012) y alteración a nivel de neurotransmisores produciéndose una depleción de acetil colina, noradrenalina, serotonina y dopamina y un incremento de la actividad de la monoamino oxidasa B (MAO-B) (Milgram et al. 1993; Hashizume et al. 2003).

No obstante, no se ha encontrado en cerebros de perros con SDC la presencia de placas neuríticas o seniles típicas (con núcleo denso y halo) y tampoco ovillos neurofibrilares como ocurre en los humanos con EA (West y Gundersen 1990; Ohm et al. 1997; Papaioannou et al. 2001). Por esta razón se considera que el modelo canino sería especialmente valioso para estudiar de forma asilada el comportamiento e influencia del Aβ en las fases iniciales de la EA (Cummings et al. 1996b).

1.2. SÍNDROME DE DISFUNCIÓN COGNITIVA EN EL PERRO

Por otra parte, y más allá de la traslación de los resultados a la medicina humana, el estudio del SDC es importante para la especie canina en sí misma, en primer lugar porque gracias a los adelantos en la nutrición y medicina veterinaria nuestros perros son más longevos con lo que el número de pacientes geriátricos en la clínica se ha incrementado considerablemente. En segundo lugar, porque pese a que la prevalencia del SDC están entre un 15 y un 35% (Osella et al. 2007; Azkona et al. 2009; Salvin et al. 2010; Yalcin et al. 2010) se trata de una patología infra-diagnosticada en la clínica, tanto porque todavía son pocos los propietarios que acuden a su veterinario porque los cambios de comportamiento de su perro anciano les preocupan (Salvin et al. 2010), como por el poco conocimiento por parte de los veterinarios de las herramientas clínicas para su sospecha o confirmación.

Los cambios de comportamiento que más comúnmente sufren los animales con SDC se corresponden con las siglas del acrónimo en inglés DISHA (Neilson et al. 2001; Landsberg et al. 2003; Osella et al. 2007). Además se han descrito otros síntomas como una disminución de la conducta de acicalamiento, y alteraciones del apetito (aumento o disminución). Se ha sugerido que, al igual que en el caso de personas con patologías neurodegenerativas, los perros con SDC podrían presentar anosmia (Cummings y Cotman 1995; Hirai et al. 1996). En el ambiente laboratorial se ha visto un claro detrimento en el aprendizaje, la memoria y las funciones ejecutivas y visuoespaciales (Adams et al. 2000a; Adams et al. 2000b; Tapp et al. 2003; Cotman y Head 2008).

D Desorientation	Algunos animales se pierden en lugares conocidos, intentan pasar por el lado equivocado de la puerta, son incapaces de esquivar ciertos obstáculos o se quedan parados delante de ellos.
I Interations	Las interacciones con personas o animales también pueden verse afectadas. Así, disminuye el interés por las caricias o el contacto, saludan con menos énfasis, aparecen conflictos sociales o hiperapego, etc.
S Sleep	Muchos de estos perros sufren alteraciones del ciclo sueño-vigilia, de forma que duermen más durante el día y no descansan por la noche.
H Housetrainig	En algunos casos se pierde el aprendizaje de la conducta de eliminación y el animal orina y/o defeca en sitios no adecuados en ausencia de cambios ambientales o de patologías médicas. También pueden perderse otras conductas aprendidas anteriormente (responde peor a órdenes) o perder el interés por actividades que antes realizaba.
A Acitivity	Puede observarse tanto una disminución de la actividad como un aumento de esta con comportamientos compulsivos y deambulación.

1.3. Diagnóstico del Síndrome de Disfunción Cognitiva en el perro

El diagnóstico de SDC en el perro se continúa haciendo mediante exclusión de otras patologías (Anexo I: Diagnóstico diferencial de patologías orgánicas) y el uso de cuestionarios a los propietarios, que si bien son herramientas útiles, no dejan de ser subjetivos. En la actualidad son varios los métodos que se están estudiando para conseguir un diagnóstico cada vez más objetivo y temprano:

1.3.1. Cuestionarios

Un cuestionario específico puede ser utilizado para ahorrar tiempo en la consulta e identificar problemas que probablemente los dueños no mencionarían a su veterinario, bien porque los consideran irrelevantes o porque los entienden como parte normal del envejecimiento de su mascota (Landsberg et al. 2003). Los cuestionarios deben ir acompañados siempre de un examen físico y pruebas laboratoriales para descartar causas orgánicas de comportamientos anormales. Así por ejemplo, investigadores franceses han desarrollado la escala de Evaluación del Envejecimiento Emocional y Cognitivo (EVEC) para dar al clínico un método más objetivo de diagnóstico y tratamiento (Pageat 2000). Los resultados obtenidos por distintos estudios señalan que existe una correlación significativa

entre las puntuaciones de EVEC y los depósitos de Aβ en cerebro, del mismo modo que también correlacionan los depósitos de Aβ y otros métodos de puntuación más subjetivos, como las escalas norteamericanas. Los perros con puntuaciones elevadas en la escala EVEC tenían depósitos de Aβ en el córtex temporal y en el hipotálamo (Colle et al. 2000).

En el test de Kiatipattanasakul (Kiatipattanasakul et al. 1996) se hace una correlación entre las puntuaciones de demencia del cuestionario, el número de células apoptósicas y la presencia de depósitos amiloides en cerebro. Se encontró una correlación significativa entre el número de células apoptósicas y las puntuaciones obtenidas, aunque no guardan relación con los depósitos amiloides observados.

Otros cuestionarios han sido utilizados en distintos estudios (Pugliese et al. 2005) para correlacionar las alteraciones cognitivas con los niveles de lactato y piruvato en líquido cefalorraquídeo (LCR). Su cuestionario consiste en una adaptación del EVEC (Colle et al. 2000) y del utilizado por Kiatipattanasakul (Kiatipattanasakul et al. 1996) y se encontraron correlaciones entre las puntuaciones de SDC para este test y los depósitos de Aβ en cerebro (Pugliese et al. 2005).

Rofina hace un estudio en el que emplea tres cuestionarios distintos, el suyo propio (Rofina et al. 2006) que se muestra en la Figura 2, el EVEC (Colle et al. 2000), y el de Kiatipattanasakul (Kiatipattanasakul et al. 1996), y observa que las puntuaciones de su cuestionario se correlacionaban con las de los otros dos y de forma superior con la mayoría de los datos patológicos. Los coeficientes de demencia de los tres cuestionarios correlacionan a su vez con los depósitos de amiloide en cerebro y con el daño oxidativo. Los coeficientes de demencia del EVEC y del cuestionario de Rofina correlacionan con el espesor de la corteza, de forma que a más puntuación presentaba el animal menor era el espesor de su corteza.

Recientemente ha sido publicado un nuevo cuestionario (Salvin et al. 2011) que si bien ha sido validado y aceptado por la comunidad científica no hay ningún estudio que correlacione sus puntuaciones con cambios fisiopatológicos o niveles de marcadores bioquímicos en plasma o LCR.

1	**APETITO**	
	Normal	**1**
	Disminuido	**2**
	Incrementado con diarrea	**3**
	Incrementado sin diarrea	**4**
2	**CONSUMO AGUA**	
	Normal	**1**
	Polidipsia	**3**
3	**INCONTINENCIA**	
	No incontinente	**1**
	Orina en el interior de la casa	**2**
	Orina y defeca en el interior de la casa	**4**
4	**RITMO DIURNO NOCTURNO**	
	Normal	**1**
	Sueño incrementado	**2**
	Duerme por el día y no descansa por la noche	**3**
5	**COMPORTAMIENTO SIN OBJETIVO**	
	No muestra este tipo de comportamiento	**1**
	Comienza a mostrar fijaciones	**2**
	Caminar estereotipado	**3**
	Círculos	**4**
6	**INTERACCION ACTIVIDAD**	
	Normal	**1**
	Disminuido	**2**
	No contacto con el medio ni propietario	**4**
7	**PERDIDA DE LA PERCEPCION**	
	No pérdida de la percepción	**1**
	Colisiona con los muebles	**2**
	Trata de pasar por espacios estrechos	**5**
	Trata de pasar a través de lado incorrecto de la puerta	**5**
8	**DESORIENTACION**	
	No desorientación	**1**
	Solo en paseos nuevos	**2**
	En paseos rutinarios	**4**
	En la propia casa	**5**
9	**MEMORIA**	
	Normal	**1**
	No reconoce a conocidos habituales	**2**
	No reconoce al propietario tras unas vacaciones	**4**
	No reconoce al propietario a diario	**5**
10	**CAMBIOS EN LA PERSONALIDAD**	
	No cambios	**1**
	Agresividad hacia otras mascotas o niños	**2**
	Agresividad hacia el dueño	**4**
	PUNTUACION TOTAL	
	DEMENCIA SCORE = PUNTUACION TOTAL - PUNTUACION NORMAL (10 PUNTOS)	

Figura 2: Cuestionario de Rofina para perros con posible SDC (Rofina et al. 2006).

Vemos pues, que se han elaborado un gran número de cuestionarios con notables diferencias entre ellos. Cabe señalar que, aunque se ha llegado a correlacionar la presencia de depósitos de Aβ en cerebro y otros cambios físicos con las puntuaciones de algunos de

los cuestionarios (Colle et al. 2000; Pugliese et al. 2006; Rofina et al. 2006), ninguno de ellos se ha correlacionado con los niveles de Aβ en sangre.

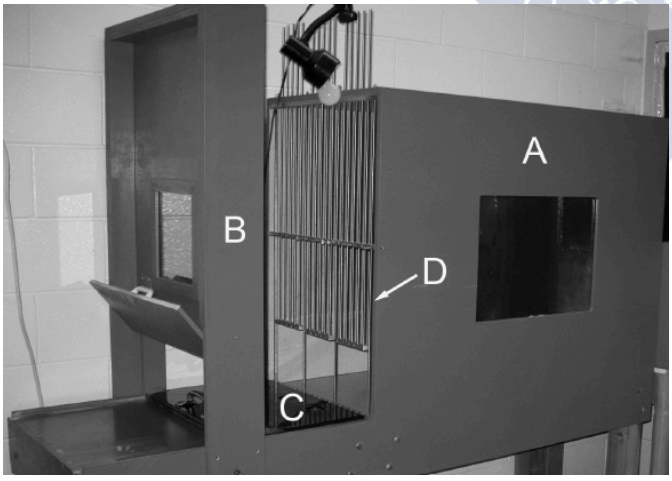
Uno de los objetivos de la presente tesis doctoral es elaborar un cuestionario a partir de los ya existentes y validarlo mediante la comparación con el cuestionario de Rofina, diversos test de comportamiento y el análisis de Aβ en sangre.

1.3.2. TEST

En un intento de profundizar en la comprensión de la enfermedad se han desarrollado numerosos test comportamentales. Estos test pueden ser utilizados para diferenciar distintos perfiles de comportamiento en función de la edad y del estado cognitivo del animal, ayudándonos así a distinguir entre animales ancianos sanos, dementes leves y dementes graves.

1.3.2.1. TEST DE APRENDIZAJE Y MEMORIA

Se trata de ensayos de comportamiento en los que se compara la capacidad para realizar distintas tareas con implicación cognitiva entre perros jóvenes y viejos. Mediante estos tests neuropsicológicos se logra evaluar la relación entre edad y capacidad cognitiva, caracterizar las bases neurobiológicas del SDC y valorar la necesidad de posibles intervenciones. Así mismo, gracias a ellos se han conseguido grandes avances en la comprensión del SDC y en el desarrollo de agentes terapéuticos para el tratamiento de esta enfermedad (Landsberg y Araujo 2005).



A: Alojamiento en el que se coloca el perro.

B: El experimentador se separa del perro por una pantalla con una espejo unidireccional y una puerta abatible.

C: Bandeja deslizante para la presentación de objetos.

D: El frente esta equipado con una verja con barras ajustables en altura en anchura a través deque el perro accede a la bandeja de estímulo, que contiene los pocillos.

Figura 3. Aparato para llevar a cabo los test neuropsicológicos (Toronto General Test Apparatus).

No obstante, su complejidad, la necesidad de un aparataje especializado (Figura 3) y requerimiento de entrenamiento previo en el que aprenden a desplazar un objeto en concreto para conseguir un premio de comida situado en un pocillo bajo el objeto en cuestión, los hace impracticables en el ámbito de la clínica veterinaria, por lo que se consideran como herramientas de investigación (Milgram et al. 1994; Head et al. 1998; Milgram et al. 1999; Landsberg y Araujo 2005; Landsberg 2005).

Son ejemplos de estos test el delayed nonmatching-to-position task (reconocimiento de cambio de posición retardado), el delayed nonmatching-to-sample (reconocimiento de cambio de muestra retardado), el discrimination learning (aprendizaje discriminativo) y el reversal learning (aprendizaje invertido).

1.3.2.2. TEST NO COGNITIVOS

Se entiende por funciones no cognitivas los diversos comportamientos que no implican explícitamente el aprendizaje y la memoria pero que podrían estar indirectamente relacionados con el estado cognitivo. Dentro de estos comportamientos cabe destacar la actividad de locomoción, las interacciones sociales y el comportamiento de exploración.

Open-field

El test de open-field (OF) se ha utilizado para estudiar la conducta de exploración y la locomoción de los animales, tanto para evaluar las diferencias de comportamientos entre perros jóvenes y ancianos, como para evaluar los efectos de ciertos tratamientos (Head y Milgram 1992; Head et al. 1997; Siwak et al. 2000; Siwak et al. 2001; Siwak et al. 2002; Araujo et al. 2004; Araujo et al. 2005).

Procedimiento

Se utiliza una sala estándar, generalmente de 3.66 x 3.66 m o 3.2 x 2.6 m, cuyo suelo está divido en cuadrados, de 61 x 61 cm o 64 x 65 cm, mediante un encintado negro que ayuda a localizar la posición exacta del animal en cada momento, se deja al animal solo en ella y se registra su actividad en vídeo.

Además de la locomoción se cuenta también la frecuencia de otras conductas como olfacción, micción, acicalamiento, vocalizaciones, postura a dos patas (el perro levanta las dos patas delanteras del suelo), salto (el perro levanta las 4 patas del suelo) y los periodos de inactividad (sentado, tumbado) (Head y Milgram 1992; Head et al. 1997; Siwak et al. 2001; Siwak et al. 2002)

En la bibliografía encontramos ciertas variaciones de este test:

1. **Interacción con humano:** el test es idéntico al descrito arriba pero se coloca una persona, conocida por el perro o no, sentada en el centro de la sala. La persona debe permanecer inmóvil e ignorar al animal. Se evalúan los mismos comportamientos que en el test anterior y además se mide la frecuencia de interacción con el humano, es decir las veces que el perro se acerca a la persona, la mira directamente y mueve el rabo.
2. **Test de curiosidad:** el test es idéntico al descrito para OF pero se coloca una serie de objetos en el suelo de la sala. Se evalúa también orinar sobre los objetos, coger los objetos, olerlos e interactuar con ellos.
3. **Test del espejo:** siguiendo el mismo protocolo que para el OF, se coloca un espejo en una de las paredes de la sala. Se evalúa el tiempo que pasa el animal reaccionando delante del espejo y la frecuencia de olfacción de este.
4. **Test de la silueta:** se coloca un pedazo de cartón negro con la forma de la silueta de un perro en una de las paredes. Se medirán los mismos parámetros que para el OF pero además se incluirá la frecuencia de olfateo de la región de la cabeza de la figura y de los cuartos traseros. Este test intenta valorar la respuesta social del animal ante un individuo de la misma especie.
5. **Test del modelo canino:** se coloca una figura muy realista con la forma de un Golden Retriever en el centro de la sala. Se mide el tiempo que pasa el perro olisqueando la figura.

Test del canil

Este test se realiza en los caniles de los perros de laboratorio (6.10 x 0.94 m) y dado que los caniles cuentan con dos animales se incluye una nueva variable: la interacción entre perros, que sustituye al acicalamiento. Simplemente se coloca una videocámara en un trípode enfrente del canil y se graba el comportamiento de los animales durante 10 minutos. El vídeo obtenido se analiza de forma similar al OF, evaluando la locomoción, inactividad, olfacción, eliminación, vocalización y salto (Siwak et al. 2002).

Todas estas pruebas son, hoy por hoy, meras herramientas de investigación así, el test OF nunca se ha probado en perros mascota, solo en un ambiente laboratorial controlado y el Test en el canil resulta imposible de aplicar fuera las instalaciones del centro de investigación.

Uno de los objetivos de la presente tesis ha sido trabajar en esta adaptación para intentar conseguir que estas herramientas de investigación se transformen en métodos diagnósticos de SDC y comparar sus resultados con los niveles de Aβ en sangre.

1.3.3. BIOMARCADORES

Con el objeto de realizar un diagnóstico temprano de la EA en humanos se han propuesto diferentes marcadores bioquímicos en base a los distintos procesos que intervienen en la fisiopatología de la enfermedad, entre ellos destacan los péptidos β-amiloides (Aβ), la proteína TAU, la apolipoproteína E, la homocisteína y el lactato-piruvato.

La medición de Aβ en plasma, en sus formas Aβ40 (contiene 40 aminoácidos) o Aβ42 (contiene 42 aminoácidos) ha sido propuesta como método diagnóstico no invasivo para diferenciar enfermos de Alzheimer leves de los sanos.

Las proteínas Aβ se encuentra en la circulación sanguínea, fluido intersticial cerebral y LCR de forma libre o unido a diferentes transportadores como apolipoproteinas J (apoJ) (Matsubara et al. 1995) y apolipoproteinas E (apoE) (Yang et al. 1997), transtiretina (Schwarzman et al. 1994), lipoproteínas (Matsubara et al. 1999) albúmina (Biere et al. 1996) y α2-macroglobulinas (α2M) (Du et al. 1997). Estas proteínas son el resultado de la proteólisis, llevada a cabo por las enzimas β y γ secretasas, de una proteína transmembrana denominada proteína precursora de amiloide (PPA) (Selkoe 1994).

Pese a que el Aβ soluble es un componente natural de la sangre y del LCR, varios estudios in vitro sugieren que pudieran tener efectos tóxicos sobre los componentes encargados de la contracción y relajación de las paredes de los vasos sanguíneos (Thomas et al. 1996; Niwa et al. 2000).

La formación de depósitos de Aβ en cerebro comienza muchos años antes, aproximadamente dos décadas, de la aparición de los primeros síntomas de demencia. Alrededor del 30% de las personas cognitivamente normales mayores de 65 años presentan ya depósitos amiloides en su cerebro que pueden detectarse mediante tomografía por emisión de positrones (PET) o indirectamente mediante análisis de LCR (Sperling et al. 2011). La presencia de estos depósitos se asocia a un deterioro cognitivo más rápido y mayor mortalidad (Vos et al. 2013). De hecho, se sabe que la formación de placas de Aβ en cerebro se asocia con neurodegeneración en pacientes con esta enfermedad.

Los componentes más importantes de las placas de Aβ son Aβ40 y Aβ42. El Aβ42 es la forma que se deposita en primer lugar en cerebro, es la predominante en las placas de

amiloide y es la más tóxica (Iwatsubo et al. 1994; Rosenberg et al. 1997). El Aβ40 es una forma más soluble que el Aβ42 por lo que la encontramos en mayor medida en sangre, LCR y cerebro y se deposita más tarde formando fundamentalmente depósitos peri-vasculares (Seubert et al. 1992).

Como ya se ha mencionado las proteínas Aβ pueden ser medidas en plasma. De hecho, varios estudios han visto que se encuentran elevadas en pacientes con EA (Mehta et al. 2000; Mayeux et al. 2003), tanto en su forma familiar como en la esporádica (Rosenberg 2000).

Dado que la formación de depósitos de Aβ en cerebro es un evento temprano en la patogénesis de la EA, se ha sugerido que los niveles de Aβ40 y Aβ42 en plasma aumentan antes de que aparezcan los síntomas, así varios estudios han propuesto la medición de los niveles de Aβ en plasma como un método no invasivo, de elevada especificidad y sensibilidad para diferenciar entre pacientes sanos y pacientes con demencia leve (Mehta et al. 2000; Mayeux et al. 2003; Assini et al. 2004; Sobow y Kloszewska 2005; van et al. 2006; Blasko et al. 2008; Lopez et al. 2008; Schupf et al. 2008; Xia et al. 2009; Cosentino et al. 2010).

Se ha visto que los niveles de Aβ40 y Aβ42 en plasma aumentan en pacientes no dementes que posteriormente evolucionan a enfermos de Alzheimer (Mayeux et al. 2003; van et al. 2006). Otros estudios nos muestran que el incremento en plasma de los niveles de Aβ40 junto con la bajada del ratio Aβ42/Aβ40 son predictivos de EA en pacientes sanos pero no de demencia vascular (Van et al. 2006). Por otra parte, también encontramos trabajos que muestran que ni Aβ40 ni Aβ42 son predictivos de EA, pero sí lo sería la ratio Aβ42/Aβ40 (Graff-Radford et al. 2007).

Las concentraciones de Aβ42 disminuyen en el LCR de los pacientes con EA, mientras que los niveles de Aβ40 permanecen normales. Es posible que esto se deba a que el Aβ42 se deposita primero en cerebro (Galasko et al. 1998; Andreasen et al. 2001). Así pues, el ratio Aβ42/Aβ40 en LCR podría discriminar mejor entre pacientes con EA y pacientes sanos que el valor de Aβ42 medido de forma aislada (Andreasen et al. 2001). No obstante, estos datos están basados en estudios de corte transversal. Estudios longitudinales han mostrado una gran variabilidad en los niveles de Aβ en cerebro. Algunos han demostrado que los valores disminuyen con el tiempo (Kanai et al. 1998), mientras que otros dicen que aumentan (Bouwman et al. 2007).

Apenas hay estudios sobre los niveles de Aβ en perro. Head y su equipo realizaron un trabajo en el que encontraron que los niveles en LCR de Aβ40 permanecían estables con la

edad, mientras que los niveles de Aβ42 disminuían de forma llamativa y el ratio aumentaba. Además, los niveles bajos de Aβ42 en LCR se correlacionaron con una importante cantidad de depósitos de Aβ42 y Aβ40 en cerebro (Head et al. 2010). Este comportamiento del Aβ es muy similar al encontrado en humanos con EA.

1.3.4. DIAGNÓSTICO POR IMAGEN

Con la finalidad de conseguir un diagnóstico fiable y no invasivo en animales con SDC y personas con EA las técnicas de diagnóstico por imagen forman parte de las pruebas complementarias utilizadas durante la evaluación clínica de estos individuos.

Tomografía axial computarizada

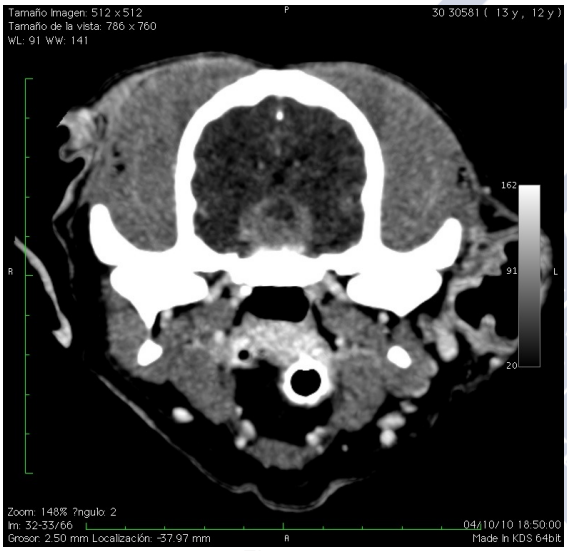


Figura 4

La tomografía axial computarizada (TAC) permite obtener imágenes de secciones de un sujeto, de forma que se puede visualizar directamente la estructura interna. Los principios básicos del TAC son similares a los de la radiografía en cuanto a que se utilizan rayos X para crear un mapa de atenuación del paciente (Thrall 2003).

En los pacientes con SDC generalmente se usa para descartar otras causas de alteraciones cognitivas como tumores intracraneales (Figura 4) o hidrocefalia.

Resonancia magnética

A diferencia de las radiografías y el TAC, que utilizan rayos X, la resonancia magnética (RM) utiliza imanes y ondas de radio potentes. Las señales del campo magnético rebotan del cuerpo y son enviadas a una computadora, donde son convertidas en imágenes. Los diferentes tipos de tejidos devuelven señales distintas (Thrall 2003).

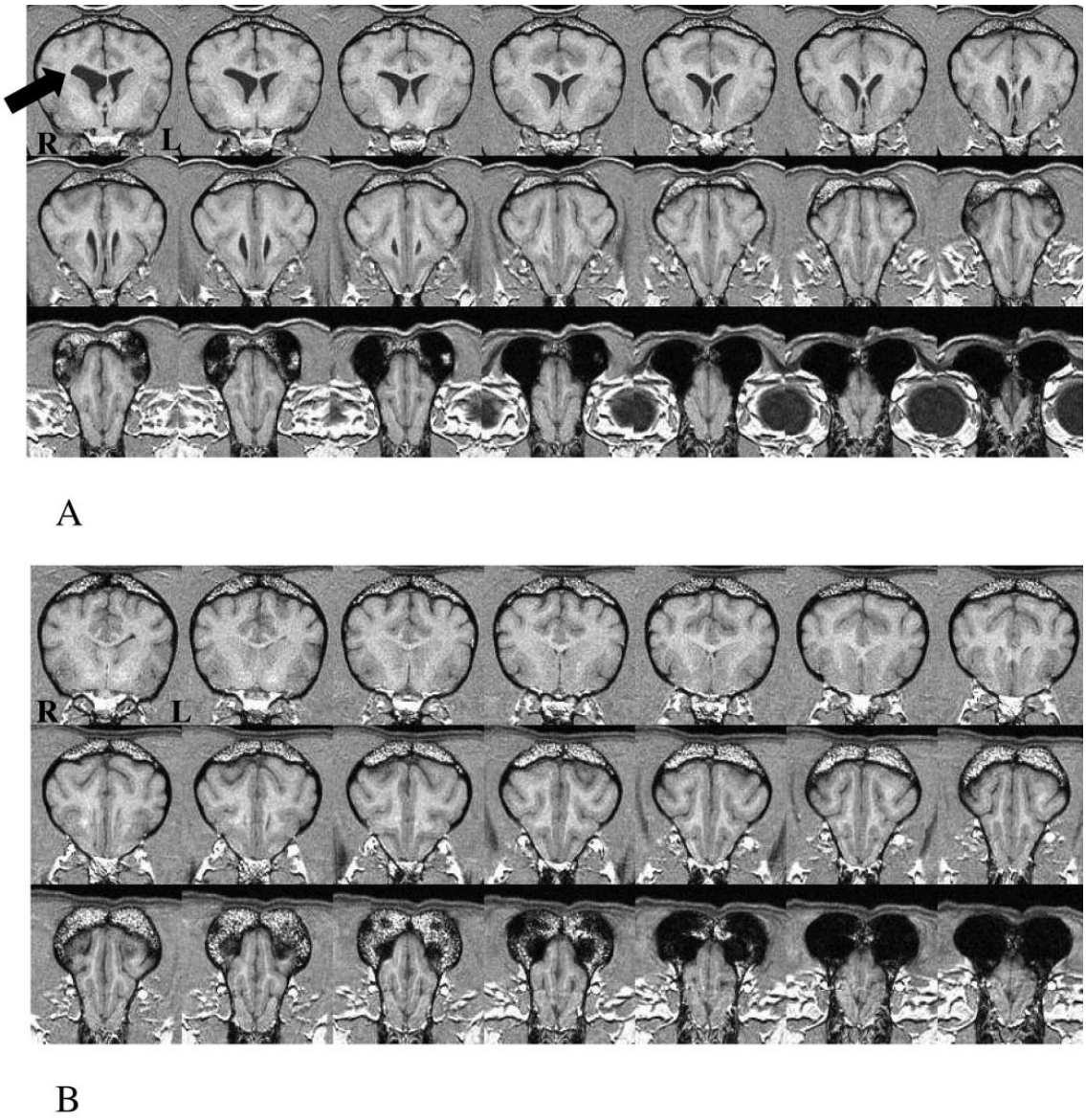


Figura 5: Resonancia magnética de un cerebro de perro anciano (A) y joven (B). En ellas se calcula, de izquierda a derecha, los volúmenes de los hemisferios frontales y de los ventrículos (Tapp et al. 2004).

Se ha utilizado para detectar cambios neuroanatómicos y cerebrovasculares en perros de edad avanzada. Así se ha visto en RM como los perros ancianos muestran agrandamiento de los ventrículos y atrofia cortical (Su et al. 1998). No obstante, son cambios que aparecen en el envejecimiento normal del perro y que no correlacionan con la presencia de alteraciones neurológicas (Esteve-Ratsch et al. 2001).

En un estudio realizado por Tapp y su equipo se ha visto como en perros ancianos aparece una atrofia del lóbulo frontal que correlaciona con alteraciones del control inhibitorio del animal y con trabajos que implican usar la memoria de una forma compleja, así mismo también aparece una correlación significativa entre la disminución del volumen del lóbulo

frontal (Figura 5) y el incremento de la acumulación de Aβ en el córtex frontal. Se encontró también que la presencia de atrofia hipocampal correlaciona con alteraciones en la memoria pero no con una disfunción del control inhibitorio del animal (Tapp et al. 2004).

En la clínica diaria, se usa la RM, en pacientes con SDC para descartar otras patologías que puedan cursar con alteraciones cognitivas como tumores intracraneales, hidrocefalia o alteraciones vasculares.

Tomografía por emisión de positrones

La tomografía por emisión de positrones (PET) es una de las técnicas de imagen que pueden detectar concentraciones de compuestos radiomarcados de forma no invasiva (Volkow et al. 1991). Dado que las imágenes de PET proporcionan una evaluación precisa de las funciones de un organismo vivo, el análisis de imágenes de PET se puede utilizar tanto en investigación básica como en evaluaciones clínicas para evaluar la funcionalidad y organización cerebral.

El PET se utiliza en neurología humana para diagnosticar masas intracraneales, localizar lesiones antes de una cirugía, evaluar la función cerebral y localizar un infarto cerebral y valorar un pronóstico. En investigación psiquiátrica se utiliza para detectar anormalidades funcionales o neuroquímicas. Así, se ha usado para el estudio de patologías como el trastorno obsesivo compulsivo (TOC) y la EA. En pacientes con EA se ha detectado una disminución significativa de la captación de glucosa en la corteza frontal, temporal, parietal y occipital en comparación con personas sanas (Yamaji et al. 2000).

La ciencia veterinaria se ha valido de los estudios hechos con PET en medicina humana para entender mejor ciertas patologías animales como el SDC y los trastornos compulsivos caninos, que presentan una alta similitud con el TOC.

Pese a que se trata de una técnica muy costosa y que su uso en veterinaria es meramente experimental, ya existen nuevos estudios que sugieren que esta técnica podrá ser usada en un futuro en para el estudio de enfermedades comportamentales como SDC, trastornos compulsivos y ansiedades (Irimajiri et al. 2010). Recientemente Araujo y sus colaboradores presentaron un atlas cerebral para evaluación de pacientes con SDC usando PET (Araujo et al. 2013).

Tomografía computarizada por emisión de fotones individuales

La tomografía computarizada por emisión de fotones individuales (SPECT) es muy parecida a una TAC pero utiliza una cámara sensible a los rayos gamma y no a los rayos X. Como en una radiografía, cada una de las imágenes que se obtienen es bidimensional, pero pueden combinarse muchas imágenes tomadas desde distintas posiciones alrededor del paciente para obtener una imagen tridimensional. Esta imagen tridimensional puede después manipularse informáticamente para obtener secciones dimensionales del cuerpo en cualquier orientación.

El SPECT utiliza los rayos gamma que producen isótopos radioactivos como el tecnecio 99m. Estos isótopos se introducen en el cuerpo animal como parte de moléculas biológicamente activas y se unen a receptores químicos. El procedimiento es similar al de la PET, pero en el SPECT es el isótopo el que produce directamente el rayo gamma.

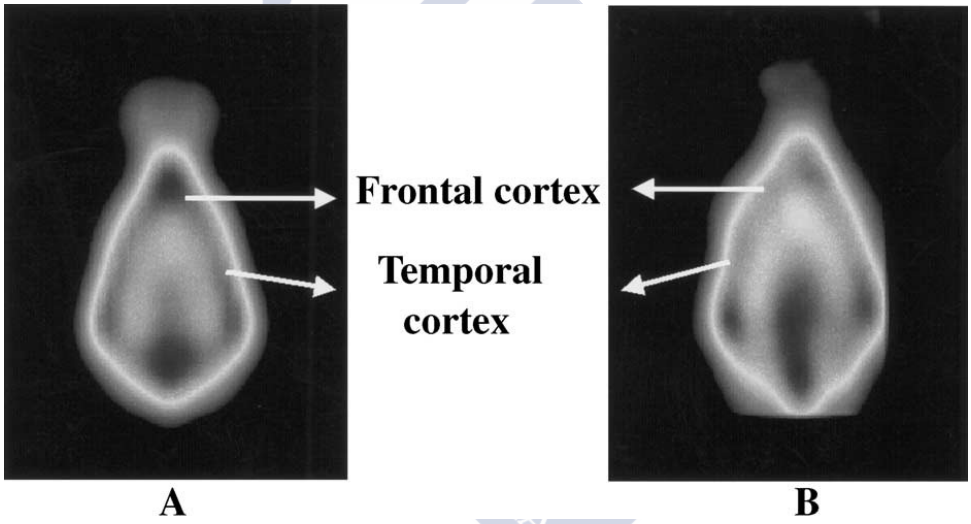


Figura 6. Imágenes de SPECT del encéfalo de perro en las que se observa una disminución de la perfusión de las regions fronto y temporocorticalen un perro anciano (B) comparado con un perro sano (A). (Peremans et al. 2002).

Encontramos ya estudios que utilizan el SPECT para comprobar como la perfusión cerebral disminuye significativamente en perros ancianos con respecto a los animales jóvenes, en las regiones frontal, temporocortical y subcortical (Peremans et al. 2002). Lo mismo se ha visto en muchos estudios en humanos tanto a nivel de perfusión global como de metabolismo cerebral (Markus et al. 1993; Petit-Taboue et al. 1998). Así se ha visto que con la edad disminuye la unión de los isotopos a receptores serotoninérgicos en la región frontocortical (Peremans et al. 2002; Peremans et al. 2005). En humanos se ha encontrado resultados similares en todo el neocórtex (Baeken et al. 1998).

Existen también nuevos estudios que sugieren que esta técnica podrá ser usada en un futuro para el estudio de enfermedades comportamentales como SDC y trastornos compulsivos, mediante la valoración del metabolismo de las neuronas dopaminérgicas (Vermeire et al. 2011).

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

JUSTIFICACION DEL TEMA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

JUSTIFICACION DEL TEMA

La instauración de pruebas diagnósticas objetivas que ayuden a la detección de las primeras fases del Síndrome de Disfunción Cognitiva sería de gran ayuda tanto en la clínica veterinaria como para la traslación a la medicina humana de los resultados obtenidos.

En ese sentido nos planteamos profundizar en el desarrollo de cuestionarios para el diagnóstico del Síndrome de Disfunción Cognitiva y valorar su sensibilidad para poder utilizarlos como variable principal de eficacia en los ensayos clínicos de nuevas terapias frente al Síndrome de Disfunción Cognitiva. En esa línea tratamos de comparar el rendimiento de estos cuestionarios con test cognitivos objetivos que pudieran realizarse en el ámbito de la clínica veterinaria y con test de open-field con el objetivo de obtener perfiles de comportamiento que podrían ayudar a caracterizar el cuadro clínico en animales ancianos.

Además, para profundizar en el conocimiento del Síndrome de Disfunción Cognitiva, en particular de la implicación de los péptidos β-amiloide en la fisiopatología de su enfermedad, así como su posible utilización como biomarcadores en estos ensayos clínicos y con fines de apoyo al diagnóstico clínico, decidimos estudiar su evolución en perros jóvenes, maduros y viejos con y sin deterioro cognitivo.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

OBJETIVOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

OBJETIVOS

- Evaluar los niveles plasmáticos de Aβ40 y Aβ42 en 4 grupos de animales: jóvenes, adultos, ancianos sanos y ancianos dementes.
- Evaluar los efectos de la edad y severidad de la disfunción cognitiva en el comportamiento locomotor y exploratorio de los perros.
- Evaluar los efectos de la edad y severidad de la disfunción cognitiva en el comportamiento social de los perros.
- Evaluar los efectos de la edad y severidad de la disfunción cognitiva mediante dos tests cognitivos simples ejecutados en el ambiente clínico.
- Desarrollar un protocolo diagnóstico para el Síndrome de Disfunción Cognitiva.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MATERIAL Y METODOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

MATERIAL Y METODOS

Los animales empleados en estos estudios fueron asistidos en el Hospital Veterinario Universitario de la Facultad de Veterinaria de Lugo (Hospital Veterinario Universitario Rof Codina) y en el Hospital Veterinario Universitario de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza con el consentimiento y conocimiento de sus propietarios.

Todos los procedimientos llevados a cabo fueron aprobados por el comité ético de la Universidad de Santiago de Compostela. Además, los animales fueron tratados conforme a las legislaciones Europea y Española en lo referido a manejo animal (86/609/EU, Real Decreto 1201/2005).

Previa a la inclusión en el estudio, los pacientes fueron sometidos a un examen físico y neurológico a fin de descartar patologías que pudiesen generar sintomatología semejante al SDC (Anexo I diagnóstico diferencial de patologías orgánicas). Una vez superado este primer requisito se realizó un hemograma y perfil bioquímico, incluyendo la medida de hormonas tiroideas. Los perros que presentaban déficits sensoriales o de movilidad graves, hipotiroidismo o hiperadrenocorticismo no tratado fueron excluidos del estudio.

La clasificación del estado cognitivo fue llevada a cabo mediante un cuestionario observacional al propietario (Anexo 2: Total Dysfunction Score TDS) elaborado a partir de modelos anteriormente publicados (Ruehl y Hart 1998; Colle et al. 2000; Azkona et al. 2009). Este cuestionario contiene un total de 22 ítems relacionados con el comportamiento y las funciones cognitivas de los animales y que se agrupan en cuatro categorías:

1. Ciclo de sueño y vigilia
2. Interacción socio-ambiental
3. Eliminación inadecuada
4. Desorientación

Los propietarios contestaron "sí" o "no" a cada ítem comparando el comportamiento del animal con el que tenía cuando era joven. Además puntuaron la afectación de cada categoría desde el 0 (nada afectada) hasta el 4 (afectación severa). Se consideró una categoría como afectada si tenía una puntuación ≥1 y como mínimo un ítem afectado. Finalmente los perros fueron clasificados como dementes si tenían 2 o más categorías afectadas y si la puntuación total del cuestionario dada por el sumatorio de las puntuaciones de cada categoría era igual o superior a 2. Se consideró que los animales con puntuaciones entre 2 y 5 padecían una disfunción cognitiva leve y aquellos con puntuaciones iguales o superiores a 6 padecían una demencia severa

Simultáneamente también se cubrió el cuestionario elaborado por Rofina para cada animal (Rofina et al. 2006).

4.1. Plasma β-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease.

Se midieron los niveles plasmáticos de los péptidos Aβ40 y Aβ42 en el envejecimiento normal y patológico (SDC) en la especie canina, así como en animales jóvenes y de mediana edad.

En el estudio se incluyeron 88 animales que fueron divididos en los siguientes grupos:

1. Jóvenes (del inglés young YG) de entre 1 y 4 años de edad, n=9.
2. De media edad (del inglés middle age MA) de entre 5 y 8 años, n=10.
3. Ancianos no dementes (del inglés cognitively unimpaired aged CU), mayores de 8 años de edad, n=31.
4. Ancianos dementes (del inglés cognitively impaired aged CI), mayores de 8 años de edad, n=38. Así mismo, este grupo se dividió en animales con disfunción cognitiva severa (del inglés severe cognitively impaired sCI) y leve (del inglés mild cognitively impaired: mCI).

Para medición del Aβ se extrajeron muestras de 5 ml de sangre, de la vena yugular o cefálica y se depositaron en tubos de polipropileno, con EDTA y con un inhibidor de

proteasas. Previa centrifugación de las muestras, se congeló el plasma a -80ºC hasta su posterior análisis.

La determinación de Aβ40 y Aβ42 fue llevada a cabo mediante técnicas de Elisa Sándwich (Araclon Biotech). Cada ELISA está compuesto por un anticuerpo de captura que se une al extremo N-terminal de Aβ y el correspondiente anticuerpo de detección que se unen al extremo C-terminal de Aβ40 o Aβ42, respectivamente.

Los análisis se hicieron siempre por triplicado y la determinación mediante ELISA se repitió en dos días diferentes. Las medias para los coeficientes de variación entre ambos ensayos fue de 7.84% para Aβ42 y de 13.07% para Aβ40. Además, mediante el test de Wilconxon, no se encontraron diferencias significativas para los niveles de Aβ40, Aβ42 y ratio Aβ42/40 medidos en ambos ensayos.

Procesado de los datos

Finalmente los datos recogidos fueron rescritos en sintaxis SPSS y analizados con SPSS versión 15.0 para Windows (SPSS, Inc.).

La comparación de los niveles de Aβ40, Aβ42 y ratio Aβ42/40 para los distintos grupos de animales fue realizada mediante el test U Mann-Whitney. Las correlaciones se analizaron utilizando la correlación de Spearman. El test Chi-cuadrado se utilizó para comparar la distribución para las categorías demográficas y las distintas variables cognitivas entre los grupos de animales. Las diferencias para los niveles de bioquímica sérica se calcularon mediante ANOVA o test de Kruskal-Wallis, si las variables eran paramétricas o no paramétricas respectivamente. Las curvas ROC se utilizaron para valorar la exactitud de las variables dependientes en clasificar la ausencia o presencia de SDC.

4.2. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs. Locomotor and exploratory behavior (part I). Social responsiveness (part II).

Se trata de un estudio que por su extensión fue dividido en dos publicaciones, de acuerdo con el comportamiento locomotor y exploratorio y el comportamiento social.

En ellas se intentó evaluar los efectos de la edad y severidad de la disfunción cognitiva en el comportamiento locomotor y exploratorio de los perros, para lo que se incluyeron 85 de los 88 animales del estudio anterior. Estos fueron divididos en los siguientes grupos:

1. Jóvenes (del inglés young: YG) de entre1 y 4 años de edad, n=9.
2. De media edad (del inglés middle age: MA) de entre 5 y 8 años, n=9).
3. Ancianos no dementes (del inglés cognitively unimpaired aged: CU), animales mayores de 8 años de edad, n=31.
4. Ancianos dementes (del inglés cognitively impaired aged: CI), animales mayores de 8 años de edad, n=36. Así mismo, este grupo se dividió en animales con disfunción cognitiva severa (del inglés severe cognitively impaired: sCI, n=16) y leve (del inglés mild cognitively impaired: mCI, n=20).

Se utilizó una habitación de dimensiones 2.07 x 2.76 m cuyo suelo está dividido en 12 cuadrados de 69 x 69 cm y en cuyo techo se coloca una cámara con un gran angular que permite grabar los movimientos del animal. Con el fin de facilitar el análisis a cada cuadrado se le asignó un número y se utilizó el software Fortran-77 para medir la frecuencia y duración de los distintos comportamientos.

La sala y todos los objetos utilizados se limpiaba con un detergente enzimático antes y después de cada test para eliminar cualquier olor que pudiese distraer al animal.

Se realizaron los siguientes test:

- Test de open-field (OF)
- Test de curiosidad (TC)
- Test de interacción con humano (TIH)
- Test del espejo (TE)

Cada test tuvo una duración de 3 minutos. Se dejó un periodo de descanso entre test de 5 minutos en los que el perro paseaba con su dueño.

Los test OF y TC Se describen con detalle en la publicación dos y el TE y el TIH son objeto de la publicación 3.

En el OF se coloca al animal en la entrada de la sala y se examina su comportamiento locomotor y exploratorio en ausencia de estímulos (Figura 7).

En el TC, previa a la entrada del perro en la sala se colocan tres objetos en el centro de esta: un kong, un peluche y una cubitera de silicona. Estos se limpiaban siempre antes de cada test con un detergente enzimático. Se estudió la reacción de los animales frente a los nuevos objetos (Figura 8).



Figura 7: Test de open-field

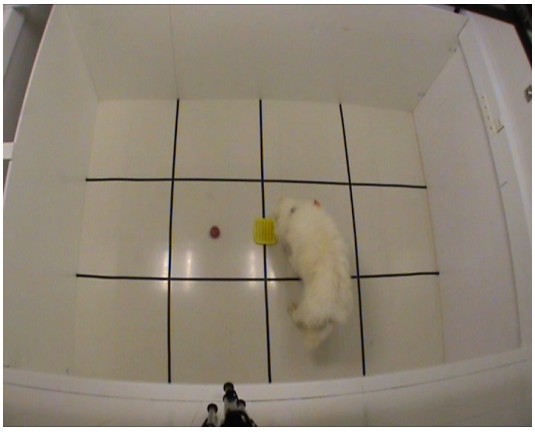


Figura 8: Test de curiosidad

En el TIH, una persona desconocida para el animal se sienta en el centro de la sala antes de que este entre. La persona está entrenada para no responder a ninguna de las demandas de atención del perro y estar quieta durante los tres minutos que dura el test. Se valoró la reacción de los animales hacia la persona desconocida (Figura 9).

En el TE, se colocó un espejo de dimensiones 90 x 90 cm en una pared de la sala, en contacto con el suelo, de forma que el animal pudiese ver su propio reflejo. Se examinó el comportamiento de los perros delante del espejo (Figura 10).

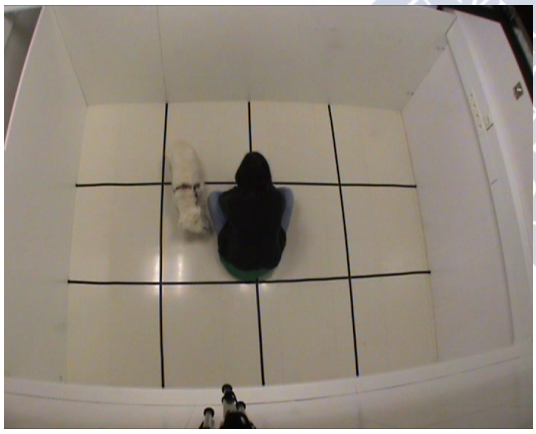


Figura 9: Test de interacción con humano.



Figura 10: Test del espejo.

Se filmaron los comportamientos de locomoción, exploratorios y afiliativos de los animales durante 3 minutos en la sala de open-field. Los vídeos fueron analizados posteriormente por dos observadores (BR y AGM) para los que no se encontraron diferencias significativas.

De todos los comportamientos se hizo una selección, de manera que se excluyeron aquellos comportamientos que se expresaban en muy baja frecuencia y se terminaron por seleccionar aquellos que resultaban más aclaratorios, es decir, que denotaban una alta

correlación con el resto de variables a través de los test y de los grupos. Los comportamientos analizados se expresan en la tabla 1. Así mismo, es necesario explicar que todos los comportamientos analizados en OF fueron analizados también en el resto de los test.

Procesado de los datos

Los datos recogidos fueron rescritos en sintaxis SPSS y analizados por el programa SPSS versión 17.0 para Windows (SPSS, Inc.).

Se empleó el test Tukey HDS post hoc o el test U de Mann-Whitney para calcular las diferencias entre las medias en variables cuantitativas para los grupos de individuos. Además, el test t de Student o el test Wilcoxon signed-rank se realizó para detectar variaciones intragrupos. Para la distribución de las variables cualitativas se empleó el test Chi-cuadrado.

	TEST	Comportamientos medidos
Vocalizaciones	OF	Número total de ladridos, gemidos, aullidos.
Tiempo total en el área de la puerta	OF	Tiempo total (en segundos) que el animal pasa en los cuadrados que están enfrente de la puerta
Media del tiempo en el área de la puerta	OF	Media de tiempo en el que el animal está en el área de la puerta cada vez que entra en esta
Actividad locomotora	OF	Total de cuadrados en los que entra el animal. Se considera que el animal entra en un cuadrado cuando sitúa sus dos extremidades delanteras en él
Actividad locomotora en el área central	OF	Proporción (%) de la actividad locomotora manifestada en los cuadrados del centro de la sala
Inmovilidad	OF	Tiempo total (en segundos) que el animal pasa sentado o tumbado sin realizar otros comportamiento a excepción de vocalizar
Comportamientos dirigidos a la puerta	OF	Número total de episodios de comportamientos dirigidos a la puerta: rascado, olfacción, salto, postura a dos patas, freezing
Comportamientos dirigidos a las esquinas	OF	Número total de comportamientos de olfateo o quedarse quieto contra las esquinas de la sala
Juego	TC	Número total de comportamientos de juego dirigidos hacia los objetos situados en la sala: empujar, morder o introducir en la boca el juguete, lazarlo, etc. Tropezar con el juguete mientras el animal camina no se consideró como juego
Olfacción de objetos	TC	Número total de episodios en los que el animal olfatea el objeto
Cohesión-inmovilidad	TIH	Número total de episodios en los que el animal permanece tumbado o sentado, en contacto físico virtual con la persona del test
Interacciones activas	TIH	Número total de episodios en los que el perro inicia un contacto físico con la persona trepando, empujando con la cabeza y o lamiendo la cara de esta
Tiempo total en el área del espejo	TE	Tiempo total (en segundos) que el animal pasa delante del espejo
Actividad locomotora en el área del espejo	TE	Proporción (%) de la actividad locomotora ejecutada en el área del espejo

Tabla 1: Comportamientos analizados

4.3. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on two simple cognitive tasks in pet dogs.

En el estudio se incluyeron 87 de los 88 animales que fueron divididos en los mismos grupos que en los estudios anteriores (YG, MA, CU, CI, y este último a su vez en mCI y sCI). Dado que no se encontraron diferencias significativas entre los animales jóvenes y de mediana edad para las diferentes variables analizadas, estos fueron tratados como un único grupo de animales de edad <9 años. Los grupos de animales quedaron así:

1. Jóvenes y animales de mediana edad (YM) de entre 1 y 9 años de edad, n=19.
2. Ancianos no dementes (del inglés cognitively unimpaired aged: CU) mayores de 8 años de edad, n=31.
3. Ancianos dementes (del inglés cognitively impaired aged: CI), mayores de 8 años de edad, n=37. Así mismo, este grupo se dividió en animales con disfunción cognitiva severa (del inglés severe cognitively impaired: sCI=17) y leve (del inglés mild cognitively impaired: mCI=20).

Se llevaron a cabo dos test cognitivos basados en test previamente publicados pero no validados (Coren 1994) consistentes en:

4.3.1. Test de búsqueda de comida

El test de búsqueda de comida (del inglés Food Searching) valora la capacidad del animal para recordar la localización de un pedazo de comida tras un breve periodo de tiempo.

El propietario se instala en el centro de la consulta con su perro sujeto por la correa. El investigador le enseña un pedazo de comida al perro y lo sitúa en una esquina de la habitación mientras mantiene contacto visual y se comunica con él (Figura 11). Una vez el investigador deja el pedazo de comida en suelo se permite que el perro lo observe durante 2-3 segundos. Inmediatamente después el propietario y el perro salen de la sala durante 15 segundos (Figura 12), tras los cuales se vuelven a colocar en el mismo punto de partida y el animal es liberado para que pueda buscar la comida (Figura 13). En este caso ni el dueño del animal ni el investigador pueden hacer señas o comentarios para alentar al perro en su búsqueda.



Figura 11: El perro se situa en el medio de la consulta y se le enseña el premio.



Figura 12: El perro sale de la consulta unos segundos.



Figura 13: El perro es liberado para buscar el pedazo de comida.

El test se repite un máximo de tres veces y una vez el animal consigue la comida se da por finalizado.

Así un animal puede obtener las siguientes puntuaciones:

- El animal va directamente hacia la comida: 1 punto.
- El animal busca la comida y la encuentra en un plazo de 1 minuto: 2 puntos.

- El animal busca la comida pero no la encuentra en un plazo de 1 minuto: 3 puntos.
- El animal no hace intentos por buscar la comida: 4 puntos.

Finalmente el animal obtiene una puntuación total (FS score) que es la suma de las puntuaciones obtenidas durante los tres intentos. Esta puede ir de 1 a 12 puntos.

4.3.2. Test de resolución de problemas

El Test de resolución de problemas (del inglés Problem Solving)valora la capacidad del animal para obtener comida mediante la manipulación de un objeto lo cual puede reflejar la habilidad de aprendizaje procedimental.

El investigador enseña al perro un pedazo de comida y deja que este lo huela y lo lama de su mano. Luego lo coloca en el suelo y lo cubre con una caja de plástico transparente. Entonces se le deja al perro un tiempo de 2 minutos para conseguir la comida (Figura 14). En este test el propietario puede alentar al perro con comentarios o señas.



Figura 14: El perro intenta sacar la comida de debajo de la caja.

La prueba se realiza solo una vez y el animal puede obtener las siguientes puntuaciones:

- Consigue la comida en un plazo de 2 minutos: 1 punto.
- El perro hace intentos pero no consigue la comida en un plazo de 1 minuto: 2 puntos.
- Tan solo olisquea la caja pero no hace ningún otro intento de conseguir la comida: 3 puntos.
- No hace ningún intento por conseguir la comida: 4 puntos.

Procesado de los datos

Los datos fueron rescritos en sintaxis SPSS y analizados por el programa SPSS versión 17.0 para Windows (SPSS, Inc.).

La distribución de las variables cualitativas fue calculada por el test Chi-cuadrado o por el test exacto Fisher cuando las frecuencias esperadas son menores o iguales que 5. Las diferencias para las variables cuantitativas fueron calculadas por el test U de Mann-Whitney. El test de Correlación de Spearm se utilizó para calcular las correlaciones entre variables.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESULTADOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

RESULTADOS

Los resultados obtenidos en estos trabajos aparecen recogidos en las publicaciones incluidas en esta tesis. A continuación se resumen los principales hallazgos que se desprenden del trabajo realizado.

5.1. Publicación 1: Plasma β-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease.

En este trabajo se midieron los niveles plasmáticos de los péptidos Aβ40 y Aβ42 en el envejecimiento normal y patológico (SDC) en la especie canina, así como en animales jóvenes y de mediana edad.

Los perros jóvenes presentaron concentraciones medias significativamente más altas de Aβ42 y Aβ40 que los perros geriátricos sin deterioro cognitivo. Entre los perros ancianos, los niveles de Aβ42 y de ratio Aβ42/40 fueron significativamente más altos en los animales con un deterioro cognitivo leve que en aquellos sanos o severamente afectados. Estos resultados sugieren que los niveles incrementados de Aβ42 y de ratio Aβ42/40 podrían constituir biomarcadores del SDC en la especie canina.

Así mismo, se encontró una fuerte correlación entre el TDS y las puntuaciones obtenidas en el cuestionario de Rofina (Rofina et al. 2006).

5.2. Publicación 2: Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs: Locomotor and exploratory behaviour

En este estudio se valoró el efecto de la edad y el grado de disfunción cognitiva sobre la actividad espontánea en perros de compañía.

Los perros geriátricos sanos mostraron un patrón de actividad similar al de los animales más jóvenes, si bien sus respuestas sociales y de curiosidad se consideraron moderadas con respecto a estos últimos. Los perros con SDC grave se caracterizaron por un comportamiento hiperactivo, considerando su alta locomoción y baja permanencia en posiciones de sentado o tumbado. Independientemente del test, estos animales mostraron con frecuencia actividades sin un fin específico, como la exploración repetitiva de las esquinas de la sala. Por último, los perros con SDC leve mostraron un perfil de comportamiento intermedio entre sus homólogos sanos y los afectados severamente.

5.3. Publicación 3: Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs: Social responsiveness.

En este trabajo se valoró el efecto de la edad y el grado de disfunción cognitiva sobre el comportamiento social en perros de compañía.

Los animales jóvenes muestran más interacciones con contacto físico con la persona situada en la sala. Tanto los jóvenes como los de mediana edad vocalizan más como respuesta al aislamiento. En cambio, los animales ancianos pasa más tiempo delante del espejo. Los cambios en la respuesta social de los animales con SDC incluyen menor respuesta al aislamiento social y a la interacción con humanos y aumento del tiempo en frente del espejo lo que sugiere un déficit de habituación.

5.4. Publicación 4: Effect of age and severity of cognitive dysfunction on two simple cognitive tasks in pet dogs.

En este estudio se valoró el efecto de la edad y de la severidad de la disfunción cognitiva mediante dos test simples de comportamiento.

Los perros menores de 9 años encuentran mejor la comida y de una forma más rápida que los geriátricos sanos en el test FS. Además, a los animales que sufren SDC grave les resulta más complicado encontrar la comida en comparación con los ancianos sanos y con

animales que sufren SDC leve. En cuanto al test SP, los animales jóvenes obtienen mejores resultados a la hora de conseguir la comida que los animales ancianos. Por otra parte, no encontramos diferencias significativas entre los distintos grupos de animales ancianos en función de la severidad del SDC para este test.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DISCUSION

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

DISCUSION

6.1. Plasma β-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease.

En este trabajo se observó que los niveles de Aβ tienden a disminuir con la edad en perros sin SDC. En concreto, los animales menores de 4 años mostraban significativamente valores más elevados de Aβ40 y Aβ42, así como de su ratio Aβ42/40, que los mayores de 9. Un estudio reciente llevado a cabo con perros sanos de entre 4 y 16 años mostró un descenso de los niveles de Aβ42, pero no de Aβ40, en LCR al aumentar los depósitos cerebrales de amiloide con la edad (Head et al. 2010). Nuestros resultados sugieren que la disminución de las concentraciones de Aβ40 y Aβ42 en el plasma de los CU puede ser consecuencia de un incremento de los depósitos de amiloide en cerebro aunque no se puede descartar que se acompañe de una menor producción del péptido.

Se han encontrado incrementos de los niveles de Aβ42 y del ratio Aβ42/40 en plasma en animales CI cuando se comparan con los CU. Luego, parece que la enfermedad va acompañada de una mayor producción de Aβ42, al contrario de lo que sucede con el envejecimiento normal en el que los niveles plasmáticos disminuyen. Estos resultados concuerdan con lo visto en numerosos estudios sobre EA que muestran la relación entre la elevación de Aβ en plasma y el padecimiento de la enfermedad (Mehta et al. 2000; Mayeux et al. 2003; Assini et al. 2004; Sobow and Kloszewska 2005; van et al. 2006; Blasko et al. 2008; Lopez et al. 2008; Schupf et al. 2008; Xia et al. 2009; Cosentino et al. 2010; Pesini et al. 2012) En otros trabajos se observa el incremento de Aβ en plasma es un evento temprano que puede preceder a la aparición de los síntomas e incrementar el riesgo de

padecer EA (Fagan et al. 2007; Jack, Jr. et al. 2009; De et al. 2010; Frisoni et al. 2010; Jack, Jr. et al. 2010).

Cabe destacar que cuando separamos a los animales diagnosticados de SDC en dos grupos mCI y sCI, aparecen nuevas diferencias en cuanto a las concentraciones de Aβ en plasma. Así, los animales mCI presentan unos valores de Aβ42 y del ratio Aβ42/40 significativamente más elevados que los sCI y CU, mientras que no encontramos diferencias significativas entre estos dos últimos grupos. De nuevo, estos resultados coinciden para los encontrados en humanos con un rápido detrimento cognitivo y/o progresión de EA que se acompaña con una disminución de los niveles plasmáticos de Aβ42 (Mayeux et al. 2003; Assini et al. 2004; Sobow y Kloszewska 2005; Schupf et al. 2008; Xia et al. 2009; Cosentino et al. 2010). Se ha visto que las personas mCI tienen significativamente concentraciones más elevadas de Aβ42 y Aβ40 que los no dementes y tienden a disminuir en los pacientes con EA (Pesini et al. 2009).

Según ciertas hipótesis sobre EA la patología comenzaría cuando los péptidos Aβ, en concreto Aβ42, se agregan y depositan en los espacios intersticiales del cerebro. Así, la difusión del Aβ hacia el sistema ventricular se verá severamente afectada haciendo que disminuyan los niveles de Aβ42 en LCR, lo que se ha demostrado que ocurre con el declive cognitivo (Shaw et al. 2009; Blennow et al. 2010; De et al. 2010; Fagan y Holtzman 2010). Mientras que al inicio de la enfermedad, al igual que lo que ocurre con los perros mCI, se han encontrado niveles elevados de Aβ en sangre lo que podría reflejar el incremento de los niveles del péptido en el tejido cerebral. De esta forma, el descenso de niveles de Aβ42, observados tanto en humanos como en perros, y la evolución del declive cognitivo pueden estar relacionados con los depósitos de Aβ al rededor de los capilares que bloquearía la barrera hematoencefálica. Vemos que los resultados encontrados en este trabajo refuerzan el paralelismo entre EA y SDC, sugiriendo a los perros mCI como un buen modelo para mCI humanos, mientras que los animales sCI podrían servir de modelo para EA temprana o media. Un estudio longitudinal podría ayudar a esclarecer los cambios observados en Aβ con el SDC.

6.2. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs: Locomotor and exploratory behaviour.

En este trabajo se han sometido 85 perros a un test de OF y de curiosidad para estudiar su comportamiento locomotor y exploratorio.

Hemos realizado test de 3 minutos de duración, mientras que en trabajos previos realizaron sesiones de 10 minutos (Head y Milgram 1992; Head et al. 1997; Siwak et al. 2001). Nuestros resultados sugieren que sesiones breves obtienen mejores medidas del comportamiento y probablemente reduzcan las variaciones individuales en los patrones de actividad temporales como se ha encontrado anteriormente en algunas especies de roedores (Montiglio et al. 2010).

Independiente del test estudiado, los animales cognitivamente sanos (YG, MA y CU) no mostraron diferencias en cuanto a la actividad locomotora (AL), mientras que los CI tienen AL más elevada que el resto de los grupos en OF. A demás los animales sCI mostraron mayor AL en ambos test. Estos estudios concuerdan para lo visto en Beagles de experimentación cuya locomoción se ve afectada por su estado cognitivo más no por su edad (Head et al. 1997; Siwak et al. 2001; Siwak et al. 2003). De forma similar, el incremento de la actividad en los test de OF fue demostrada en ratones como modelo de EA (Pietropaolo et al. 2008; Filali et al. 2011). Así mismo, el incremento del caminar sin rumbo alguno (wandering) es común en humanos con demencia y es más frecuente en EA que en demencia vascular (Lai y Arthur 2003). Se postula que este caminar esterotipado es debido a una disfunción en el cortexprefontral (Siwak et al. 2001).

El comportamiento de exploración depende parcialmente de las capacidades motoras y espaciales, así como de la motivación para explorar (Caston et al. 1998).

En este trabajo se han observado las distintas actividades y tiempo que pasa el animal en cada área de la sala. Así, se encontró que el espacio próximo a la puerta es especialmente importante en el sentido de que los animales no dementes tienden a ir hacia a ella como respuesta al aislamiento, independientemente de su edad y del test realizado, mientras que muestran menos interés hacia las esquinas. Por otra parte, los perros sCI en el test OF pasan menos tiempo en el área de la puerta que los animales no dementes, tienen una frecuencia de comportamientos menor dirigidos hacia la puerta y mayor hacia las esquinas.

Todo esto sugiere que los animales CU se orientan espacialmente de forma similar a los jóvenes pero los CI muestran un déficit en cuanto a su orientación. Además la escasez de comportamientos hacia la puerta podría estar parcialmente justificada por las alteraciones en el sistema social del apego que padecen los animales con SDC (Topal et al. 1998).

6.3. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs: Social responsiveness.

En este trabajo se valoró el efecto de la edad y el grado de disfunción cognitiva sobre el comportamiento social en perros de compañía. Así, los YG mostraron más interacciones, tanto activas como pasivas, con la persona de la sala lo que concuerda con los resultados obtenidos por Siwak y sus colaboradores (Siwak et al. 2001) que encontraron que los Beagles jóvenes pasan más tiempo en contacto con los humanos. El resto de los animales no dementes (MA y CU) también muestran diferencias, aunque menos acusadas, en su patrón de actividad con respecto a si hay o no una persona en la sala. Así se ha encontrado una menor actividad dirigida hacia la puerta o hacia las esquinas que en el test de OF.

A demás, los animales YG y CU tienen una frecuencia menor de vocalización pero mayor de entradas en área central de la sala comparado con OF. Esto sugiere que la presencia de una persona desconocida en la sala puede atenuar la respuesta a la separación de los propietarios.

Al igual que ocurría en la publicación anterior, los sCI muestran un AL muy elevada en el test del espejo pero, en cambio, la actividad disminuye en el test de interacción con humanos. De manera que el hecho de que haya una persona presente en la sala hace que las diferencias entre animales CI y CU se atenúan, lo que sugiere que los CI también son capaces de reaccionar ante la presencia de una persona aunque en menor medida. Así, los sCI muestran menos interacciones pasivas dirigidas hacia el humano y continúan pasando menos tiempo inmóviles lo que concuerda con una menor sociabilidad combinada con un incremento de la actividad descrito en ratones transgénicos estudiados como modelo de EA (Filali et al. 2011).

En cuanto al test del espejo, los perros no son capaces de reconocerse en él y lo esperable es que reaccionen ante él como ante la imagen de un perro falso (Gallup, Jr. 1968; Tapp y Siwak 2006) al que normalmente se habitúan al cabo de un rato. Curiosamente los sCI pasaron más tiempo delante del espejo que los mCI. Estos resultados coinciden con lo visto en pacientes con EA pues no son capaces de reconocer su reflejo (Biringer et al. 1988; Biringer y Anderson 1992; Mendez et al. 1992).

En este estudio se valoró también el ladrido como respuesta al aislamiento (Yin y McCowan 2004; Pongracz et al. 2010). Encontrándose que los perros jóvenes vocalizan más que los ancianos durante el test de OF, y dentro del grupo de ancianos los sCI son los que menos

vocalizan. Esto junto con el detrimento de comportamientos dirigidos hacia la puerta podría sugerir desorientación y una lenta habituación a la separación de su propietario.

Los perfiles de comportamiento encontrados en estos dos últimos trabajos para las distintas edades y grado de disfunción cognitiva concuerdan con las clasificaciones obtenidas mediante el uso del cuestionario que además correlaciona con los niveles de Aβ en plasma.

6.4. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on two simple cognitive tasks in pet dogs.

En este estudio se intentó aplicar dos test sencillos en el ámbito de la clínica veterinaria con el fin de colaborar en la realización de un diagnóstico de SDC más objetivo. Hasta este momento, los test realizados con animales con SDC han sido siempre en un ambiente laboratorial (Adams et al. 2000b; Tapp y Siwak 2006; Cotman y Head 2008) con lo que las comparaciones de resultados han de hacerse con cautela.

FS mide la habilidad del perro para recordar la localización de un pedazo de comida tras un breve periodo de tiempo (aproximadamente 15s) en un máximo de tres intentos. Encontramos una clara diferencia en la realización de este test en función de la edad. Así, la mayoría de los animales jóvenes encuentran la comida en un intento y van directamente hacia el lugar en el que se hallaba. En cambio, las altas puntuaciones obtenidas por los animales ancianos indican que tienen esta habilidad comprometida, especialmente aquellos con SDC, ya que los sCI son los que obtuvieron mayores puntuaciones.

Esto sugiere que la retención la información espacial está afectad con la edad y el estado cognitivo de los animales. Estudios previos realizados en perros de laboratorio han demostrado que el deterioro en las habilidades espaciales comienza pronto, entre los 6 y 7 años de edad. Así mismo, es algo que también se observa en el envejecimiento humano y de forma más severa en patologías neurodegenarativas (Tapp y Siwak 2006; Cotman y Head 2008). Curiosamente en la clínica el deterioro cognitivo en perros no se hace aparente hasta más o menos los 11 años de edad (Landsberg y Araujo 2005) y de acuerdo a un estudio reciente, los animes con SDC suelen tener problemas para encontrar la comida del suelo (Salvin et al. 2011).

El test FS es capaz de mostrar diferencias entre animales jóvenes y ancianos categorizados como "no dementes" (CU), así como animales con SDC y categorizar su severidad. Sin embargo no es los suficientemente sensible como para diferenciar animales CU de mCI, cosa que sí se consigue mediante test de laboratorio más sofisticados (Tapp y Siwak 2006;

Cotman y Head 2008). En el test PS una caja de plástico cubre un pedazo de comida en el suelo y el animal ha de manipular el objeto con sus patas o su hocico para conseguir su premio, lo cual puede reflejar la habilidad de aprendizaje procedimental. Este tipo de aprendizaje se ve muy afectado por las experiencias previas del animal, lo que sugiere una relación compleja entre la edad y el aprendizaje procedimental (Tapp y Siwak 2006; Cotman y Head 2008). Dado que todos nuestros sujetos son mascotas, posiblemente hayan tenido una gran cantidad de experiencias manipulando objetos.

De esta forma se ha visto que el test PS es especialmente sensible a la edad, dado que los animales jóvenes lo hacen mejor que los ancianos. Así, al menos un 90% de los animales jóvenes obtienen la comida en un plazo de tiempo de 2 min, mientras que solo la mitad de los geriátricos sanos y un tercio de los dementes la consiguen.

Como veíamos en la segunda publicación, la curiosidad hacia nuevos objetos disminuye con la edad lo que podría explicar en parte el porqué de la obtención de peores resultados en el PS por parte de los animales geriátricos.

De forma similar a lo que ocurre con pacientes con EA que no muestran diferencias en cuanto a la capacidad de aprendizaje procedimental motor con respecto a los pacientes sanos (van Halteren-van Tilborg IA et al. 2007), no se encuentran diferencias significativas entre CU y CI para el test PS.

6.5. CONTRIBUCIONES DE NUESTROS ESTUDIOS

- Contribuye a caracterizar el SDC canino en sus aspectos clínicos, tanto mediante el desarrollo de cuestionarios como mediante test de comportamiento que ayudan a definir patrones de actuación que pueden observarse en animales jóvenes, viejos sanos y viejos enfermos. La definición de estos patrones en términos objetivos y relativamente sencillos de explorar deberían contribuir a que se prestara más atención a esta patología en el ámbito de la clínica veterinaria.
- Los procedimientos de diagnóstico usados (cuestionario y tests) dan resultados congruentes y refuerzan la utilidad de los cuestionarios que por la sencillez de su implementación se consolidan como el método de elección para usar en la práctica clínica. Aparentemente, estos cuestionarios, debidamente adaptados en base a la experiencia recogida a lo largo de este estudio, tienen suficiente sensibilidad como para detectar estados iniciales de la enfermedad y podrían servir como variable principal

(endpoint) para demostrar eficacia en los ensayos clínicos de nuevas terapias en desarrollo.

- Por otra parte, nuestro estudio contribuye a definir el SDC del perro como un modelo para el estudio de la EA en cuanto que al igual que ocurre en la especie humana hay una asociación significativa entre los niveles de β-amiloide en plasma y el diagnóstico de la enfermedad. Esto refuerza además la idea de que la acumulación de péptidos β-amiloides juega un papel en el desencadenamiento de la patología. No obstante, es necesario profundizar más en este terreno con nuevos ensayos clínicos, incluyendo un mayor número de animales seguidos durante periodos de tiempo más largos, para poder establecer con claridad el uso de los niveles de Aβ en sangre con fines diagnósticos.
- Estos estudios son importantes porque en cualquier caso podrían ayudar (tanto en animales domésticos como en humanos) primero a seleccionar las poblaciones que se incluyen en los ensayos clínicos de tratamientos dirigidos contra la acumulación de Aβ en base a los niveles plasmáticos de Aβ. En segundo lugar, también tendría utilidad como marcador subrogado de eficacia para demostrar que el fármaco actúa sobre los niveles de su diana terapéutica.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

CONCLUSIONES

- Los niveles de Aβ42 y Aβ40 en plasma difieren en función de la edad y de la severidad de la disfunción cognitiva en el perro por lo que su cuantificación podría desarrollarse como una herramienta para ayudar al diagnostico del Síndrome de Disfunción Cognitiva.
- Los perros con Síndrome de Disfunción Cognitiva leve tienen niveles más elevados de Aβ142 y Aβ42/40 que los graves y los controles lo que sugiere que el Aβ142 en plasma se comporta de manera similar en perros que en humanos con disfunción cognitiva leve (mCI) y con Enfermedad de Alzheimer.
- El comportamiento locomotor y exploratorio varía en función de la edad y del estado cognitivo del animal. Así, de forma similar a los humanos que sufren demencia, los animales con disfunción cognitiva presentan una mayor actividad locomotora estereotipada.
- La edad y la disfunción cognitiva también influyen en el comportamiento social de los perros. Los animales con Síndrome de Disfunción Cognitiva tienen una menor respuesta al aislamiento social y muestran un déficit de habituación ante la presencia de su imagen reflejada en un espejo.
- Estos resultados son congruentes con las puntuaciones obtenidas por el cuestionario propuesto lo que complementa el diagnóstico clínico e indirectamente sirve como una validación de los resultados obtenidos con cuestionarios a los dueños.
- El test de búsqueda de comida **(**FS), realizado en el ambiente clínico, es sensible a la edad y a la severidad del Síndrome de Disfunción Cognitiva. Los animales menores de 9 años lo realizan más rápido y obtienen mejores resultados que los ancianos. Los perros

disfunción cognitiva severa (sCI) obtienen peores puntuaciones en comparación con los de disfunción cognitiva leve (mCI) y los perros ancianos no dementes (CU).

- El test de resolución de problemas (PS) es sensible a la edad pero no a la severidad del Síndrome de Disfunción Cognitiva.
- El conjunto de estos estudios muestran la relevancia del Síndrome de Disfunción Cognitiva canino como una patología específica de los animales de compañía y como un modelo de estudio de la Enfermedad de Alzheimer en humanos.

ANEXOS

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

ANEXOS

ANEXO 1: EFECTOS QUE LAS CONDICIONES MÉDICAS PUEDEN TENER EN EL COMPORTAMIENTO. (MODIFICADO DE LANDSBERG Y ARAUJO, 2005):

NEUROLÓGICO:

Las enfermedades que afectan, directa o indirectamente, al sistema nervioso central pueden estar relacionadas con cambios en el comportamiento del animal. Los signos pueden ser similares a los que encontramos en SDC: cambios de personalidad, comportamiento repetitivo, o la ansiedad.

Neoplasia	Los signos varían con el tipo de tumor.
Convulsiones	De tipo motor o comportamental y/o psicomotor. Se caracterizan por tener fases de aura y post-ictal. Con comportamiento normal entre episodios.
Alteración de los pares craneales	Alteración de la respuesta a estímulos.
Toxinas	• Exógenas: de gran importancia en animales con pica, polifagia, lamidos compulsivos (plomo, pesticidas, fármacos). • Endógenas: consecuencia de un fallo renal o hepático.
Alteraciones respiratorias, circulatorias y/o hematopoyéticas	Disminución de la oxigenación en el sistema nervioso central que conduce a alteraciones que van desde la disfunción cognitiva a signos específicos relacionados con las regiones implicadas.
Alteraciones Endocrinas	Signos provocados por efectos hormonales (cortisol, tiroxina, hormonas sexuales).
Hallazgos degenerativos patológicos que afectan a la función de neurotransmisores y receptores	Disminución de la función cognitiva, alteración y cambios de personalidad. Autores franceses describen hallazgos patológicos adicionales en cerebro que conduce a la depresión involutiva y hiperagresividad.
Alteraciones neuromusculares y neuropatías periféricas	Debilidad, disminución de la movilidad, eliminación inadecuada, ansiedad, disminución de la capacidad de respuesta a estímulos, irritabilidad y agresividad inducida por dolor.

MUSCULO ESQUELÉTICO:

Alteración de la movilidad, irritabilidad, agresividad, eliminación inadecuada, disminución de la capacidad de respuesta a estímulos, disminución de la interacción social y mayor búsqueda de atención.

GASTROINTESTINAL:

Proceso inflamatorio y/o mala absorción	Irritabilidad, eliminación inadecuada, no duermen por la noche, cambios de apetito, efectos secundarios a déficits nutricionales.
Constipación	Irritabilidad, eliminación inadecuada.
Alteraciones dentales	Irritabilidad, agresividad inducida por dolor, disminución del interés por la comida.
Alteraciones hepatobiliares	Encefalopatía hepática. Efectos potencialmente tóxicos en SNC.

ENDOCRINO:

Hiperadrenocorticismo	Jadeos, polifagia, alteración del ciclo sueño-vigilia, eliminación inadecuada, signos de SDC.
Diabetes mellitus	Eliminación inadecuada, irritabilidad, polifagia, letargia.
Hipotiroidismo	Letargia, embotamiento mental, depresión, agresividad, problemas neuromusculares y signos de SDC.

UROGENITAL:

Fallo renal	Eliminación inadecuada, irritabilidad, fectos potencialmente tóxicos en SNC por encefalopatía urémica.
Infección del tracto urinario, urolitiasis y alteraciones prostáticas	Irritabilidad, eliminación inadecuada.
Tumores testiculares	Tecoma: efectos secundarios a los excesos de testosterona, monta, marcaje, agresividad. Células de Sertolli: efectos feminizantes, agresividad.
Tumores ováricos	Tumores de las células de la granulosa: agresividad, signos de estro.

CARDIOVASCULAR, RESPIRATORIO, CIRCULATORIO Y HEMATOPOYÉTICO:

Si la perfusión o la oxigenación cerebral se ve alterada podemos encontrar: intolerancia al ejercicio, cambios personalidad, disminución de la actividad, signos de SDC.

DERMATOLÓGICO:

Irritabilidad. Alteraciones en la movilidad (si hay afectación de las almohadillas).

ÓRGANOS DE LOS SENTIDOS:

Alteración de la respuesta a estímulos, mayor o menor reactividad, se pueden mostrar confusos, irritabilidad, ansiedad, alteración del ciclo sueño-vigilia, especialmente si hay varios sentidos afectados.

Vista	Disminución de la respuesta a estímulos, alteración del ciclo sueño-vigilia, disminución de la capacidad para llevar a cabo tareas previamente aprendidas, alteración de la respuesta hacia personas u otras mascotas.
Oído	Disminución o alteración de la respuesta a estímulos, incluidos dueños, otras mascotas o extraños. El animal puede estar más reactivo, más sensible, ansioso o impredecible.

GENERAL:

Dolor	Múltiples etiologías (ej.: enfermedades dentales, saculitis anales, otitis, artritis, hernia discal). Puede dar lugar a conducta de evitación, agresividad, eliminación inadecuada, disminución de la actividad, inquietud.
Obesidad	Letargia, disminución de la movilidad. Puede tener consecuencias en la salud, el bienestar y la esperanza de vida del animal.
Pérdida de peso o de masa muscular	Disminución de la actividad y/o de la respuesta a estímulos. Letargia, irritabilidad. Si va acompañada de polifagia puede llevar al animal a robar comida, a despertarse por la noche, a desarrollar agresividad por posesión de recursos, pica y eliminación inadecuada.
Deshidratación, disminución de la respuesta a la sed	Constipación: eliminación inadecuada, irritabilidad.
Disminución de la inmunocompetencia, neoplasias	Predisposición a las infecciones, afecciones del sistema inmune y tumores: signos relacionados con los órganos afectados.
Hipotermia y alteración de la termorregulación	Disminución de las interacciones, letargia, ansiedad, búsqueda de atención, buscan calor por lo que son reacios a salir al aire libre, ciclo sueño-vigilia alterado.
Balance Nutricional	Aunque la mayoría de los alimentos para mascotas proporcionan una nutrición adecuada, algunas de las recetas hechas en casa, e incluso algunos alimentos comerciales no satisfacen todas las necesidades de las mascotas senior. Una dieta adecuada puede prevenir, mejorar o retrasar el declive de muchas condiciones médicas.

ANEXO 2: CUESTIONARIO DISFUNCIÓN COGNITIVA

1. CICLO SUEÑO/VIGILIA

Algunos perros cuando se hacen mayores comienzan a sufrir alteraciones en el ciclo de sueño y vigilia.
Por ejemplo: Su perro...

a. Pasea por las noches Sí ☐ No ☐
b. Ladra por las noches Sí ☐ No ☐
c. Duerme menos por la noche Sí ☐ No ☐
d. Duerme más durante el día Sí ☐ No ☐
e. Alterna periodos de insomnio y somnolencia Sí ☐ No ☐
f. Otras _____

Valore del 0 al 4 la gravedad con la que considera afectada este tipo de conductas, siendo 0 "nada" y 4 "muy alterado" (rodee el número):

0 1 2 3 4

2. INTERACCIÓN SOCIAL-AMBIENTAL

Los perros son animales sociales y exploradores. Sin embargo, algunos perros conforme envejecen muestran desinterés por aquello que les rodea o cambian la manera de relacionarse con sus propietarios.
Por ejemplo: Su perro muestra...

a. Disminución del interés en el saludo Sí ☐ No ☐
b. Disminución de búsqueda de atención del propietario Sí ☐ No ☐
c. Aumento del apego (dependencia) a los propietarios Sí ☐ No ☐
d. Disminución del interés por el juego con los propietarios Sí ☐ No ☐
e. Disminución del interés por el juego con otros perros Sí ☐ No ☐
f. Cambios de carácter Sí ☐ No ☐

*Esta más irritable /agresivo con:
Familia ☐ Desconocidos ☐ Perros ☐ Otros ☐ _____

*Reacciona de forma desproporcionada (exagerada) ante estímulos como:
Ruidos ☐ Objetos nuevos ☐ Espacios nuevos ☐ Otros ☐ _____

*No reacciona o ha perdido interés por estímulos:
Personas ☐ Perros ☐ Cosas ☐ Otros ☐ _____

g. Otras _____

Valore del 0 al 4 la gravedad con la que considera afectada este tipo de conductas, siendo 0 "nada" y 4 "muy alterado" (rodee el número):

0 1 2 3 4

3. APRENDIZAJE Y HÁBITOS HIGIÉNICOS

Conforme envejecen, algunos perros parecen olvidar cosas que antes sabían hacer sin problemas.
Por ejemplo: Su perro...

a. Se orina/defeca en casa (antes no lo hacía) Sí ☐ No ☐
b. Ya no pide salir a la calle cuando tiene necesidad Sí ☐ No ☐
c. Ha disminuido la conducta de marcaje Sí ☐ No ☐
d. Olvida las órdenes que antes conocía Sí ☐ No ☐
e. Otras _____

Valore del 0 al 4 la gravedad con la que considera afectada este tipo de conductas, siendo 0 "nada" y 4 "muy alterado" (rodee el número):

0 1 2 3 4

4. SIGNOS DE DESORIENTACIÓN

En ocasiones, algunos perros mayores parecen estar desorientados.
Por ejemplo: Su perro...

a. Tiene en ocasiones la mirada perdida Sí ☐ No ☐
b. Se pierde en casa o en el paseo habitual Sí ☐ No ☐
c. Deambula sin rumbo por la casa Sí ☐ No ☐
d. Intenta pasar por lugares estrechos Sí ☐ No ☐
e. Permanece en el lado equivocado de la puerta para salir Sí ☐ No ☐
f. Es incapaz de sortear ciertos obstáculos Sí ☐ No ☐
g. No reconoce a los propietarios Sí ☐ No ☐
h. Otras _____

Valore del 0 al 4 la gravedad con la que considera afectada este tipo de conductas, siendo 0 "nada" y 4 "muy alterado" (rodee el número):

0 1 2 3 4

ACTIVIDAD FÍSICA

a. Disminución de la conducta de exploración Sí ☐ No ☐
b. Disminución general de la actividad física (+ sedentario) Sí ☐ No ☐
c. Le cuesta realizar movimientos de tumbarse o levantarse Sí ☐ No ☐
d. Le cuesta subir y bajar escaleras, al sofá, etc. Sí ☐ No ☐
e. Otros _____

ALIMENTACIÓN

a. Consume dieta especial para perros geriátricos Sí ☐ No ☐
Cuál: _____
b. Se han observado cambios en el consumo de alimento Sí ☐ No ☐
Aumento ☐ Disminución ☐
c. Se han observado cambios en el peso Sí ☐ No ☐
Aumento ☐ Disminución ☐
d. Se han observado cambios en el consumo de agua Sí ☐ No ☐
Aumento ☐ Disminución ☐

OTROS TRASTORNOS DE CONDUCTA

a. Trastornos compulsivos (estereotipias) Sí ☐ No ☐
Cuál: _____
b. Aumento exagerado del lamido Sí ☐ No ☐
c. Autolesiones Sí ☐ No ☐
d. Aumento de las vocalizaciones Sí ☐ No ☐
Ladrido ☐ Gemido ☐ Gruñido ☐
g. Otros _____

TRASTORNOS NEUROLÓGICOS Y DE LOS SENTIDOS

a. Incontinencia Sí ☐ No ☐
b. Alteraciones en la marcha Sí ☐ No ☐
c. Camina describiendo círculos Sí ☐ No ☐
d. Ha perdido visión Sí ☐ No ☐
parcial ☐ completa ☐
e. Ha perdido audición Sí ☐ No ☐
parcial ☐ completa ☐
f. Ha perdido olfato Sí ☐ No ☐

parcial ☐ completa ☐
g. Otros _____

ENFERMEDADES ACTUALES DIAGNOSTICADAS

Presenta alguna enfermedad actualmente Sí ☐ No ☐
Indicar cuál enfermedad _____
¿Está tomando medicación? Sí ☐ No ☐
Indicar la medicación_____

ENFERMEDADES IMPORTANTES CON ANTERIORIDAD Sí ☐ No ☐

Ha padecido alguna enfermedad importante con anterioridad Sí ☐ No ☐
Cuál:_____

Nº CATEGORÍAS AFECTADAS: 1☐ 2☐ 3☐ 4☐

ANEXO 3: PUBLICACIÓN EN LA REVISTA CLÍNICA VETERINARIA DE PEQUEÑOS ANIMALES. SÍNDROME DE DISFUNCIÓN COGNITIVA EN EL PERRO GERIÁTRICO.

CLÍNICA VETERINARIA DE PEQUEÑOS ANIMALES
A.V.E.P.A.
Año 2012 ■ Volumen 32 ■ Nº 3



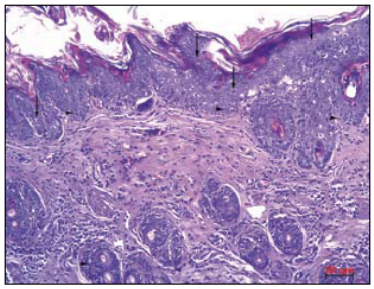
OFTALMOLOGÍA
145 El láser CO2 y sus aplicaciones en oftalmología veterinaria

ETOLOGÍA
159 Síndrome de disfunción cognitiva en el perro geriátrico

DERMATOLOGÍA
169 Tratamiento conservador para la resolución de lesiones cutáneas secundarias a una miasis

EXÓTICOS
175 Dermatitis exfoliativa y alopecia asociada a hepatitis en un conejo
181 Colangiocarcinoma en un hurón doméstico *(Mustela putorius furo)*

AVEPA ACTUALIDAD



Revista Oficial de la Asociación de Veterinarios Españoles Especialistas en Pequeños Animales

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Síndrome de disfunción cognitiva en el perro geriátrico

Cognitive dysfunction in geriatric dogs

Á. González-Martínez,[1] B. Rosado,[2] S. García-Belenguer,[2] M. Suárez[1]
[1]Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, España.
[2]Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, España.

Resumen

El Síndrome de disfunción cognitiva es una enfermedad degenerativa, relativamente frecuente en el perro geriátrico, que cursa con una amplia constelación de alteraciones del comportamiento. El diagnóstico precoz, junto con la instauración de un protocolo terapéutico adecuado para cada animal, puede mejorar en gran medida la calidad de vida de estos pacientes así como la relación con sus propietarios.

Palabras clave: Disfunción cognitiva, demencia, envejecimiento canino.
Keywords: Cognitive dysfunction, dementia, canine aging.
Clin. Vet. Peq. Anim, **2012**, 32 (3): 159-167

Introducción

Tanto veterinarios como propietarios observan cómo algunos perros desarrollan cambios de comportamiento con la edad, a menudo descritos como "seniles", para los que no se les encuentra una causa plausible y que no responden a tratamiento. Varios estudios han sugerido que el envejecimiento cognitivo en perros, de forma similar a lo que ocurre con seres humanos, puede ser clasificado como normal o "exitoso", deterioro cognitivo leve y disfunción cognitiva o demencia.[1] El objetivo de este trabajo es hacer una revisión de la neuropatología, prevalencia, sintomatología y diagnóstico de la enfermedad y, así mismo, expondremos las principales opciones terapéuticas a establecer.

Neuropatología del envejecimiento

Durante el envejecimiento del perro, al igual que ocurre en personas, en el cerebro se observan una serie de cambios: atrofia cortical,[2] espesamiento y calcificación de las meninges, dilatación de los ventrículos,[3,4] ampliación de los surcos y retracción de las circunvoluciones, reactividad de la glía[3,5] y disminución del número de neuronas.[6-9] Ruehl y sus colaboradores propusieron el término Síndrome de Disfunción Cognitiva (SDC) para describir el conjunto de cambios conductuales y cognitivos observados en algunos perros durante el envejecimiento.[10] El SDC se asocia en la mayoría de los casos a un trastorno neurodegenerativo, propio de animales de edad avanzada, que se caracteriza por una disfunción cognitiva gradual y que cursa durante un prolongado periodo de tiempo (18-24 meses o mayor).[11-13]

En los individuos que padecen SDC, se observan depósitos de una proteína llamada β-amiloide (Aβ), que forman placas neuríticas en el parénquima cerebral[12,14,15] y depósitos vasculares que se sitúan en la leptomeninge y los vasos sanguíneos.[12,14-16] Pese a que aún no se conoce de qué manera influye exactamente la acumulación de Aβ en el cerebro de pacientes con SDC, a este péptido se le atribuyen propiedades neurotóxicas que comprometen la función neuronal, provocando degeneración de las sinapsis, muerte neuronal y depleción de neurotransmisores. La extensión de los depósitos de Aβ en el cerebro canino estaría relacionada con el grado de severidad de disfunción cognitiva,[12-14,17] de forma similar a lo que ocurre en el cerebro de los pacientes con Enfermedad de Alzheimer.[18,19] El daño oxidativo parece estar también relacionado con el desarrollo de SDC. Diversos estudios llevados a cabo en perros de compañía correlacionan la severidad de los cambios de comportamiento debidos al SDC con un incremento de marcadores de oxidación de lípidos y proteínas.[15,16]

Prevalencia

La prevalencia y la severidad del SDC se ven incrementadas con la edad del paciente. Las estadísticas nos muestran prevalencias que varían del 14 al 35% de los animales geriátricos.[20-23] No obstante, cabe señalar, que hoy por hoy se trata de una patología infradiagnosticada. Así, en una población analizada por Salvin y colabo-

* Contacto: angela.gonzalez.martinez@rai.usc.es

radores (2010),[23] se detectaron un 14% de animales con posible SDC, de los que solo el 1,9% habían sido diagnosticados por un veterinario.

Pese a que las razas de pequeño tamaño son más longevas, algunos estudios muestran que este tipo de razas no parece mostrar una mayor predisposición al padecimiento de SDC que las razas de morfotipo grande o mediano.[22,23] En relación al sexo, algunos autores han observado que las hembras y perros castrados aparecen significativamente más afectados que los machos y que los perros enteros, respectivamente.[20]

Sintomatología

Los cambios de comportamiento asociados al SDC suelen englobarse en varias categorías.[21,24-26]

-Alteración de la interacción social: disminuye el interés por las caricias o el contacto, saludan con menos énfasis, aparecen conflictos sociales o hiperapego, etc.

-Pérdida de memoria y retraso en el aprendizaje: aparecen problemas de eliminación inadecuada, responden peor, o no responden, a órdenes que antes conocían, son incapaces de aprender órdenes nuevas, no reconocen a los propietarios, etc.

-Desorientación: se pierden en lugares conocidos, intentan pasar por el lado equivocado de la puerta, son incapaces de esquivar ciertos obstáculos o se quedan parados delante de ellos.

- Alteraciones del ciclo sueño vigilia: duermen por el día y no descansan por la noche.

-Disminución de la actividad, de la exploración y de la respuesta a estímulos. Por el contrario, también puede aparecer ansiedad o inquietud que se manifiesta de diferentes maneras: descansan menos, están más agitados, muestran ansiedad cuando sus propietarios se van de casa, aumenta la irritabilidad, la locomoción o las vocalizaciones, aparecen comportamientos estereotipados o conductas destructivas, etc.

-También se ha descrito una disminución de la conducta de acicalamiento y alteraciones del apetito (aumento o disminución). Se ha sugerido, que al igual que en el caso de personas con patologías neurodegenerativas, los perros con SDC podrían presentar anosmia.[19,27-30]

Diagnóstico diferencial

Dado que en la actualidad el diagnóstico de SDC en el perro se realiza por exclusión, el diagnóstico diferencial de esta enfermedad es muy extenso. Cualquier condición dolorosa o incómoda (por ejemplo, la artrosis o la enfermedad periodontal) puede dar lugar a aumento de la irritabilidad o del miedo del animal al ser manejado. Si la movilidad se ve afectada, la mascota puede llegar a ser agresiva o puede tener más dificultades para acceder a su área de eliminación. Asimismo, el fallo de distintos órganos, la presencia de tumores, enfermedades degenerativas, enfermedades autoinmunes, endocrinopatías y la disminución de la percepción sensorial, son comunes en el envejecimiento, y pueden tener grandes efectos sobre el comportamiento. Así, por ejemplo, en perros hipotiroideos se puede observar letargo o incluso agresión,[31] mientras que los perros con Enfermedad de Cushing pueden presentar alteración del ciclo sueño-vigilia, eliminación inadecuada, jadeos y polifagia.[32] Finalmente, cualquier enfermedad del sistema nervioso central (por ejemplo, neoplasias) o en el sistema circulatorio (por ejemplo, anemia o hipertensión), también puede afectar al comportamiento.[24] Por todo ello, ante un paciente en consulta con un posible SDC, deberemos llevar a cabo las siguientes pruebas para descartar otras posibles causas orgánicas (Tabla 1):

Tabla 1. Pruebas que realizar con un paciente con un posible SDC

- Anamnesis exhaustiva.
- Exploración física y exploración neurológica del animal
- Pruebas laboratoriales: hemograma, perfil bioquímico con medición de hormonas tiroideas, urianálisis, etc.
- Otras pruebas (según la sintomatología): radiografía, ecografía o pruebas de imagen

Además de descartar patologías orgánicas, es necesario diferenciar entre problemas de comportamiento primarios y problemas de comportamiento ligados al SDC. Muchos de los problemas de comportamiento en los perros ancianos son los mismos que en los perros jóvenes, y tienen el mismo origen y tratamiento. Así pues, es importante saber si el problema de comportamiento ya existía cuando el animal era joven, habiéndose hecho solo molesto en este momento para los propietarios (por ejemplo, un perro que siempre fue agresivo con los niños y ahora hay un bebé en la familia). Durante la anamnesis, también preguntaremos por la existencia de cambios en el ambiente (por ejemplo, traslado de casa) y si la aparición del problema de comportamiento está relacionada con tales cambios (por ejemplo, miedo a un elemento determinado). Veamos ahora el diagnóstico diferencial teniendo en cuenta las posibles alteraciones primarias de comportamiento que pueden manifestarse de manera similar a un cuadro de disfunción cognitiva o a otras patologías orgánicas:[24,33,34]

- **Agresividad**: la aparición de agresividad en el perro anciano, además de relacionarse con problemas clínicos y disfunción cognitiva, puede estar relacionada con la presencia de fuentes nuevas de conflicto, ansiedad o estrés. Por otro lado, los cambios físicos relacionados con la edad pueden hacer que se alteren las respuestas hacia otras mascotas de la casa en detrimento de una comunicación adecuada.

En perros ancianos las patologías orgánicas y del comportamiento a menudo coexisten

- **Eliminación inadecuada**: en el caso de que un perro anciano orine en sitios en los que

no debe, tenemos que diferenciar entre problemas orgánicos, marcaje (bien sea un comportamiento primario que venga desde joven o que aparece como consecuencia de una situación de estrés), ansiedad por separación, fobias y SDC.

- **Ansiedad y ansiedad por separación:** la aparición de ansiedad es un problema relativamente común en mascotas ancianas y, generalmente, va ligada a una falta de adaptación a cambios en la rutina del propietario. La respuesta del propietario ante estas situaciones puede fomentar más la ansiedad del animal (refuerzo inadvertido de los estados de estrés). Por otra parte, el padecimiento de problemas orgánicos o de SDC puede hacer que el perro busque más la compañía de su propietario y que desarrolle menos tolerancia a permanecer solo.

- **Vocalizaciones excesivas:** son varias las enfermedades orgánicas relacionadas con este problema, entre las que se citan: disfunción sensorial, enfermedades que afectan al sistema nervioso central, enfermedades relacionadas con la edad que pueden contribuir a la aparición de ansiedad y sensibilización a los ruidos, enfermedades que cursan con polifagia (el animal vocaliza para reclamar comida), incontinencia urinaria o fecal, o con dolor. Asimismo, el SDC puede llegar a ser una causa de vocalizaciones excesivas, especialmente si la corteza temporal se ve afectada. Dentro de los problemas comportamentales primarios que cursan con vocalizaciones excesivas encontramos: ansiedad por separación, vocalización en respuesta a estímulos que provocan miedo o estrés, o intentos de despertar al propietario por la noche (ver a continuación). De nuevo, el refuerzo por parte del propietario de las vocalizaciones, puede influir en que el problema se incremente y perpetúe.

- **Inquietud/despertar por la noche:** los animales que muestran este tipo de comportamiento deben ser examinados para descartar problemas orgánicos tales como alteraciones del sistema nervioso central, dolor, enfermedades que cursan con aumento de las eliminaciones, endocrinopatías, disfunciones sensoriales, etc. Por otro lado, la ansiedad por separación puede estar relacionada con estos síntomas en el caso de sacar al animal de la habitación de sus propietarios durante la noche, cuando acostumbraba a dormir con ellos. Finalmente, y como ya se comentó anteriormente, el SDC cursa a menudo con alteraciones del ciclo-sueño vigilia.

- **Conducta destructiva:** este tipo de problema puede adoptar muchas formas. Así, cuando va dirigida a puertas, ventanas y puntos de salida puede estar relacionada con ansiedad por separación, miedo a estímulos externos (fobia a los ruidos) o miedo al confinamiento. Existen otras formas de conducta destructiva, como pica y lamido o masticación de objetos. En este último caso, este tipo de conducta puede asociarse a patologías orgánicas, como alteraciones del sistema nervioso central (especialmente los que afectan a la amígdala), intoxicaciones, rabia, deficiencias nutricionales o alteraciones pancreáticas. La ansiedad y el estrés también son factores que pueden influir en la aparición de pica, así como el refuerzo de este comportamiento por parte del propietario. Finalmente, el SDC también se ha establecido como causa de pica.

- **Conductas compulsivas o estereotipias:** las estereotipias en el perro, a menudo son consecuencia de situaciones de frustración, ansiedad, conflicto o estrés. Sin embargo, las estereotipias también pueden tener causas orgánicas, en especial aquellas que afectan al sistema nervioso central, como neoplasias, enfermedades infecciosas, o encefalopatía hepática o urémica. Asimismo, los problemas dermatológicos pueden conducir a la automutilación y ser confundidos, por ejemplo, con un problema de dermatitis acral por lamido. Las disfunciones sensoriales y el dolor pueden contribuir al aumento de la ansiedad y a la aparición de estereotipias. El SDC también incluye la presencia de estereotipias, como en el caso del caminar estereotipado.

- **Miedos y fobias:** las disfunciones sensoriales, alteraciones en el sistema nervioso central, endocrinopatías y el dolor pueden contribuir en gran medida a la aparición de miedos o fobias en animales geriátricos. Asimismo, la intensidad de los síntomas puede verse incrementada en ausencia del propietario y éste puede reforzar inadvertidamente la conducta. Como en los problemas anteriores, el SDC puede influir en la aparición de miedos.

Pruebas diagnósticas

Cuestionarios

Los cuestionarios son muy útiles para el clínico a la hora de valorar la existencia de signos compatibles con el SDC. Un cuestionario específico puede ser utilizado para ahorrar tiempo en la consulta e identificar problemas que probablemente los dueños no mencionarían a su veterinario, bien porque los consideran irrelevantes o porque los consideran como parte normal del envejecimiento de su mascota.[33]

Se han elaborado un gran número de cuestionarios con notables diferencias entre ellos, bien sea por el tipo de preguntas que realizan o por cómo se hace la evaluación final. Resulta interesante destacar que se han hallado correlaciones entre las puntuaciones obtenidas por estos cuestionarios y la extensión de los depósitos de Aβ en cerebro, los niveles de éste en plasma y otros cambios físicos.[14,16,35,36]

Tests

Tests cognitivos

Para llevar a cabo este tipo de tests en el ámbito del laboratorio, se utiliza un aparato estandarizado que permite al investigador presentar al sujeto objetos en diferentes localizaciones. Desplazando el objeto correcto, o el objeto en la localización correcta, el animal consigue un premio de comida situado en un pocillo bajo el objeto en cuestión. A través de estos tests neuropsicológicos se ha logrado evaluar la relación entre la edad y la capacidad cognitiva, caracterizar las bases neurobiológicas del SDC y valorar la necesidad de posibles intervenciones terapéuticas.[17,37,38] Cabe destacar que estos tests han permitido detectar el inicio del declive cognitivo en Beagles

de incluso 6 años de edad, mientras que el diagnóstico en la clínica suele llevarse a cabo a los 11 de edad o más.[24] Sin embargo, dada su complejidad y necesidad de entrenamiento previo, estas pruebas son difíciles de llevar a cabo en el ámbito clínico.

Test "no cognitivos"

Además de cambios en la función cognitiva, en los animales geriátricos también se han observado cambios en el comportamiento espontáneo, que englobaría la locomoción, la exploración y las interacciones sociales. En tests de tipo *open-field*, se ha observado que los perros ancianos sanos son menos activos que los jóvenes pero, sorprendentemente, los dementes presentan una mayor actividad de locomoción.[39-41] Asimismo, los perros dementes exploran mucho menos, o no exploran, en comparación con los ancianos no afectados por la enfermedad.[40] Finalmente, en los test en los que se evalúa la interacción con personas, se ha visto que los perros jóvenes y los ancianos sanos pasan más tiempo con la persona, mientras que los dementes tienden a ignorarla.[39,40,42] El uso de este tipo de tests en el ámbito clínico para el diagnóstico del SDC se halla actualmente en vías de investigación.

Diagnóstico por imagen

Tomografía Computerizada (TC)

En los pacientes con SDC, generalmente se usa para descartar otras causas de alteraciones cognitivas como tumores intracraneales o hidrocefalia.

Resonancia magnética (RM)

Se ha utilizado para detectar cambios neuroanatómicos y cerebrovasculares en perros de edad avanzada. A través de este tipo de pruebas diagnósticas, se ha observado que los perros ancianos muestran agrandamiento de los ventrículos y atrofia cortical.[43] En un estudio realizado por Tapp y colaboradores, se observó una correlación entre la atrofia del lóbulo frontal en perros ancianos y alteraciones del control inhibitorio y la memoria. Asimismo, también se ha hallado una correlación significativa entre la disminución del volumen del lóbulo frontal y el incremento de la acumulación de Aβ en el córtex frontal. Finalmente, también se ha hallado una correlación entre la presencia de atrofia hipocampal y alteraciones en la memoria, pero no con una disfunción del control inhibitorio.[44]

En la clínica diaria, el uso de resonancia magnética en pacientes con posible SDC generalmente se usa para descartar otras patologías que puedan cursar con alteraciones cognitivas, tales como tumores intracraneales, hidrocefalia o alteraciones vasculares.

Tomografía por emisión de fotón único (SPECT)

Esta técnica de imagen ha permitido observar que la perfusión cerebral disminuye significativamente en perros ancianos con respecto a los animales jóvenes en las regiones frontal, temporocortical y subcortical, lo cual también se ha observado en humanos.[45-47] Asimismo, se ha comprobado que, con la edad, disminuye la unión de los isotopos a receptores serotoninérgicos en la región frontocrotical.[47] En esta línea, se sugiere que esta técnica podrá ser usada en un futuro para el estudio de enfermedades como el SDC, mediante la valoración del metabolismo de las neuronas dopaminérgicas.[48]

Biomarcadores

En pro de realizar un diagnóstico temprano de la EA en humanos se han propuesto diferentes biomarcadores en base a los distintos procesos que intervienen en la fisiopatología de la enfermedad. La medición de Aβ en plasma, en sus formas Aβ40 (40 aminoácidos) o Aβ42 (42 aminoácidos), ha sido propuesta como método diagnóstico no invasivo para diferenciar enfermos de Alzheimer leves de los sanos. Nuestro grupo investigador ha llevado a cabo recientemente un estudio donde se han encontrado diferencias significativas en los niveles plasmáticos de Aβ42 de perros ancianos sanos y con SDC. En particular, los niveles de Aβ42 en plasma y la ratio Aβ42/Aβ40 eran significativamente más altos en los perros con SDC leve que en los controles de la misma edad sin deterioro cognitivo, de modo que la determinación de Aß en plasma podría ayudar al diagnóstico del SDC en fases iniciales de la enfermedad. Por otro lado, y en concordancia con lo que se ha descrito para los enfermos de Alzheimer grave, los perros con SDC grave mostraban niveles plasmáticos de Aβ similares a los de los controles.[35] De manera similar, Head y colaboradores también han encontrado una disminución de los niveles de Aβ42 con la edad en el líquido cefalorraquídeo de perros Beagle; además, estos bajos niveles de Aβ42 correlacionaron con la extensión de los depósitos de Aβ42 y Aβ40 en el cerebro de estos animales.[49] Si bien estos resultados en perros y personas son esperanzadores, habrá que llevar a cabo más estudios para poder llegar a utilizar este tipo de biomarcadores en el ámbito clínico.

Tratamiento

Muchos de los síntomas de SDC, tales como la eliminación inadecuada, las vocalizaciones excesivas y la agresividad, hacen que la relación entre el propietario y su mascota se vea afectada hasta el punto de considerar la eutanasia o el abandono del animal. La decisión de instaurar un tratamiento en estos casos resulta a menudo complicada, ya que, a falta de la existencia de un tratamiento definitivo, hemos de considerar el estado de salud del animal geriátrico y el posible fracaso de las pautas de comportamiento dada la menor capacidad de aprendizaje. De ahí

Parte del tratamiento debe ir encaminado a reducir la ansiedad que pueden estar padeciendo estos animales

la necesidad de desarrollar herramientas diagnósticas objetivas, como los tests, que nos permitan conocer el estado cognitivo del animal de una forma precoz y, conforme a eso, establecer el protocolo terapéutico adecuado. En este sentido, en la actualidad se opta por la instauración de una terapia combinada que incluye pautas de comportamiento, fármacos, nutracéuticos y dietas especiales, que se comentan a continuación.

Pautas de comportamiento

Pautas generales para el manejo del SDC

- Mantener una rutina diaria en todas las actividades que giran entorno al animal, haciendo que el ambiente sea más predecible y, por tanto, menos estresante.[50]
- Enriquecimiento del ambiente del animal a través de distintas estrategias:
  - Paseos cortos.
  - Adiestramiento en positivo de órdenes sencillas.
  - Juegos de tira y afloja.
  - Juegos de esconder y buscar objetos o premios.
  - Juguetes interactivos en los que esconder comida en su interior tipo Kong®.
  - Juguetes masticables.

Se ha demostrado que estas medidas podrían ayudar a mantener las funciones cognitivas y enlentecer el progreso de la enfermedad.[51] En cualquier caso, tendremos que tener presentes las limitaciones físicas del animal.

- Proporcionar más salidas al exterior a aquellos pacientes que eliminen en casa o crear (en casa) un área de eliminación y premiarles por usarla.
- Se podría añadir a su entorno nuevos olores, sonidos o elementos táctiles que ayuden al animal a orientarse por su casa (por ejemplo, velas aromáticas de distintos olores para cada habitación).[52]

Pautas para la alteración del ciclo sueño-vigilia

- Mantener una rutina predecible y consistente con respecto a las horas de descanso del animal.
- Dar masajes relajantes en su cuna antes de dormir.
- Apagar la televisión y las luces antes de ir a dormir (aunque algunas mascotas con problemas visuales se pueden beneficiar de dejar una luz tenue en su zona de descanso).
- Es recomendable utilizar un collar o difusor de feromonas (Adaptil®, CEVA Salud Animal, Barcelona) en su zona de descanso.
- Proporcionar un área de descanso confortable, basándonos en las preferencias del animal. Muchos preferirán dormir en la misma habitación que sus propietarios, mientras que otros preferirán hacerlo en una habitación separada (esto último es recomendable si el animal tiende a deambular por la noche).
- Evitar reñir o castigar al animal porque nos despierte por la noche, pues solo contribuirá a aumentar su ansiedad.
- Las capas de confort como Anxiety Wrap® o Thundershirt®, podrían reducir la agitación y ayudar al animal a descansar. La Calming cap® también podría ayudar al animal a descansar, pero hay que utilizarla con precaución en los animales que deambulan por las noches, pues reduce la visibilidad.
- Por la mañana es conveniente abrir las ventanas y dejar que entre la luz natural. Si se tiene la oportunidad, es bueno dejar que el perro se beneficie de la luz natural del día fuera de casa el mayor tiempo posible, pues ayuda a mantener el ciclo de sueño-vigilia. Si no es así, se recomienda dar largos paseos con el paciente a la luz del día y, si no puede andar demasiado, simplemente permanecer con él en el parque de forma tranquila.
- Incrementar la actividad del perro durante las horas del día mediante sesiones de juego o adiestramiento con su propietario, o con juguetes interactivos. Algunos autores recomiendan jugar con el animal antes de que vaya a dormir.

Fármacos (Tabla 2)

Clorhidrato de Selegilina: se trata de un inhibidor irreversible y específico de la monoamino oxidada B (MAOB). Es el primer fármaco aprobado para el tratamiento de SDC en perros, basándose para ello en los resultados de test neuropsicológicos en laboratorio así como en estudios clínicos.[53-57] Aunque no se conoce muy bien la razón por la cual la selegilina produce una mejoría en los perros con SDC, se cree que es por el aumento que produce de la dopamina y de otras catecolaminas en la corteza cerebral e hipocampo.[58] La selegilina podría contribuir a disminuir los niveles de radicales libres en el cerebro mediante el barrido directo de estos o mediante el incremento de las enzimas catalasa y superoxido dismutasa.[59] Además, dado que la selegilina inhibe la MAOB, la producción de radicales libres será menor. Asimismo, se ha descrito un efecto neuroprotector de la selegilina en las neuronas dopaminérgicas, colinérgicas y noradrenérgicas.[60]

Generalmente se recomienda comenzar el tratamiento con la dosis más baja y si al cabo de 30 días no se observa mejoría, se incrementa la dosis.[24,61]

Fármacos que incrementan la perfusión cerebral: dado que con la edad se puede producir una reducción de la perfusión cerebral en el perro, el incremento de esta mediante fármacos podría ayudar a mejorar los signos de enfermedad cognitiva.[47]

- ***Nicergolina:*** es un antagonista alfa-1 y alfa-2 adrenérgico adecuado para el tratamiento de perros que comienzan a mostrar disminución de la actividad, alteraciones en el ciclo de sueño-vigilia, eliminación inadecuada, intolerancia al ejercicio, disminución del apetito y alteraciones del estado de consciencia mostrando en algunos casos mejoría de estos síntomas.[33,37,62]
- ***Propentofilina*** (Karsivan®, Intervet Schering-Plough, Madrid)***:*** es un fármaco aprobado para el tratamiento de embotamiento y letargia en perros geriátricos en RU, Alemania y España.
- ***Adrafanil y modafanil***: en el perro se han hecho estudios en laboratorio que indican que el adrafanil

Tabla 2. Terapia farmacológica en el Síndrome de disfunción cognitiva

	FÁRMACO	DOSIS	EFECTO
IMAO	**Selegilina**	0,5-1 mg/kg	Aumenta la dopamina y otras catecolaminas. Efecto neuroprotector. Mejoría de los síntomas.
Antagonista alfa-1 y alfa-2 adrenérgico	**Nicergolina**	0,25-0,5 mg/kg/día	Incrementa la perfusión cerebral, la transmisión neuronal, turnover de dopamina y noradrenalina, efecto neuroprotector e inhibe la agregación plaquetaria.
Metilxantinas	**Propentofilina**	3 mg/kg, BID	Incrementa el aporte de oxígeno en el SNC sin incrementar la demanda de glucosa, inhibe la agregación plaquetaria y aumenta el flujo sanguíneo en cerebro.
Agonista alfa-1	**Adrafanil y Modafanil**	20 mg/kg	Mantiene el estado de atención, de alerta, el ritmo de sueño-vigilia, la memoria y el aprendizaje. Efecto neuroprotector.
Colinérgicos	**Phenserina** **Donezepilo**	0,5 mg/kg 1,5 mg/kg	Mejoran el aprendizaje y la memoria.
Hormona	**Melatonina**	3-9 mg/perro	Ayuda a restablecer el ritmo circadiano.
Antihistamínico	**Difenhidramina**	2-4 mg/kg	Sedación.
Antidepresivo	**Trazodona**	2-10 mg/kg, BID o TID	Inhibe la recaptación de serotonina.
Benzodiacepinas	**Alprazolam** **Diazepam** **Oxazepam** **Clonacepam** **Lorazepam**	0,02-0,1 mg/kg, BID o QUID 0,5-2 mg/kg SID-QUID 0,2-1 mg/kg SID-BID 0,1-1 mg/kg BID-TID 0,025-0,2 mg/kg, SID-TID	Acción sedativa y ansiolítica.
Ansiolítico	**Buspirona**	0,5-2,0 mg/kg SID-TID	Efecto ansiolítico.
Inhibidores selectivos de la bomba de recaptación de serotonina	**Fluoxetina** **Sertralina**	1-2 mg/kg,SID 1-5 mg/kg,SID	Antidepresivo, ansiolítico, ayuda a disminuir la ansiedad, agresividad e impulsividad.

mejora la cognición del animal, así como el estado de vigilancia. En test de *open-field* se ha comprobado que el adrafanil incrementa la locomoción sin incrementar los comportamientos estereotipados.[63,64] Algunos estudios indican que produce alteraciones en la memoria, probablemente por incremento de la transmisión noradrenérgica en el córtex prefrontal.[65] Se suele utilizar en perros ancianos para mantener el estado de alerta y el ritmo de sueño-vigilia.[24] En nuestro país, el adrafanil no se encuentra a la venta.

Un estudio realizado por Siwak y su equipo comparó los cambios que producen en la actividad de los perros los fármacos adrafinil, nicergolina y propentofilina. El adrafinil provocó un incremento de la locomoción, mientras que los otros dos fármacos no produjeron efectos en la actividad.[66]

Fármacos que incrementan la transmisión colinérgica: desde que se conoce que la pérdida de memoria está asociada a la depleción de acetilcolina, el tratamiento para la Enfermedad de Alzheimer se ha centrado, en gran medida, en el uso de fármacos que incrementan la transmisión colinérgica. En perros existen estudios en relación a dos fármacos, mas ninguno de ellos se comercializa en nuestro país:

- ***Fenserina:*** un pequeño trabajo que comparó el uso de fenserina con placebo demostró que los animales que recibieron el fármaco mejoraron el aprendizaje y la memoria. Además, parece que sus efectos pueden perdurar hasta una semana después de haber finalizado el tratamiento.[67]
- ***Donezepilo:*** se ha demostrado que el donezepilo ayuda a mejorar la memoria y el aprendizaje en perros Beagle.[68]

Otros fármacos: los pacientes con SDC podrían beneficiarse de otras medicaciones para tratar los síntomas de ansiedad o para intentar restablecer los ciclos de sueño-vigilia:[52]

- ***Melatonina:*** aunque no tiene efecto sedante, podría darse por la noche, media hora antes de dormir.
- ***Difenhidramina y trazodona:*** son fármacos que se dan habitualmente para otras indicaciones y que proporcionan una ligera sedación, sin llegar a causar incoordinación, que puede resultar útil para que el animal descanse de noche.
- ***Benzodiacepinas:*** pueden resultar útiles debido a su acción sedativa y ansiolítica. En estos animales debe-

mos recomendar clorazepam, lorazepam u oxacepam, ya que son más seguros que el diazepam o el alprazolam en caso de compromiso hepático.

- ***Buspirona e inhibidores de la recaptación de serotonina (fluoxetina*** (Reconcile®, Elanco, Madrid) ***y sertralina):*** están indicados cuando la patología cursa con ansiedad generalizada, fobias a los ruidos, o ansiedad por separación que no está solo restringida a la ansiedad nocturna. Son preferibles a los antidepresivos tricíclicos y a la paroxetina, ya que estos tienen un cierto efecto anticolinérgico.

- ***L-teanina*** (Anxitane®, Virbac, Barcelona), **α-casocepina** (Zylkene®, Intervet Schering-Plough, Madrid), ***feromonas*** (Adaptil®, Ceva Salud Animal, Barcelona), ***esencias de lavanda:*** estas sustancias podrían ayudar a relajar al animal.

Nutracéuticos

- **Fosfaditilserina:** es un fosfolípido que se encuentra en gran cantidad en las membranas celulares, especialmente en la zona sináptica de las neuronas.[69] Varios estudios muestran una mejoría de los síntomas, en perros diagnosticados de SDC, tras el tratamiento con suplementos nutricionales que contienen fosfaditilserina.[70-72] Se comercializa como Aktivait®, Vetplus, Barcelona, y también lo encontramos en algunos piensos como Senior Consult Mature (Royal Canin®).

- **Ácido Docosahexaenoico (DHA):** se trata de un ácido graso omega-3 de gran importancia en el mantenimiento de la función celular del cerebro, pudiendo una deficiencia de DHA contribuir a la aparición de alteraciones cognitivas.[73]

- **Ginkgo biloba:** es un inhibidor de la MAO A y B cuyo uso está autorizado en Alemania para el tratamiento de casos tempranos de EA. El ginkgo biloba ya se ha incorporado a numerosos productos no farmacéuticos. Un estudio realizado con suplemento nutracéutico comercial compuesto a base de fosfaditilserina, ginkgo biloba, vitamina E y piridoxina en perros ancianos, sugiere que éste podría mejorar la memoria en perros de edades avanzadas.[74]

- **Vitamina B6 (piridoxina):** esta vitamina interviene en la síntesis de neurotransmisores (serotonina, noradrenalina, dopamina), apoyando así la función de la fosfaditilserina en la regulación de los niveles de neurotransmisores y en la transmisión sináptica.[75]

- **Vitamina E:** tiene efectos antioxidantes, previniendo que se dañen las membranas celulares. Es un principio importante de las dietas diseñadas como suplemento para el tratamiento de SDC.[76]

- **S-Adenosyl-L-Metionina (SAME):** esta sustancia ayudaría a mantener la fluidez de las membranas celulares, las funciones de los receptores, el funcionamiento de los neurotransmisores, así como a incrementar la producción de glutatión.[77] En un estudio que comparaba un grupo tratado con SAME (a una dosis de 18 mg/kg al día) y otro placebo, se observó en los animales que recibieron SAME, un aumento en la actividad y en la atención tras 8 semanas de tratamiento.[78]

Tratamiento dietético

A continuación citaremos las dietas sobre las que se han realizado más estudios, no obstante en el mercado podemos encontrar otras con componentes similares.

- **Canine b/d Hill's Pet Nutrition:** se trata de una dieta enriquecida con ácidos grasos, antioxidantes (vitamina C, E, β-carotenos, selenio, flavonoides y carotenoides), L-carnitina y DL-α-ácido lipoico. El objetivo de este pienso es aumentar la función mitocondrial y se ha observado que mejora los signos de SDC y enlentece su progreso.[79-81]

- **Proplan Senior 7 (Nestlé Purina PetCare):** es una nueva dieta que contiene aceites vegetales ricos en triglicéridos de cadena media (TCM), que proporciona cuerpos cetónicos como fuente alternativa de energía para las neuronas. Se ha demostrado que los TCM mejoran la función mitocondrial, aumentan los ácidos grasos poliinsaturados y disminuyen los niveles de proteína precursora de amiloide en el córtex parietal de los perros ancianos,[82,83] traduciéndose esto en una mejoría de la función cognitiva de estos animales.[84]

Inmunoterapia

En línea con el desarrollo de vacunas activas para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, nuestro grupo (y otros) también ha llevado a cabo experimentos de inmunización activa de perros geriátricos con vacunas frente a diferentes péptidos amiloides.[85,86] Los primeros resultados han sido esperanzadores y así, la vacunación activa afrente a Aβ42 dio como resultado la depleción total de los niveles plasmáticos de Aβ42 en los animales vacunados.[87] Además, en un experimento complementario, se observó que la vacunación producía una reducción sustancial de los niveles de Aβ42 y Aβ40 (54% y 65%, respectivamente) en tejido cerebral con respecto a perros control inyectados con placebo.[88]

Contribuciones

Á. González-Martínez y B. Rosado contribuyeron de igual forma en la elaboración del artículo.

Summary

Cognitive dysfunction syndrome, a neurodegenerative disease, is relatively common in older dogs including a constellation of behavioral and cognitive deficits. An earlier diagnosis and adequate therapeutic protocol could help to improve the quality of life of the dogs as well as the relationships with their owners.

Fuente de financiación: Este trabajo fue parcialmente financiado por la empresa Araclon Biotech.
Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Adams B, Chan A, Callahan H, Milgran NW: The canine as a model of human brain aging: recent developments. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2000; 24:675-692.

2. Su M, Head E, Brooks W, et al: MR imaging of anatomic and vascular characteristics in a canine model of human aging. *Neurobiol Aging* 1998; 19: 479-485.

3. Borrás D, Ferrer I, Pumarola M: Aged-related changes in the brain of the dog. *Vet Pathol* 1999; 36:202-211.

4. Shimada A, Kuwamura M, Awakura T, et al: Topographic relationship between senile plaques and cerebrovascular amyloidosis in the brain of aged dogs. *J Vet Med Sci* 1992; 54:137-144.

5. Shimada A, Kuwamura, M, Awakura T, Umemura T, ltakura C: An immunohistochemical and ultrastructural study on age-related astrocytic gliosis in the central nervous system of dogs. *J Vet Med Sci* 1992; 54:29-36.

6. Bondareff W, Mountjoy CQ, Roth M: Loss of neurons of origin of the adrenergic projection to cerebral cortex (nucleus locus ceruleus) in senile dementia. *Neurology* 1982; 32:164-168.

7. Aletrino MA, Vogels OJ, Van Domburg PH, Ten Donkelaar HJ: Cell loss in the nucleus raphes dorsalis in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1992; 13:461-468.

8. Bernedo V, Insua D, Suárez ML, Santamarina G, Sarasa M, Pesini P: The β-amyloid cortical deposits are accompanied by the loss of serotonergic neurons in the dog. *J Comp Neuro* 2009; 513:417-429.

9. Insua D, Suárez ML, Santamarina G, Sarasa M, Pesini P: Dogs with canin counterpart of Alzheimer's disease lose noradrenergic neurons. *Neurobiology of Aging* 2010; 31:625-635.

10. Ruehl WW, Bruyette DS, DePaoli A, et al: Canine cognitive dysfunction as a model for human age related cognitive decline, dementia and Alzheimer's disease: clinical presentation, cognitive testing, pathology and response to 1-deprenyl therapy. *Prog Brain Res* 1995; 106:217-225.

11. Milgram NW, Head E, Weiner E, Thomas E: Cognitive functions and aging in the dog: acquisition of nonspatial visual tasks. *Behav Neurosci* 1994; 108:57-68.

12. Cummings BJ, Head E, Ruehl W, Milgram NW, Cotman CW: The canine as an animal model of human aging and dementia. *Neurobiol Aging* 1996; 17:259-68.

13. Cummings BJ, Head E, Afagh AJ, Milgram NW, Cotman CW: Beta amyloid accumulation correlates with cognitive dysfunction in the aged canine. *Neurobiol Learn Mem* 1996: 66:11-23.

14. Colle M-A, Hauw J-J, Crespau F, et al: Vascular and parenchymal beta-amyloid deposition in the aging dog: correlation with behavior. *Neurobiol Aging* 2000; 21(5):695-704.

15. Rofina JE, Singh K, Skoumalova-Vesela A, et al: Histochemical accumulation of oxidative damage products is associated with Alzheimer-like pathology in the canine. *Amyloid* 2004; 11:90-100.

16. Rofina JE, van Ederen AM, Toussaint MJM, et al: Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. *Brain Res* 2006; 1069:216-226.

17. Head E, Callahan H, Muggenburg BA, Cotman CW, Milgram NW: Visualdiscrimination learning ability and beta-amyloid accumulation in the dog. *Neurobiol Aging* 1998; 19:415-25.

18. Blessed G, Tomlinson BE, Roth M: The association between quantitative measures of dementia and of senile change in the cerebral grey matter of elderly subjects. *Br J Psychiatry* 1998; 114:797-811.

19. Cummings BJ, Cotman CW: Beta-amyloid "load" correlates with severity of Alzheimer's dementia: quantification via image analysis. *Lancet* 1995; 346:1524-1528.

20. Azkona G, García-Belenguer S, Chacón G, Rosado B, León M, Palacio J: Prevalence and risk factors of behavioural changes associated with age-related cognitive impairment in geriatric dogs. *J Small Anim Practice* 2009; 50:87-91

21. Osella MC, Re G, Odore R, et al: Canine cognitive dysfunction syndrome: Prevalence, clinical signs and treatment with a neuroprotective nutraceutical. *Appl Anim Behav Sci* 2007; 105:297-310

22. Yalcin E, Kasap S, Demir G: Prevalence of behavioral changes associated with aged-related cognitive impairment in geriatric gogs, Bursa, Turkey. *JVA* 2010; 9:1828-1832

23. Salvin HE, McGreevy PD, Sachdev PS, Valenzuela MJ: Under diagnosis of canine cognitive dysfunction: A cross-sectional survey of older companion dogs. *Vet J* 2010; 184:277-281.

24. Landsberg G, Araujo JA: Behavior problems in geriatric pets. *Vet Clin Small Anim* 2005; 35:675-698.

25. Heath SE, Barabas S, Craze PG: Nutritional supplementation in cases of canine cognitive dysfunction a clinical trial. *Appl Anim Behav Sci* 2007; 105:284-296.

26. Neilson JC, Hart BL, Cliff KD, Ruehl WW: Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2001; 218:1787-1791.

27. Doty R, Shaman P, Applebaum S, Giberson R, Siksorski L, Rosenberg L: Smell identification ability: Changes with age. *Science* 1984; 226:1441-1443.

28. Koss E, Weiffenbach J, Haxby J, Friedland R: Olfactory detection and identification performance are dissociated in early Alzheimer's disease. *Neurology* 1988; 38:1228-1232.

29. Russell MJ, Cummings BJ, Proffitt BF, Wysocki CJ, Gilbert AN, Cotman CW: Lifespan changes in the verbal categorization of odours. *J Gerentol* 1993; 48:49-53.

30. Hirai T, Kojirna S, Shirnada A, Urnernura T, Sakai M, ltakura C: Age-related changes in the olfactory system of dogs. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1996; 22:531-539.

31. Aronson L: Systemic causes of aggression and their treatment. En Dodman NH, Shuster L (ed): Psychopharmacology of animal behavior disorders, Malden MA, Blackwell Scientific, 1998; 64-102.

32. Feldman EC, Nelson RW: Hiperadrenocorticismo canino (Síndrome Cushing). En Endocrinología y reproducción canina y felina, 3ª Edición, Buenos Aires, Inter- Médica, 2007; 401-404.

33. Landsberg GM, Hunthausen W, Ackerman L: The effects of aging on the behaviour of senior pets. En Handbook of behavior problems of the dog and cat, 2nd edition, London, WB Saunders, 2008; 269-304.

34. Bowen J, Heath S: Geriatric behavioural issues. En Behaviour problems in small animals. Practical advice for the veterinary team, London, WB Saunders, 2005; 59-69.

35. González-Martínez A, Rosado B, Pesini P, et al: Plasma β-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease. *Exp Gerontol* 2011; 46:590-596.

36. Pugliese M, Geloso MC, Carrasco JL, Mascort J, Michetti F, Mahy N: Canine cognitive deficit correlates with diffuse plaque maturation and S100β (-) astrocytosis but not with insulin cerebrospinal fluid level. *Acta Neuropathol (Berl)* 2006; 111:519-28.

37. Landsberg G: Therapeutic agents for the treatment of cognitive dysfunction syndrome in senior dogs. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29: 471-479.

38. Milgram NW, Head E, Weiner E, Thomas E: Cognitive functions and aging in the dog: acquisition of nonspatial visual tasks. *Behav Neurosci* 1994; 108:57-68.

39. Head E, Callahan H, Cummings BJ, et al: Open field activity and human interaction as a function of age and breed in dogs. *Physiol Behav* 1997; 62: 963-971.

40. Siwak CT, Tapp PD, Milgram NW: Effect of age and level of cognitive function on spontaneous and exploratory behaviors in the beagle dog. *Learn Mem* 2001; 8:317-325.

41. Rosado B, González-Martínez A, Pesini P: Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs - Part 1: Locomotor and exploratory behaviour. *Vet J 2012a*. http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.03.025

42. Rosado B, González-Martínez A, Pesini P: Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs - Part 2: Social responsiveness. *Vet J* 2012b http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.03.023.

43. Su M, Head E, Brooks W, et al: MR imaging of anatomic and vascular characteristics in a canine model of human aging. *Neurobiol Aging* 1998; 19:479-485.

44. Tapp PD, Siwak CT, Gao FQ, et al: Frontal lobe volume, function, and β-amyloid pathology in a canine model of aging. *J Neurosci* 2004; 24:8205-8213.

45. Markus HS, Ring H, Kouris K, Costa DC: Alterations in regional cerebral blood flow, with increased temporal interhemispheric asymmetries, in the normal elderly: an HMPAO SPECT study. *Nucl Med Commun* 1993; 14:628-633.

46. Petit-Taboue MC, Landeau B, Desson JF, Desgranges B, Baron JC: Effects of healthy aging on the regional cerebral metabolic rate of glucose assessed with statistical parametric mapping. *Neuroimage* 1998; 7:176-184.

47. Peremans K, Audenaert K, Blanckaert P et al. Effects of aging on brain perfusion and serotonin-2A receptor binding in the normal canine brain measured with single photon emission tomography. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2002; 26:1393-1404.

48. Vermeire S, Audenaert K, Vandermeulen E: Single photon emission computed tomography (SPECT) imagin of the dopamine transporter in healthy dogs. *Vet J* 201; 188:356-358.

49. Head E, Pop V, Sarsoza F, et al: Amyloid β-peptide and oligomers in the brain and CSF of aged. *J Alzheimers Dis* 2010; 20: 637-646.

50. McMillan FD: Maximizing quality of life in ill animals. *J Am Anim Hosp Assoc* 2003; 39:227-235.

51. Milgram NW, Head EA, Zicker SC, et al: Long term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment reduces age-dependant impairment in discrimination and reversal learning in beagle dogs. *Exp Gerontol* 2004; 39:753-765.

52. Landsberg GM, DePorter T, Araujo JA: Clinical signs and management of anxiety, sleeplessness, cognitive dysfunction in the Senior Pet. *Vet Clin Small Anim* 2011; 41: 565-590.

53. Head E, Milgram NW: Changes in spontaneous behavior in the dog following oral administration of L-Deprenil. *Pharmacol Biochem Behav* 1992; 43:749-757.

54. Milgram NW, Ivy GO, Head E, et al: The effect of l-deprenyl on behavior, cognitive function, and biogenic amines in the dog. *Neurochem Res* 1993; 18: 1211-1219.

55. Milgram NW, Ivy GO, Murphy MP, et al: Effects of chronic oral administration of l-deprenyl in the dog. *Pharmacol Biochem Behav* 1995; 51: 421-428.

56. Mills D, Ledger R: The effects of oral selegiline hydrochloride on learning and training in the dog: a psychobiological interpretation. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat* 2001; 25:1597-1613.

57. Campbell S, Trettien A, Kozan B: A noncomparative open-label study evaluating the effect of selegiline hydrochloride in a clinical setting. *Vet Ther* 2001; 2:24-39.

58. Knoll J (1998) l-Deprenyl (selegiline) a catecholaminergic activity enhancer (CAE) substance acting in the brain. *Pharmacol Toxicol* 82:57-66.

59. Carillo MC, Ivy GO, Milgram NW, Head E, Wu P, Kitani K: Deprenyl increases activity of superoxide dismutase in striatum of dog brain. *Life Sci* 1994; 54:1483-1489.

60. Heinonen EH, Lammintausta R: A review of the pharmacology of selegiline. *Acta Neurol Scand* 1991; 84:44-59.

61. Crowell-Davis SL, Murray T: Inhibidores de la monoaminooxidasa. En Psicofarmacología veterinaria, Zaragoza, Ed. Acribia S.A., 2006; 150-160.

62. Azkona G, Garcia-Belenguer S, Unzueta A, Chacón G, Rosado B, León M.Palacio J: Tratamiento con nicergolina de dos casos de disfunción cognitiva en perros geriátricos. *Clin Vet Peq Anim* 2005; 25:11-15.

63. Siwak CT, Callahan H, Milgram NW: Adrafinil: effects on behavior and recognition in aged canines. *Prog Neuro-Psychopharmacol & Biol Psychiat* 2000; 24:709-726.

64. Siwak CT, Gruet P, Woehrlé F, et al: Behavioral activating effects of adrafinil in aged canines. *Pharmacol Biochem and Behav* 2000; 66(2):193-300.

65. Siwak CT, Tapp PD, Milgram NW: Adrafinil disrupts performance on a delayed nonmatching-to-position task in aged beagle dogs. *Pharmacol Biochem and Behav* 2003; 76:161-168.

66. Siwak CT, Gruet P, Woehrle F, Muggenburg BA, Murphey HL, Milgram NW: Comparison of the effects of adrafinil, propentofylline and nicergoline on behavior in aged dogs. *Am J Vet Res* 2000; 61:1410-1414.

67. Araujo JA, Studzinski CM, Milgram NW: Further evidence for the cholinergic hypothesis of aging and dementia from the canine model of aging. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29:411-422.

68. Araujo JA, de Rivera C, Milgram NW, Sandin J: Pharmacological validation of the canine model of Alzheimer's disease: donepezil improves memory in cognitively impaired aged beagle dogs. *Alzheimers Dement* 2009; 5:23.

69. Kidd PM: A review of nutrients and botanicals in the integrative management of cognitive dysfunction. *Altern Med Rev* 1999; 4: 144-161.

70. Head E: Combining an antioxidant-fortified diet with behavioral enrichment leads to cognitive improvement and reduced brain pathology in aging canines: strategies for healthy aging. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1114:398-406.

71. Osella MC, Re G, Odoreb R, Badino P, Bergamasco L, Miolo: A Phosphatidylserine (PS) as a potential nutraceutical for canine brain aging: A review. *J Vet Behav* 2008; 3:41-51.

72. Araujo JA, Landsberg G, Miolo A: Assessment of the effects of a phosphatidylserine-containing nutraceutical on visuospatial memory of aged dogs: neuropsychological testing. *J Vet Pharmacol Ther* 2006; 29:205-206.

73. Horrocks LA, Yeo Y: Health benefits of docosahexaenoic acid (DHA). *Pharmacol Res* 1999; 40, 211-225.

74. Araujo JA, Landsberg N, Milgram NW, Miolo A: Improvement of short-term memory performance in aged beagles by a nutraceutical supplement containing phosphatidylserine, Ginko biloba, vitamin E and pyridoxine. *Can Vet J* 2008; 49:379-385.

75. Dakshinamurti K, Paulose CS, Siow YL: Neurobiology of pyridoxine. En Reynolds RD, Leklem JE, (eds). Vitamin B6: Its role in health and disease, New York, Alan R Liss, 1995; 99-121.

76. Landsberg G: Therapeutic options for cognitive decline in senior pets. *J Am Anim Hosp Assoc* 2006; 42:407-413.

77. Bottiglieri T: S-Adenosyl-L-methionine (SAMe): from the bench to the bedsidemolecular basis of a pleiotrophic molecule. *Am J Clin Nutr* 2002; 76: 11515-11575.

78. Re`me CA, Dramard V, Kern L, Hofmans J, Halsberghe C, Mombiela DV: Effect of S-adenosylmethionine tablets on the reduction of age-related mental decline in dogs: a double-blind placebocontrolled trial. *Vet Ther* 2008; 9: 69-82.

79. Milgram NW, Head E, Muggenburg B, et al: Landmark discrimination learning in the dog; effects of age, an antioxidant fortified food and cognitive strategy. *Neurosci Biobehav Rev* 2002; 26:679-695.

80. Milgram NW, Head EA, Zicker SC, et al: Long term treatment with antioxidants and a program of behavioral enrichment reduces age-dependant impairment in discrimination and reversal learning in beagle dogs. *Exp Gerontol* 2004; 39:753-65.

81. Araujo JA, Studzinski CM, Head E, Cotman CW, Milgram NW: Assessment of nutritional interventions for modification of age-associated cognitive decline using a canine model of human aging. *Age* 2005; 27:27-37.

82. Studzinski CM, MacKay WA, Beckett TL, et al: Induction of ketosis may improve mitochondrial function and decrease steady-state amyloid-beta precursor protein (APP) levels in the aged dog. *Brain Res* 2008; 1226:209-17.

83. Taha AY, Henderson ST, Burnham WM: Dietary enrichment with medium chaintriglycerides (AC-1203) elevates polyunsaturated fatty acids in the parietal cortex of aged dogs; implications for treating age-related cognitive decline. *Neurochem Res* 2009; 34:1619-25.

84. Pan Y, Larson B, Araujo JA, et al: Dietary supplementation with medium-chain TAG has long-lasting cognition-enhancing effects in aged dogs. *Br J Nutr* 2010; 103:1746-54.

85. Head E, Barrett EG, Murphy MP, et al: Immunization with fibrillar Abeta(1-42) in young and aged canines: Antibody generation and characteristics, and effects on CSF and brain Abeta. *Vaccine* 2006; 24:2824-2834.

86. Head E: A two-year study with fibrillar-amyloid (Abeta) immunization in aged aanines: Effects on cognitive function and brain Abeta. *J Neurosci* 2008; 28:3555-3566.

87. Pesini P, Lacosta AM, Santamarina G, Suárez ML, González-Martínez A, Sarasa M: Immunization of dogs with C-terminal sequences of beta-amyloid protein is safe and depletes the protein from the blood. *Alzheimers Dement* 2009; 5(suppl 1):419.

88. Pesini P, Monleon I, Pérez-Grijalva V, et al: The use of Aβ C-terminal peptides in the early diagnosis and preventive treatment of AD. *Neurobiol Aging* 2010; 31:59.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFIA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

BIBLIOGRAFIA

Adams B, Chan A, Callahan H, Milgram NW, 2000a. The canine as a model of human cognitive aging: recent developments. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 24: 675-692.

Adams B, Chan A, Callahan H, Siwak C, Tapp D, Ikeda-Douglas C, Atkinson P, Head E, Cotman CW, Milgram NW, 2000b. Use of a delayed non-matching to position task to model age-dependent cognitive decline in the dog. Behav. Brain Res. 108: 47-56.

Almkvist O, Basun H, Backman L, Herlitz A, Lannfelt L, Small B, Viitanen M, Wahlund LO, Winblad B, 1998. Mild cognitive impairment--an early stage of Alzheimer's disease? J. Neural Transm. Suppl. 54: 21-29.

Andreasen N, Minthon L, Davidsson P, Vanmechelen E, Vanderstichele H, Winblad B, Blennow K, 2001. Evaluation of CSF-tau and CSF-Abeta42 as diagnostic markers for Alzheimer disease in clinical practice. Arch. Neurol. 58: 373-379.

Araujo JA, Chan AD, Winka LL, Seymour PA, Milgram NW, 2004. Dose-specific effects of scopolamine on canine cognition: impairment of visuospatial memory, but not visuospatial discrimination. Psychopharmacology (Berl) 175: 92-98.

Araujo JA, Sokolnicki J, Hesterman J, Hoppin J, Araujo DE, Dobson H, 2013. Development and application of a brain atlas for evaluation of canine cognitive decline using PET-MR techniques: Implication for early diagnosis of cognitive dysfunction syndrome. Mills DS, Graca Pereira G, Jacinto DM, 9th International Veterinay Behaviour Meeting , 64-65. 2013. Portugal.

Araujo JA, Studzinski CM, Milgram NW, 2005. Further evidence for the cholinergic hypothesis of aging and dementia from the canine model of aging. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 29: 411-422.

Assini A, Cammarata S, Vitali A, Colucci M, Giliberto L, Borghi R, Inglese ML, Volpe S, Ratto S, gna-Bricarelli F, Baldo C, Argusti A, Odetti P, Piccini A, Tabaton M, 2004. Plasma levels of amyloid beta-protein 42 are increased in women with mild cognitive impairment. Neurology 63: 828-831.

Azkona G, Garcia-Belenguer S, Chacon G, Rosado B, Leon M, Palacio J, 2009. Prevalence and risk factors of behavioural changes associated with age-related cognitive impairment in geriatric dogs. J. Small Anim Pract. 50: 87-91.

Baeken C, D'haenen H, Flamen P, Mertens J, Terriere D, Chavatte K, Boumon R, Bossuyt A, 1998. 123I-5-I-R91150, a new single-photon emission tomography ligand for 5-HT2A receptors: influence of age and gender in healthy subjects. Eur. J. Nucl. Med. 25: 1617-1622.

Bain MJ, Hart BL, Cliff KD, Ruehl WW, 2001. Predicting behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218: 1792-1795.

Bernedo V, Insua D, Suarez ML, Santamarina G, Sarasa M, Pesini P, 2009. Beta-amyloid cortical deposits are accompanied by the loss of serotonergic neurons in the dog. J. Comp. Neurol. 513: 417-429.

Biere AL, Ostaszewski B, Stimson ER, Hyman BT, Maggio JE, Selkoe DJ, 1996. Amyloid beta-peptide is transported on lipoproteins and albumin in human plasma. J. Biol. Chem. 271: 32916-32922.

Biringer F, Anderson JR, 1992. Self-recognition in Alzheimer's disease: a mirror and video study. J. Gerontol. 47: 385-388.

Biringer F, Anderson JR, Strubel D, 1988. Self-recognition in senile dementia. Exp. Aging Res. 14: 177-180.

Blasko I, Jellinger K, Kemmler G, Krampla W, Jungwirth S, Wichart I, Tragl KH, Fischer P, 2008. Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. Neurobiol. Aging 29: 1-11.

Blennow K, Hampel H, Weiner M, Zetterberg H, 2010. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. Nat. Rev. Neurol. 6: 131-144.

Borrás D, Ferrer I, Pumarola M, 1999. Aged-related changes in the brain of the dog. Vet. Pathol. 36: 202-211.

Bouwman FH, van der Flier WM, Schoonenboom NS, van Elk EJ, Kok A, Rijmen F, Blankenstein MA, Scheltens P, 2007. Longitudinal changes of CSF biomarkers in memory clinic patients. Neurology 69: 1006-1011.

Caston J, Chianale C, haye-Bouchaud N, Mariani J, 1998. Role of the cerebellum in exploration behavior. Brain Res. 808: 232-237.

Colle M-A, Hauw J-J, Crespeau F, Uchihara T, Akiyama H, Checler F, Pageat P, Duykaerts C, 2000. Vascular and parenchymal Abeta deposition in the aging dog: correlation with behavior. Neurobiol. Aging 21: 695-704.

Coren S, 1994. The intelligence of the dog. Bantam Book, Broadway, New York.

Cosentino SA, Stern Y, Sokolov E, Scarmeas N, Manly JJ, Tang MX, Schupf N, Mayeux RP, 2010. Plasma β-amyloid and cognitive decline. Arch. Neurol. 67: 1485-1490.

Cotman CW, Head E, 2008. The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches. J. Alzheimers. Dis. 15: 685-707.

Cummings BJ, Cotman CW, 1995. Image analysis of beta-amyloid load in Alzheimer's disease and relation to dementia severity. Lancet 346: 1524-1528.

Cummings BJ, Head E, Afagh AJ, Milgram NW, Cotman CW, 1996a. Beta-amyloid accumulation correlates with cognitive dysfunction in the aged canine. Neurobiol. Learn. Mem. 66: 11-23.

Cummings BJ, Head E, Ruehl W, Milgram NW, Cotman CW, 1996b. The canine as an animal model of human aging and dementia. Neurobiol. Aging 17: 259-268.

Cummings BJ, Satou T, Head E, Milgram NW, Cole GM, Savage MJ, Podlisny MB, Selkoe DJ, Siman R, Greenberg BD, Cotman CW, 1996c. Diffuse plaques contain C-terminal A beta 42 and not A beta 40: evidence from cats and dogs. Neurobiol. Aging 17: 653-659.

Cummings BJ, Su JH, Cotman CW, White R, Russell MJ, 1993. Beta-amyloid accumulation in aged canine brain: a model of early plaque formation in Alzheimer's disease. Neurobiol. Aging 14: 547-560.

De MG, Shapiro F, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Engelborghs S, De Deyn PP, Coart E, Hansson O, Minthon L, Zetterberg H, Blennow K, Shaw L, Trojanowski JQ, 2010.

Diagnosis-independent Alzheimer disease biomarker signature in cognitively normal elderly people. Arch. Neurol. 67: 949-956.

Du Y, Ni B, Glinn M, Dodel RC, Bales KR, Zhang Z, Hyslop PA, Paul SM, 1997. alpha2-Macroglobulin as a beta-amyloid peptide-binding plasma protein. J. Neurochem. 69: 299-305.

Esteve-Ratsch B, Kneissl S, Gabler C, 2001. Comparative evaluation of the ventricles in the Yorkshire Terrier and the German Shepherd dog using low-field MRI. Vet. Radiol. Ultrasound 42: 410-413.

Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, Scherr PA, Cook NR, Chown MJ, Hebert LE, Hennekens CH, Taylor JO, 1989. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. J.A.M.A. 262: 2551-2556.

Fagan AM, Holtzman DM, 2010. Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. Biomark. Med. 4: 51-63.

Fagan AM, Roe CM, Xiong C, Mintun MA, Morris JC, Holtzman DM, 2007. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. Arch. Neurol. 64: 343-349.

Ferrer I, Pumarola M, Rivera R, Zujar MJ, Cruz-Sanchez F, Vidal A, 1993. Primary central white matter degeneration in old dogs. Acta Neuropathol. 86: 172-175.

Filali M, Lalonde R, Rivest S, 2011. Anomalies in social behaviors and exploratory activities in an APPswe/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. Physiol Behav. 104: 880-885.

Frisoni GB, Fox NC, Jack CR, Jr., Scheltens P, Thompson PM, 2010. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. Nat. Rev. Neurol. 6: 67-77.

Galasko D, Chang L, Motter R, Clark CM, Kaye J, Knopman D, Thomas R, Kholodenko D, Schenk D, Lieberburg I, Miller B, Green R, Basherad R, Kertiles L, Boss MA, Seubert P, 1998. High cerebrospinal fluid tau and low amyloid beta42 levels in the clinical diagnosis of Alzheimer disease and relation to apolipoprotein E genotype. Arch. Neurol. 55: 937-945.

Gallup GG, Jr., 1968. Mirror-image stimulation. Psychol. Bull. 70: 782-793.

Graff-Radford NR, Crook JE, Lucas J, Boeve BF, Knopman DS, Ivnik RJ, Smith GE, Younkin LH, Petersen RC, Younkin SG, 2007. Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. Arch. Neurol. 64: 354-362.

Hashizume C, Suzuki M, Masuda K, Momozawa Y, Kikusui T, Takeuchi Y, Mori Y, 2003. Molecular cloning of canine monoamine oxidase subtypes A (MAOA) and B (MAOB) cDNAs and their expression in the brain. J. Vet. Med. Sci. 65: 893-898.

Head E, 2013. A canine model of human aging and Alzheimer's disease. Biochim. Biophys. Acta 1832: 1384-1389.

Head E, Callahan H, Cummings BJ, Cotman CW, Ruehl WW, Muggenberg BA, Milgram NW, 1997. Open field activity and human interaction as a function of age and breed in dogs. Physiol. Behav. 62: 963-971.

Head E, Callahan H, Muggenburg BA, Cotman CW, Milgram NW, 1998. Visual-discrimination learning ability and beta-amyloid accumulation in the dog. Neurobiol. Aging 19: 415-425.

Head E, Liu J, Hagen TM, Muggenburg BA, Milgram NW, Ames BN, Cotman CW, 2002. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. J. Neurochem. 82: 375-381.

Head E, Milgram NW, 1992. Changes in spontaneous behavior in the dog following oral administration of L-deprenyl. Pharmacol. Biochem. Behav. 43: 749-757.

Head E, Pop V, Sarsoza F, Kayed R, Beckett TL, Studzinski CM, Tomic JL, Glabe CG, Murphy MP, 2010. Amyloid-beta peptide and oligomers in the brain and cerebrospinal fluid of aged canines. J. Alzheimers. Dis. 20: 637-646.

Hendrie HC, Osuntokun BO, Hall KS, Ogunniyi AO, Hui SL, Unverzagt FW, Gureje O, Rodenberg CA, Baiyewu O, Musick BS, 1995. Prevalence of Alzheimer's disease and dementia in two communities: Nigerian Africans and African Americans. Am. J. Psychiatry 152: 1485-1492.

Hirai T, Kojima S, Shimada A, Umemura T, Sakai M, Itakura C, 1996. Age-related changes in the olfactory system of dogs. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 22: 531-539.

Huppert F, Wilcock G, 1997. Ageing, cognition and dementia. Age Ageing 26 Suppl 4: 20-23.

Insua D, Corredoira A, Gonzalez-Martinez A, Suarez ML, Santamarina G, Sarasa M, Pesini P, 2012. Expression of p75(NTR), a marker for basal forebrain cholinergic neurons, in young and aged dogs with or without cognitive dysfunction syndrome. J. Alzheimers. Dis. 28: 291-296.

Insua D, Suarez ML, Santamarina G, Sarasa M, Pesini P, 2010. Dogs with canine counterpart of Alzheimer's disease lose noradrenergic neurons. Neurobiol. Aging 31: 625-635.

Irimajiri M, Miller MA, Green MA, Jaeger CB, Luescher AU, Hutchins GD, 2010. Cerebral metabolism in dogs assessed by (18)F-FDG PET: a pilot study to understand physiological changes in behavioral disorders in dogs. J. Vet. Med. Sci. 72: 1-6.

Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y, 1994. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). Neuron 13: 45-53.

Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, Petersen RC, Trojanowski JQ, 2010. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. Lancet Neurol. 9: 119-128.

Jack CR, Jr., Lowe VJ, Weigand SD, Wiste HJ, Senjem ML, Knopman DS, Shiung MM, Gunter JL, Boeve BF, Kemp BJ, Weiner M, Petersen RC, 2009. Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. Brain 132: 1355-1365.

Kanai M, Matsubara E, Isoe K, Urakami K, Nakashima K, Arai H, Sasaki H, Abe K, Iwatsubo T, Kosaka T, Watanabe M, Tomidokoro Y, Shizuka M, Mizushima K, Nakamura T, Igeta Y, Ikeda Y, Amari M, Kawarabayashi T, Ishiguro K, Harigaya Y, Wakabayashi K, Okamoto K, Hirai S, Shoji M, 1998. Longitudinal study of cerebrospinal fluid levels of tau, A beta1-40, and A beta1-42(43) in Alzheimer's disease: a study in Japan. Ann. Neurol. 44: 17-26.

Kiatipattanasakul W, Nakamura S, Hossain MM, Nakayama H, Uchino T, Shumiya S, Goto N, Doi K, 1996. Apoptosis in the aged dog brain. Acta Neuropathol. 92: 242-248.

Knopman DS, 1998. The initial recognition and diagnosis of dementia. Am. J. Med. 104: 2S-12S.

Lai CK, Arthur DG, 2003. Wandering behaviour in people with dementia. J. Adv. Nurs. 44: 173-182.

Landsberg G, 2005. Therapeutic agents for the treatment of cognitive dysfunction syndrome in senior dogs. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 29: 471-479.

Landsberg G, Araujo JA, 2005. Behavior problems in geriatric pets. Vet. Clin. North Am. Small Anim Pract. 35: 675-698.

Landsberg GM, Hunthausen WL, Ackerman LJ, 2003. Handbook of Behavior Problems of the Dog and Cat, Elesevier. Saunders.

Lopez OL, Kuller LH, Mehta PD, Becker JT, Gach HM, Sweet RA, Chang YF, Tracy R, DeKosky ST, 2008. Plasma amyloid levels and the risk of AD in normal subjects in the Cardiovascular Health Study. Neurology 70: 1664-1671.

Markus HS, Ring H, Kouris K, Costa DC, 1993. Alterations in regional cerebral blood flow, with increased temporal interhemispheric asymmetries, in the normal elderly: an HMPAO SPECT study. Nucl. Med. Commun. 14: 628-633.

Matsubara E, Frangione B, Ghiso J, 1995. Characterization of apolipoprotein J-Alzheimer's A beta interaction. J. Biol. Chem. 270: 7563-7567.

Matsubara E, Ghiso J, Frangione B, Amari M, Tomidokoro Y, Ikeda Y, Harigaya Y, Okamoto K, Shoji M, 1999. Lipoprotein-free amyloidogenic peptides in plasma are elevated in patients with sporadic Alzheimer's disease and Down's syndrome. Ann. Neurol. 45: 537-541.

Mayeux R, Honig LS, Tang MX, Manly J, Stern Y, Schupf N, Mehta PD, 2003. Plasma A[beta]40 and A[beta]42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. Neurology 61: 1185-1190.

Mehta PD, Pirttila T, Mehta SP, Sersen EA, Aisen PS, Wisniewski HM, 2000. Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1-40 and 1-42 in Alzheimer disease. Arch. Neurol. 57: 100-105.

Mendez MF, Martin RJ, Smyth KA, Whitehouse PJ, 1992. Disturbances of person identification in Alzheimer's disease. A retrospective study. J. Nerv. Ment. Dis. 180: 94-96.

Migheli A, Attanasio A, Pezzulo T, Gullotta F, Giordana MT, Schiffer D, 1992. Age-related ubiquitin deposits in dystrophic neurites: an immunoelectron microscopic study. Neuropathol. Appl. Neurobiol. 18: 3-11.

Milgram NW, Head E, Weiner E, Thomas E, 1994. Cognitive functions and aging in the dog: acquisition of nonspatial visual tasks. Behav. Neurosci. 108: 57-68.

Milgram NW, Ivy GO, Head E, Murphy MP, Wu PH, Ruehl WW, Yu PH, Durden DA, Davis BA, Paterson IA, 1993. The effect of L-deprenyl on behavior, cognitive function, and biogenic amines in the dog. Neurochem. Res. 18: 1211-1219.

Milgram NW, Adams B, Callahan H, Head E, Mackay B, Thirlwell C, Cotman CW, 1999. Landmark discrimination learning in the dog. Learning & Memory 6: 54-61.

Montiglio PO, Garant D, Thomas D, Réale D, 2010. Individual variation in temporal activity patterns in open-field tests. Animal Behaviour 80: 905-912.

Neilson JC, Hart BL, Cliff KD, Ruehl WW, 2001. Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218: 1787-1791.

Niwa K, Carlson GA, Iadecola C, 2000. Exogenous A beta1-40 reproduces cerebrovascular alterations resulting from amyloid precursor protein overexpression in mice. J. Cereb. Blood Flow Metab 20: 1659-1668.

Ohm TG, Busch C, Bohl J, 1997. Unbiased estimation of neuronal numbers in the human nucleus coeruleus during aging. Neurobiol. Aging 18: 393-399.

Osella MC, Re G, Odore R, Girardi C, Badino P, Barbero R, Bergamasco L, 2007. Canine cognitive dysfunction syndrome: Prevalence, clinical signs and treatment with a neuroprotective nutraceutical. J. Appl. Behav. Sci. 105: 297-310.

Pageat P, 2000. Patología del comportamiento del perro. Pulso, pp. 161-163.

Papaioannou N, Tooten PC, van Ederen AM, Bohl JR, Rofina J, Tsangaris T, Gruys E, 2001. Immunohistochemical investigation of the brain of aged dogs. I. Detection of neurofibrillary tangles and of 4-hydroxynonenal protein, an oxidative damage product, in senile plaques. Amyloid. 8: 11-21.

Peremans K, Audenaert K, Blanckaert P, Jacobs F, Coopman F, Verschooten F, Van BH, van HC, Mertens J, Slegers G, Dierckx R, 2002. Effects of aging on brain perfusion and serotonin-2A receptor binding in the normal canine brain measured with single photon emission tomography. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 26: 1393-1404.

Peremans K, Audenaert K, Hoybergs Y, Otte A, Goethals I, Gielen I, Blankaert P, Vervaet M, van HC, Dierckx R, 2005. The effect of citalopram hydrobromide on 5-HT2A receptors in the impulsive-aggressive dog, as measured with 123I-5-I-R91150 SPECT. Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 32: 708-716.

Pesini P, Boada M, Martínez-Lage P, Tárraga L, Monleón L, Pérez-Grijalva V, San-josé I, Porcel-Carbonel J, Gutiérrez-Blanco A, Sarasa M, 2009. Differences in beta amyloid

pool in blood discriminate between amnesic mild cognitive impairmente patients and healthy controls. J. Nutr. Health. Aging. 13: 850.

Pesini P, Pérez-Grijalva V, Monleón L, Boada M, Tárraga L, Martínez-Lage P, San-josé I, Sarasa M, 2012. Reliable Measurements of the Beta Amyloid Pool in Blood Could Help in the Early Diagnosis of AD. J. Alzheimers. Dis. 2012.

Petersen RC, Doody R, Kurz A, Mohs RC, Morris JC, Rabins PV, Ritchie K, Rossor M, Thal L, Winblad B, 2001. Current concepts in mild cognitive impairment. Arch. Neurol. 58: 1985-1992.

Petersen RC, Smith GE, Waring SC, Ivnik RJ, Kokmen E, Tangelos EG, 1997. Aging, memory, and mild cognitive impairment. Int. Psychogeriatr. 9 Suppl 1: 65-69.

Petit-Taboue MC, Landeau B, Desson JF, Desgranges B, Baron JC, 1998. Effects of healthy aging on the regional cerebral metabolic rate of glucose assessed with statistical parametric mapping. Neuroimage. 7: 176-184.

Pietropaolo S, Feldon J, Yee BK, 2008. Age-dependent phenotypic characteristics of a triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. Behav. Neurosci. 122: 733-747.

Pongracz P, Molnar C, Miklosi A, 2010. Barking in family dogs: an ethological approach. Vet. J. 183: 141-147.

Pugliese M, Geloso MC, Carrasco JL, Mascort J, Michetti F, Mahy N, 2006. Canine cognitive deficit correlates with diffuse plaque maturation and S100beta (-) astrocytosis but not with insulin cerebrospinal fluid level. Acta Neuropathol. 111: 519-528.

Pugliese M, Carrasco JL, Andrade C, Mas E, Mascort J, Mahy N, 2005. Severe cognitive impairment correlates with higher cerebrospinal fluid levels of lactate and pyruvate in a canine model of senile dementia. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 29: 603-610.

Rofina JE, van Ederen AM, Toussaint MJ, Secreve M, van der SA, van dM, I, Van Eerdenburg FJ, Gruys E, 2006. Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. Brain Res. 1069: 216-226.

Rosenberg RN, 2000. The molecular and genetic basis of AD: the end of the beginning: the 2000 Wartenberg lecture. Neurology 54: 2045-2054.

Rosenberg RN, Baskin F, Fosmire JA, Risser R, Adams P, Svetlik D, Honig LS, Cullum CM, Weiner MF, 1997. Altered amyloid protein processing in platelets of patients with Alzheimer disease. Arch. Neurol. 54: 139-144.

Ruehl W, Hart BL, 1998 Canine cognitive dysfunction. In: Dodman, N. H., Schuster, L. (Eds.), Psychopharmacology of animal behaviour disorders. Blackwell Science, Malden, pp. 283-304.

Ruehl WW, Bruyette DS, DePaoli A, Cotman CW, Head E, Milgram NW, Cummings BJ, 1995. Canine cognitive dysfunction as a model for human age-related cognitive decline, dementia and Alzheimer's disease: clinical presentation, cognitive testing, pathology and response to 1-deprenyl therapy. Prog. Brain Res. 106: 217-225.

Salvin HE, McGreevy PD, Sachdev PS, Valenzuela MJ, 2010. Under diagnosis of canine cognitive dysfunction: a cross-sectional survey of older companion dogs. Vet. J. 184: 277-281.

Salvin HE, McGreevy PD, Sachdev PS, Valenzuela MJ, 2011. The canine cognitive dysfunction rating scale (CCDR): a data-driven and ecologically relevant assessment tool. Vet. J. 188: 331-336.

Sarasa M, Pesini P, 2009. Natural non-trasgenic animal models for research in Alzheimer's disease. Curr. Alzheimer Res. 6: 171-178.

Schroder J, Kratz B, Pantel J, Minnemann E, Lehr U, Sauer H, 1998. Prevalence of mild cognitive impairment in an elderly community sample. J. Neural Transm. Suppl 54: 51-59.

Schupf N, Tang MX, Fukuyama H, Manly J, Andrews H, Mehta P, Ravetch J, Mayeux R, 2008. Peripheral Abeta subspecies as risk biomarkers of Alzheimer's disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 105: 14052-14057.

Schwarzman AL, Gregori L, Vitek MP, Lyubski S, Strittmatter WJ, Enghilde JJ, Bhasin R, Silverman J, Weisgraber KH, Coyle PK, 1994. Transthyretin sequesters amyloid beta protein and prevents amyloid formation. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 91: 8368-8372.

Selkoe DJ, 1994. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. Annu. Rev. Neurosci. 17: 489-517.

Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C, 1992. Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. Nature 359: 325-327.

Shaw LM, Vanderstichele H, Knapik-Czajka M, Clark CM, Aisen PS, Petersen RC, Blennow K, Soares H, Simon A, Lewczuk P, Dean R, Siemers E, Potter W, Lee VM, Trojanowski

JQ, 2009. Cerebrospinal fluid biomarker signature in Alzheimer's disease neuroimaging initiative subjects. Ann. Neurol. 65: 403-413.

Shimada A, Kuwamura M, Awakura T, Umemura T, Itakura C, 1992. An immunohistochemical and ultrastructural study on age-related astrocytic gliosis in the central nervous system of dogs. J. Vet. Med. Sci. 54: 29-36.

Siwak CT, Callahan H, Milgram NW, 2000. Adrafinil: effects on behavior and cognition in aged canines. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 24: 709-726.

Siwak CT, Murphey HL, Muggenburg BA, Milgram NW, 2002. Age-dependent decline in locomotor activity in dogs is environment specific. Physiol. Behav. 75: 65-70.

Siwak CT, Tapp PD, Head E, Zicker SC, Murphey HL, Muggenburg BA, Ikeda-Douglas CJ, Cotman CW, Milgram NW, 2005. Chronic antioxidant and mitochondrial cofactor administration improves discrimination learning in aged but not young dogs. Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry 29: 461-469.

Siwak CT, Tapp PD, Milgram NW, 2001. Effect of age and level of cognitive function on spontaneous and exploratory behaviors in the beagle dog. Learn. Mem. 8: 317-325.

Siwak CT, Tapp PD, Zicker SC, Murphey HL, Muggenburg BA, Head E, Cotman CW, Milgram NW, 2003. Locomotor activity rhythms in dogs vary with age and cognitive status. Behav. Neurosci. 117: 813-824.

Siwak-Tapp CT, Head E, Muggenburg BA, Milgram NW, Cotman CW, 2008. Region specific neuron loss in the aged canine hippocampus is reduced by enrichment. Neurobiol. Aging 29: 39-50.

Sobin SS, Bernick S, Ballard KW, 1992. Histochemical characterization of the aging microvasculature in the human and other mammalian and non-mammalian vertebrates by the periodic acid-Schiff reaction. Mech. Ageing Dev. 63: 183-192.

Sobow T, Kloszewska I, 2005. Short-term treatment with rivastigmine and plasma levels of Abeta peptides in Alzheimer's disease. Folia Neuropathol. 43: 340-344.

Sperling RA, Aisen PS, Beckett LA, Bennett DA, Craft S, Fagan AM, Iwatsubo T, Jack CR, Jr., Kaye J, Montine TJ, Park DC, Reiman EM, Rowe CC, Siemers E, Stern Y, Yaffe K, Carrillo MC, Thies B, Morrison-Bogorad M, Wagster MV, Phelps CH, 2011. Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. Alzheimers. Dement. 7: 280-292.

Su MY, Head E, Brooks WM, Wang Z, Muggenburg BA, Adam GE, Sutherland R, Cotman CW, Nalcioglu O, 1998. Magnetic resonance imaging of anatomic and vascular characteristics in a canine model of human aging. Neurobiol. Aging 19: 479-485.

Tapp PD, Siwak CT, 2006 The canine model of human brain aging: cognition, behavior, and neuropathology. In: Conn, P. M. (Ed.), Handbook of Models for Human Aging. Elsevier, Burlington, pp. 415-434.

Tapp PD, Siwak CT, Estrada J, Holowachuk D, Milgram NW, 2003. Effects of age on measures of complex working memory span in the beagle dog (Canis familiaris) using two versions of a spatial list learning paradigm. Learn. Mem. 10: 148-160.

Tapp PD, Siwak CT, Gao FQ, Chiou JY, Black SE, Head E, Muggenburg BA, Cotman CW, Milgram NW, Su MY, 2004. Frontal lobe volume, function, and beta-amyloid pathology in a canine model of aging. J. Neurosci. 24: 8205-8213.

Thomas T, Thomas G, McLendon C, Sutton T, Mullan M, 1996. beta-Amyloid-mediated vasoactivity and vascular endothelial damage. Nature 380: 168-171.

Thrall DE, 2003. Manual de diagnóstico radiológico veterinario. Elsevier.

Topal J, Miklosi A, Csanyi V, Doka A, 1998. Attachment behavior in dogs (Canis familiaris): a new application of Ainsworth's (1969) Strange Situation Test. J. Comp Psychol. 112: 219-229.

Uchida K, Miyauchi Y, Nakayama H, Goto N, 1990. Amyloid angiopathy with cerebral hemorrhage and senile plaque in aged dogs. Nihon Juigaku. Zasshi 52: 605-611.

van Halteren-van Tilborg IA, Scherder EJ, Hulstijn W, 2007. Motor-skill learning in Alzheimer's disease: a review with an eye to the clinical practice. Neuropsychol. Rev. 17: 203-212.

van OM, Hofman A, Soares HD, Koudstaal PJ, Breteler MM, 2006. Plasma Abeta(1-40) and Abeta(1-42) and the risk of dementia: a prospective case-cohort study. Lancet Neurol. 5: 655-660.

Vermeire S, Audenaert K, Vandermeulen E, Waelbers T, De SB, Van BH, Peremans K, 2011. Single photon emission computed tomography (SPECT) imaging of the dopamine transporter in healthy dogs. Vet. J. 188: 356-358.

Volkow ND, Brodie J, Bendriem B, 1991. Positron emission tomography: basic principles and applications in psychiatric research. Ann. N. Y. Acad. Sci. 620: 128-144.

Vos SJ, Xiong C, Visser PJ, Jasielec MS, Hassenstab J, Grant EA, Cairns NJ, Morris JC, Holtzman DM, Fagan AM, 2013. Preclinical Alzheimer's disease and its outcome: a longitudinal cohort study. Lancet Neurol. 12: 957-965.

West MJ, Gundersen HJ, 1990. Unbiased stereological estimation of the number of neurons in the human hippocampus. J. Comp Neurol. 296: 1-22.

White L, Petrovitch H, Ross GW, Masaki KH, Abbott RD, Teng EL, Rodriguez BL, Blanchette PL, Havlik RJ, Wergowske G, Chiu D, Foley DJ, Murdaugh C, Curb JD, 1996. Prevalence of dementia in older Japanese-American men in Hawaii: The Honolulu-Asia Aging Study. J.A.M.A. 276: 955-960.

Wisniewski H, Johnson AB, Raine CS, Kay WJ, Terry RD, 1970. Senile plaques and cerebral amyloidosis in aged dogs. A histochemical and ultrastructural study. Lab Invest 23: 287-296.

Wisniewski H, Weigiel J, Morys J, Bancher C, Soltysiak Z, Kim K, 1990 Aged dogs: An animal model to study beta-protein amyloidogenesis. In: Maurier, K., Rieder, P., Beckmann, H. (Eds.), Alzheimer's disease, epidemiology, neuropathology, neurochemistry, and clinics. Springer Verlag., pp. 151-168.

Xia W, Yang T, Shankar G, Smith IM, Shen Y, Walsh DM, Selkoe DJ, 2009. A specific enzyme-linked immunosorbent assay for measuring beta-amyloid protein oligomers in human plasma and brain tissue of patients with Alzheimer disease. Arch. Neurol. 66: 190-199.

Yalcin E, Kasap S, Demir G, 2010. Prevalence of Behavioral Changes Associated with Aged-Related Cognitive Impairment in Geriatric Dogs, Bursa, Turkey. J. Anim. Vet. Adv. 9: 1828-1832.

Yamaji S, Ishii K, Sasaki M, Mori T, Kitagaki H, Sakamoto S, Mori E, 2000. Evaluation of standardized uptake value to assess cerebral glucose metabolism. Clin. Nucl. Med. 25: 11-16.

Yang DS, Smith JD, Zhou Z, Gandy SE, Martins RN, 1997. Characterization of the binding of amyloid-beta peptide to cell culture-derived native apolipoprotein E2, E3, and E4 isoforms and to isoforms from human plasma. J. Neurochem. 68: 721-725.

Yin S, McCowan B, 2004. Barking in domestic dogs: context specificity and individual identification. Animal Behaviour 68: 343-355.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Publicaciones

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

1

Plasma β-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

Experimental Gerontology 46 (2011) 590–596

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Gerontology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/expgero

Plasma β-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease

Ángela González-Martínez [a,1], Belén Rosado [b,1], Pedro Pesini [c,*], María-Luisa Suárez [a], Germán Santamarina [a], Sylvia García–Belenguer [b], Ainara Villegas [b], Inmaculada Monleón [c], Manuel Sarasa [c]

[a] Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain
[b] Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain
[c] Araclon Biotech Ltd, 50004 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 16 December 2010
Received in revised form 22 February 2011
Accepted 22 February 2011
Available online 3 March 2011

Section Editor: Christian Humpel

Keywords:
Amyloid-beta protein
Plasma
Alzheimer's disease
Animal behavior
Canine
ELISA
Neurodegeneration
Brain aging

ABSTRACT

Aging dogs naturally demonstrate cognitive impairment and neuropathology that model early Alzheimer's disease (AD). In particular, there is evidence that canine cognitive dysfunction syndrome (CDS) in aged dogs is accompanied by cortical deposition of Aβ peptides and neurodegeneration. Plasma Aβ levels have been examined in humans as putative biomarkers for AD, but to date, no similar studies have been conducted for canine dementia. The aim of the present study was to assess plasma Aβ1-42 and Aβ1-40 levels in a blind study using pet dogs that were either successfully aging or exhibiting CDS. The severity of cognitive impairment was assessed using an owner-based questionnaire. On average, young dogs presented significantly higher plasma levels of Aβ1-42 and Aβ1-40 than aged, cognitively unimpaired dogs. Notably, among aged dogs, the levels of Aβ1-42 and the Aβ42/40 ratio were significantly higher in those showing mild cognitive impairment than in either cognitively unimpaired or severely affected dogs. These results suggest that increased plasma Aβ1-42 levels and Aβ42/40 ratio could be a biomarker for canine cognitive dysfunction, which is considered an excellent natural model of early AD.

© 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Dogs may naturally suffer age-related cognitive deficits that parallel several key aspects of early Alzheimer's disease (AD). There is evidence of β-amyloid (Aβ) deposits and amyloid angiopathy in the brain of aged dogs (Borras et al., 1999; Uchida et al., 1992). Furthermore, the extent of Aβ deposition in the cerebral cortex has been shown to correlate with declines in select measures of cognitive function in aged beagle dogs and in aged pet dogs (Colle et al., 2000; Rofina et al., 2006). Other neuropathological features of AD, such as neurodegeneration and oxidative damage, have also been reported in aged dogs (Rofina et al., 2006; Bernedo et al., 2009; Head and Torp, 2002; Head et al., 2002; Insua et al., 2010; Pugliese et al., 2006; Siwak-Tapp et al., 2008; Skoumalova et al., 2003; Su et al., 1998; Tapp et al., 2004). Furthermore, from the molecular perspective, it has been found extensive homology for the canine Aβ (100% similarity), its precursor protein (APP, 98%), and the enzymes for APP processing (92–100%) with their human counterparts (Johnstone et al., 1991; Sarasa et al., 2008). Altogether, these data suggest of dog as an appropriate natural model for studying the biology of AD (Sarasa and Pesini, 2009).

Research on the canine model of AD has been extensively conducted using laboratory beagle dogs rather than pet/companion dogs. However, the latter population may offer additional contributions to the investigation of AD because these dogs share a common environment with humans and, therefore, encounter similar environmental stressors during the aging process (Cotman and Head, 2008). Cognitive dysfunction syndrome (CDS) in elderly pet dogs is characterized by behavioral and cognitive deficits that fall into four main categories: sleep-wake cycle, social interaction, housetraining, and orientation (Heath, 2002; Ruehl and Hart, 1998). Owner-based questionnaires show that CDS may affect more than 22% of geriatric dogs, and prevalence and severity increase strikingly with age (Azkona et al., 2009; Neilson et al., 2001). These data highlight the relevance of this canine syndrome, not only for research purposes as a model for AD but also plainly from a veterinary clinical point of view.

Increasingly, it appears that early diagnosis of AD, even at pre-symptomatic stages, is essential for effective therapeutic intervention. Therefore, there is an urgent need for reliable biomarkers that can detect the onset of brain amyloid pathology before irreversible neurodegeneration has taken place. Plasma Aβ1-42 and Aβ1-40

* Corresponding author at: Araclon Biotech Ltd., Franz Schubert 2, 3ª planta, (Clínica Montecanal), 50012 Zaragoza, Spain. Tel.: +34 876 241 666; fax: +34 976 020 011.
E-mail address: pedropesini@araclon.com (P. Pesini).
[1] The first two authors contributed equally to this work.

0531-5565/$ – see front matter © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.exger.2011.02.013

peptides have been proposed as non-invasive peripheral biomarkers to distinguish between cognitively healthy people and patients with mild cognitive impairment (MCI) with a high degree of sensitivity and specificity (Assini et al., 2004; Blasko et al., 2008; Cosentino et al., 2010; Lopez et al., 2008; Mayeux et al., 2003; Mehta et al., 2000; Schupf et al., 2008; Sobow et al., 2005; van Oijen et al., 2006; Xia et al., 2009). However, considerable controversy remains in the field, and it is still too early to clearly establish the role of Aβ blood tests as a diagnostic tool for MCI and AD (Blennow et al., 2010; Freeman et al., 2007; Graff-Radford et al., 2007; Hansson et al., 2010; Lambert et al., 2009; Lewczuk et al., 2010; Oh et al., 2008; Sundelof et al., 2008). To date, no similar studies have been performed in pet dogs.

The aim of the present study was to assess the plasma levels of Aβ1-40 and Aβ1-42 in pet dogs with and without CDS. To this end, four groups of privately owned dogs were considered: young, middle-aged, cognitively unimpaired aged, and cognitively impaired aged animals. Taking into account our preliminary results in human patients, we hypothesized that plasma Aβ-peptides levels would differ among the different groups of animals and would relate to the presentation of cognitive dysfunction in the aged groups (Pesini et al., 2009).

2. Materials and methods

2.1. Study population

Two veterinary teaching hospitals (Universidad de Santiago de Compostela and Universidad de Zaragoza, Spain) contributed to the collection of cases. Dogs were recruited from animals in these hospitals' populations that were not referred for behavioral consultations at the time of admission; they were all small to medium-sized dogs usually living with their owners (i.e., pets). There were no selection criteria regarding neuter status, but the groups were sex-balanced (Table 1).

In total, 88 animals were enrolled in the study. The subjects were sorted into four groups: i) young (YG, 1–4 years of age, n = 9), ii) middle aged (MA, 5–8 years of age, n = 10), iii) cognitively unimpaired aged (CU, ≥9 years of age, n = 31), and iv) cognitively impaired aged (CI, ≥9 years of age, n = 38). The animals were treated according to the European and Spanish legislations on animal handling (86/609/EU, Real Decreto 1201/2005) and the experiments and procedures were approved by the Ethical Committees of the University of Santiago and Zaragoza.

2.2. Medical assessment

Prior to inclusion in the study for Aβ peptides analysis, all dogs were screened by routine physical and neurological examination, complete blood count, serum biochemistry and thyroid hormone measurement, and urinalysis when needed. Animals with primary organ system failure (other than brain degeneration), hypothyroidism, untreated Cushing's syndrome and seriously affected mobility were excluded from the study. Animals with severe loss of visual capacity were also excluded.

2.3. Cognitive assessment

Classification of cognitive status was carried out using an owner-based observational questionnaire (see Table 2). The design of the questionnaire was based on previously published models (Colle et al., 2000; Heath, 2002; Ruehl and Hart, 1998; Azkona et al., 2009) and included a number of behavioral and cognitive items grouped into four categories: (a) sleep-wake cycle, (b) socio-environmental interaction, (c) housetraining and commands, and (d) disorientation. The questionnaires were administered to the owners by two doctors in veterinary medicine (DVM) who specialize in behavior (AG-M and BR). The owners of the aged dogs were asked to compare the dog's present behavior to its behavior prior to 9 years of age, when the dog was a younger adult. After matching the affected items (Yes or No answer), the owner was asked to grade the severity of the impairment for each category using a five-point scale (0 = non-impaired; 4 = severely impaired).

A dog was considered to be impaired in a category if at least one item was affected and that category scored ≥1 point. A dog was considered cognitively impaired when two or more categories were impaired and the total dysfunction score (TDS, the sum of scores attributed by the owner to each of the four categories) was ≥2 points. A score of 2 to 5 points was described as mild cognitive impairment (mCI) and ≥6 points as severe cognitive impairment (sCI). Simultaneously, using the information obtained during the screening, the researchers filled out the canine dementia questionnaire published by Rofina et al. (Rofina et al., 2006) for every animal. The dementia score obtained from that questionnaire is referred to hereafter as the Rofina dysfunction score (RDS).

2.4. Blood sampling and Aβ peptide analysis

Blood samples (5 ml) were collected from the jugular vein into polypropylene vials containing EDTA and a protease inhibitor cocktail (CompleteMini, Roche); they were centrifuged (2500 × *g*, 4 °C, 15 min), aliquoted and coded without any reference to the age or cognitive state of the animals. The aliquots of plasma were immediately frozen at −80 °C and sent to the Araclon laboratory. Aβ1-42 and Aβ1-40 were measured in plasma using two specific ELISA sandwich kits (ABtest 40 and ABtest 42; Araclon Biotech Ltd., Zaragoza, Spain). Each sandwich kit is composed of an N-terminal Aβ-binding capture antibody and a C-terminal Aβ1-40 or Aβ1-42 binding detection antibodies, respectively. The samples and peptide standards were always assayed in triplicate. To test the reproducibility of the analysis, the ELISA was repeated on two different days. Average coefficients of variation (CV) between the two assays were 7.84% for Aβ1-42 and 13.07% for Aβ1-40. Furthermore, comparing the series of

Table 1
Demographic data in the studied canine population.

Group		Males (%)	Females (%)	Neutered	Age (months)	Weight (Kg)	Body condition (1–5)[†]
				Mean ± SD	Mean ± SD	Mean ± SD	
YG	(n = 9)	55.6	44.4	33.3	31.1 ± 17.7	11.8 ± 5.7	3.2 ± 0.4
MA	(n = 10)	30.0	70.0	40.0	83.2 ± 16.7	12.8 ± 10.6	3.2 ± 0.4
CU	(n = 31)	48.4	51.6	41.9	146.4 ± 35.2	12.2 ± 7.7	3.5 ± 0.8
CI	(n = 38)	60.5	39.5	42.1	152.6 ± 25.1	14.8 ± 9.2	3.5 ± 0.6
		$p = 0.35$[a]		$p = 0.97$[a]	$p = 0.15$[b]	$p = 0.59$[c]	$p = 0.42$[a]

YG: young; MA: middle aged; CU: cognitively unimpaired aged; CI: cognitively impaired aged.
[†] Body condition scale: 1(too thin) – 2(thin) – 3(ideal) – 4(heavy) – 5(too heavy).
[a] Chi-square test.
[b] Mann–Whitney U test between CU and CI groups.
[c] Kruskal–Wallis test.

Table 2
Frequency distribution (percentage) of impaired categories and items in each group.

Category	Items	YG (n = 9)	MA (n = 10)	CU (n = 31)	CI (n = 38)	$p^{\dagger}$
Sleep-wake cycle		0	0	25.8	81.6	***
	Walking/Pacing at night	0	0	0	42.1	***
	Vocalizing (barking/whining) at night	0	0	3.2	15.8	NS
	Sleeping less at night	0	0	0	31.6	**
	Sleeping noticeably more during the day	0	0	48.4	81.6	**
	Switching between insomnia and hypersomnia	0	0	0	23.7	**
Socio-environmental interactions		0	0	9.7	97.4	***
	Decrease in greeting owners	0	0	0	50	***
	Decrease in soliciting attention from the owners	0	0	6.5	34.2	**
	Increase in following the owners around the house	0	10	19.4	47.4	*
	Decrease in playing with the owners	0	0	25.8	73.7	***
	Decrease in playing with other dogs	0	10	12.9	60.5	***
	Changes in personality (irritability, new fears, lack of interest on stimuli)	0	0	9.7	68.4	***
House-training and commands		0	0	0	63.2	***
	Starting urinate/defecate in the house	0	0	0	42.1	***
	Decrease in signaling to go out for eliminating	0	0	0	23.7	**
	Decrease in urine marking (non-castrated males)	0	0	0	28.9	**
	Decrease in responding to prior learned commands	0	0	3.2	36.8	**
Disorientation		0	0	6.5	68.4	***
	Staring into space (star gazing) or getting stuck	0	0	9.7	57.9	***
	Getting lost in the house or during routine walks	0	0	0	42.1	***
	Wandering (aimless walking) in the house	0	0	0	39.5	***
	Trying to pass through narrow places	0	0	0	23.7	**
	Standing at the wrong side of the door to go out	0	0	0	23.7	**
	Difficulty in navigating around or over obstacles	0	0	0	31.6	**
	Decrease in recognizing familiar people	0	0	0	7.9	NS

YG: Young; MA: Middle aged; CU: Cognitively unimpaired aged; CI: Cognitively impaired aged; NS: Non-significant difference.
† p values corresponding to statistical differences between groups 3 and 4.
* $p<0.05$.
** $p<0.01$.
*** $p<0.001$.

measurements using the Wilcoxon test indicated that the measurements of Aβ1-42 levels, Aβ1-40 levels, and the Aβ42/40 ratio did not differ significantly between the two assays ($p=0.472$, $p=0.162$, and $p=0.277$, respectively). Therefore, the averaged data from the two assays was used for further statistical analysis.

An additional 3-ml blood sample from each animal was collected for cell count and serum clinical biochemistry.

2.5. Statistical analysis

The plasma concentration of Aβ1-42, Aβ1-40 and the Aβ-42/40 ratio were defined as dependent variables whose group mean values were compared using Mann–Whitney U tests. Correlations were analyzed using Spearman's rank correlation tests. Chi-square tests were used to compare the distribution of categorical demographic or cognitive variables among groups. The differences in serum biochemical parameters were assessed either by ANOVA or Kruskal–Wallis test, if the parameter distribution was parametric or non-parametric, respectively. Receiver operating characteristic (ROC) curves were used to assess the accuracy of the dependent variables in classifying the presence *versus* absence of cognitive impairment. Calculations were carried out using the statistical program SPSS 15.0 for Windows (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA), and $p\leq0.05$ denoted statistical significance.

3. Results

3.1. Demographic data

Demographic information for each group is shown in Table 1. Non-significant differences were found for sex, reproductive status, and weight or body condition among groups. Moreover, the CU and CI groups did not differ significantly in age. The CU group showed significantly higher serum albumin concentrations than the CI group (4.12 g/dl ± 0.52 vs 3.74 g/dl ± 0.56, respectively; $p=0.01$). This difference was considered clinically irrelevant, and there were no other biochemical or hematological differences between the aged groups (data not shown).

3.2. Clinical diagnosis of canine CDS

Table 2 shows the frequency distribution of impaired behavioral categories and items in each group. The proportion of dogs with affected items in the CI group was significantly higher than in the CU group for all items except for "vocalizing at night" and "decrease in recognizing familiar people". Obviously, the CI group showed significantly higher TDS than the CU group (6.08 ± 3.26 vs 0.35 ± 0.48, respectively; $p<0.001$) and the same occurred for the RDS (9.79 ± 6.70 vs 1.23 ± 1.91, respectively; $p<0.001$). Furthermore, TDS was strongly correlated with the number of affected items ($r=0.91$, $p<0.001$) and RDS ($r=0.89$, $p<0.001$) in the aged groups (CU and CI).

3.3. Plasma Aβ1-40 and Aβ1-42

The mean Aβ peptide concentrations and Aβ42/40 ratio values for each group are shown in Table 3. The levels of Aβ1-42 and Aβ1-40 were

Table 3
Amyloid β-peptides concentrations (pg/μl) and Aβ42/40 ratios in each group of study.

Group	Aβ40	Aβ42	Aβ42/40
	Mean ± SD		
YG	$88.7 \pm 35.3^{ma,cu}$	59.2 ± 58.6^{CU}	0.59 ± 0.38^{cu}
MA	61.5 ± 19.4	31.4 ± 32.5	0.44 ± 0.29
CU	64.7 ± 24.1	23.3 ± 12.0	0.35 ± 0.20
CI	79.1 ± 33.0	46.1 ± 53.7^{cu}	0.52 ± 0.35^{cu}

YG: young; MA: middle aged; CU: cognitively unimpaired aged; CI: cognitively impaired aged. Different letters indicate significant differences between groups (capital letters: $p<0.001$; lower case letters: $p<0.05$).

correlated with each other across the study groups ($r = 0.68$; $p < 0.001$), but they did not correlate with any hematological or serum biochemical parameters (data not shown). The plasma concentration of Aβ peptides, particularly Aβ1-42, varied considerably between dogs, even within a given group, as denoted by the high standard deviations (SD).

The highest Aβ1-42, Aβ1-40 peptide concentrations and Aβ42/40 ratio were found in the youngest group (YG). Thus, the YG and CU groups differed significantly for both Aβ-peptides and Aβ42/40 ratio. The concentrations of Aβ1-42 and the Aβ42/40 ratio in the MA group were between those in the YG and CU, but the differences did not reach statistical significance (Fig. 1A).

Within the aged animals, it was found that Aβ plasma levels differed with cognitive status. Thus, the CI group showed significantly higher Aβ1-42 levels and Aβ42/40 ratio, but not Aβ1-40 levels, than the CU group (Table 3). Nevertheless, because of the wide dispersion of the measurements, individual values for these two parameters showed considerable overlap between the two groups. This overlap compromised the capability of the tests to discriminate between CU and CI animals, with an area under the ROC curve (AUC) < 0.67 for the three parameters, and only statistically significant for Aβ1-42 ($p = 0.02$). Furthermore, measurements of Aβ1-42 levels, Aβ1-40 levels or Aβ42/40 did not correlate with the any dementia score in the aged groups (data not shown). However, when we split the CI group,

Table 4
Amyloid β-peptides concentrations (pg/μl) and Aβ42/40 ratios in the aged groups.

Cognitive status	Aβ40	Aβ42	Aβ42/40
	Mean ± SD		
CU	64.7 ± 24.1	23.3 ± 12.0^{M}	0.35 ± 0.20^{M}
mCI	82.1 ± 38.8	58.3 ± 65.5	0.65 ± 0.37
sCI	75.3 ± 24.7	31.1 ± 29.5^{m}	0.37 ± 0.26^{M}

CU: cognitively unimpaired; mCI: mild cognitive impairment; sCI: severe cognitive impairment. Letter m/M indicates significant differences with regard to the mCI group (capital letters: $p < 0.01$; lower case letters: $p < 0.05$).

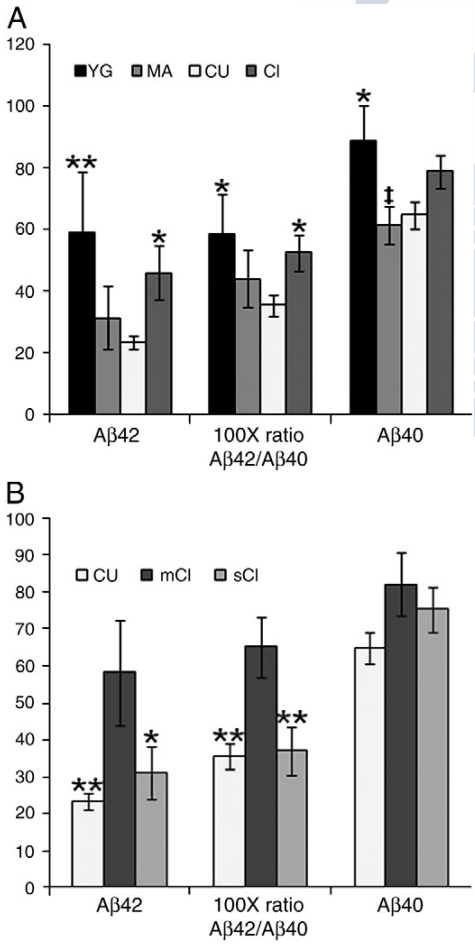


Fig. 1. Bar graphs for plasma Aβ1-42 and Aβ1-40 concentrations (in pg/ml) and for the Aβ42/40 ratio (multiplied by 100 for clarity of the graph). In A, the four groups are represented. In B, the CI group was split into mCI (n = 21) and sCI (n = 17), and the same three parameters were compared with the CU group. Asterisks in A represent significance compared to the CU group and in B represent significance compared to the mCI group. *, ** or *** means $p < 0.05$, 0.01 or 0.001, respectively. ‡ (in A) means $p < 0.05$ compared to YG.

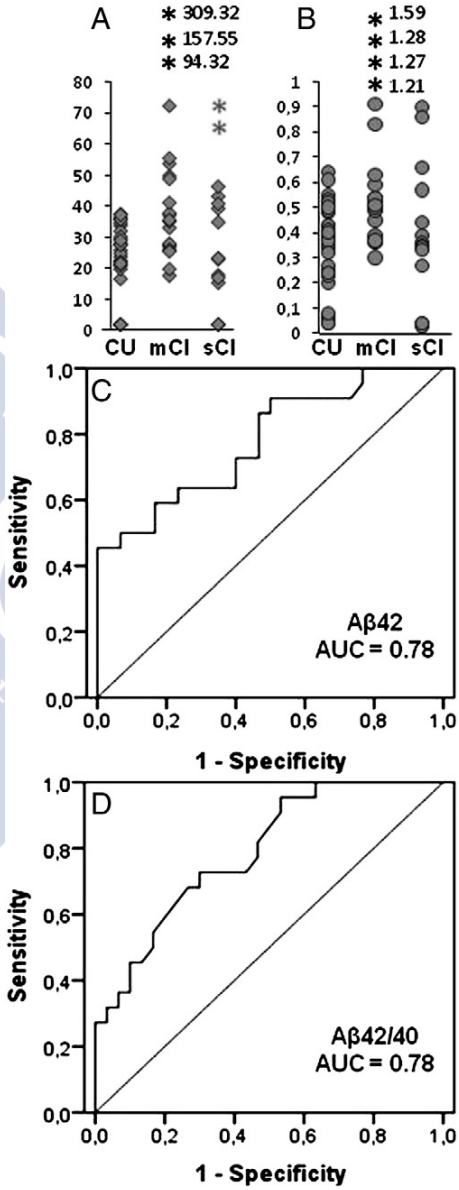


Fig. 2. A dot-plot for Aβ1-42 levels in pg/ml (A) and the Aβ42/40 ratio (B) in CU, mCI and sCI dogs. Numbers beside * indicate the value for outliers, which are not represented at the same scale of the ordinate axis for clarity of the graph. A considerable overlap was seen for these two parameters between CU and CI dogs. However, plasma concentrations of Aβ1-42 and the Aβ42/40 ratio, as shown by their ROC curves in C and D, respectively, allow for discrimination between CU and mCI dogs with sensitivity and specificity similar to those considered suitable for most diagnostic tests (AUC ≥ 0.85).

the severely impaired animals (sCI, n = 17) showed a significantly lower Aβ1-42 level and Aβ42/40 ratios than the mildly impaired animals (mCI, n = 21, Table 4). Moreover, the average Aβ1-42 levels and Aβ42/40 ratio were 2.5 times and 1.8 times greater, respectively, in the mCI than in the aged unimpaired CU group ($p<0.01$) (Table 4, Fig. 1B). In concordance with these results, the ability of the Aβ1-42 level and the Aβ42/40 ratio, but not the Aβ1-40 level, to discriminate between CU and mCI animals (instead of between CU and CI groups) substantially improved (AUC = 0.78; $p<0.001$) (Fig. 2A–C). Notably, when CU and mCI animals were plotted together (without the sCI), both the Aβ1-42 level and the Aβ42/40 ratio showed a weak but significant correlation with TDS ($r = 0.44$ and 0.47, respectively; $p \leq 0.001$), total number of positive items ($r = 0.42$ and 0.53, respectively; $p \leq 0.002$) and RDS ($r = 0.37$ and 0.41, respectively; $p \leq 0.007$).

4. Discussion

4.1. Plasma Aβ1-40 and Aβ1-42 in relation to age and cognitive dysfunction

In the present study, classification of cognitive status was carried out using an owner-based questionnaire after ruling out other medical causes of dementia-like changes. This questionnaire included four behavioral categories that were graded in severity by the owner according to a five-point scale to obtain a total cognitive dysfunction score (TDS). Owner-based questionnaires, including psychometric scales, have already been used for measuring and phenotyping behavior in dogs (Colle et al., 2000; Heath, 2002; Ruehl and Hart, 1998; Azkona et al., 2009). The most affected categories in our geriatric animals were "sleep/wake cycle" and "socio-environmental interactions," but cognitively impaired dogs were significantly more frequently affected in all categories and in the vast majority of items than the healthy aged group. The number of affected items was strongly related to the above-mentioned TDS, suggesting that the severity assessment carried out by the owner is greatly dependent on the number of contexts in which the dog shows impairment.

The two groups of aged animals were highly homogeneous regarding age, sex and reproductive status distributions, weight or body condition. Furthermore, there were not any significant hematological or biochemical differences between these two aged groups except for serum albumin that appeared slightly increased in the CU with respect to the CI group. It has been reported that mild decreases of serum albumin is related to an increased risk of mortality, disability, sarcopenia and frailty in people over 65 years (Bourdel-Marchasson et al., 2010). However, this type of information is scarce in veterinary practice. Recently it has been reported an increasing mortality risk in dogs as albumin decreased from 40 to 15 g/L (i.e., a very substantial decrease) (Hayes et al., 2010). However, it is important to note that this study was carried out in hospitalized dogs, not in the normal population. The subtle serum albumin difference between our two aged groups (4.12 g/dl ± 0.52 in CU vs 3.74 g/dl ± 0.56 in the CI) was considered clinically irrelevant.

The primary objective of the present study was to analyze plasma levels of Aβ1-42 and Aβ1-40 peptides in relation to age and cognitive dysfunction in pet dogs. The concentrations of these two Aβ isoforms were correlated, and Aβ1-40 levels were higher than Aβ1-42 levels in all the study groups. Both these features agreed with the results reported in the majority of similar studies conducted in humans (Lopez et al., 2008; Mayeux et al., 2003; Schupf et al., 2008; van Oijen et al., 2006; Selkoe, 2001).

We found that plasma Aβ peptides levels tended to decrease with age in cognitively intact dogs (i.e., in young, middle-aged and cognitively unimpaired aged groups). In particular, dogs less than 4 years old showed significantly higher Aβ1-42 and Aβ1-40 levels, as well as higher Aβ42/40 ratio values, than those more than 9 years old. A recent study carried out in healthy beagles (4–16 years old) showed that Aβ1-42, but not Aβ1-40, levels decrease slightly in cerebrospinal fluid (CSF) as brain amyloid deposition increases with age (Head et al., 2010). Our results suggest that the observed reduction of plasma Aβ1-42 and Aβ1-40 concentrations in cognitively unimpaired aged dogs might also be a consequence of increasing brain amyloid deposition, although a decreased production of mentioned peptides could not be excluded. In contrast, higher Aβ1-42 plasma levels and Aβ42/40 ratio were detected in dogs suffering from CDS when compared with cognitively unimpaired dogs. Thus, it appeared that the onset of the clinical condition was accompanied by an increase in Aβ1-42 production that might reverse the decrease in Aβ peptides levels observed in successful aging. These results are consistent with numerous studies on AD that have reported a relationship between elevated plasma Aβ peptide levels and the disease in humans (Assini et al., 2004; Blasko et al., 2008; Cosentino et al., 2010; Lopez et al., 2008; Mayeux et al., 2003; Mehta et al., 2000; Schupf et al., 2008; Sobow et al., 2005; van Oijen et al., 2006; Xia et al., 2009). From those studies, it is becoming increasingly clear that the elevation in Aβ blood levels is an early event that could precede the onset of cognitive symptoms and increase the risk of developing AD (DeMeyer et al., 2010; Jack et al., 2009; Fagan et al., 2007; Frisoni et al., 2010; Jack et al., 2010). Notably, when we separated dogs with a CDS diagnosis into two subgroups according to the severity of the syndrome (i.e., mCI and sCI), new differences emerged. Thus, the mCI animals showed significantly higher Aβ1-42 levels and Aβ42/40 ratio values than the sCI dogs and the CU dogs; no significant differences appeared between these latter groups. In contrast, plasma Aβ1-40 levels did not change according to diagnosis or severity of CDS. Again, these results were similar to studies reporting that a faster cognitive decline and/or progression of AD were accompanied by decreases in plasma Aβ1-42 (Assini et al., 2004; Cosentino et al., 2010; Mayeux et al., 2003; Schupf et al., 2008; Sobow et al., 2005; Xia et al., 2009). In a pilot study including 40 participants, we recently found that human plasma Aβ1-42 and Aβ1-40 concentrations were significantly higher in MCI patients than in non-demented controls. Furthermore, in that study, we observed that, although the different markers of the Aβ pool in blood did not vary significantly between MCI and AD groups, they tended to decrease in the AD patients with the lower MMSE (Pesini et al., 2009). The amyloid hypothesis states that AD pathology starts when Aβ peptides, particularly Aβ1-42, begin to aggregate and precipitate in the interstitial spaces of the brain. In this situation, diffusion of brain Aβ toward the ventricular system will be severely hampered, leading to a reduction in Aβ1-42 levels in the CSF that has been shown to herald cognitive decline (Blennow et al., 2010; DeMeyer et al., 2010; Fagan and Holtzman, 2010; Shaw et al., 2009). At the initial stage of the disease, probably without extensive capillary damage, the increased Aβ blood levels observed in humans and, in this study, in mCI dogs might reflect the increasing peptide levels in brain tissue. The subsequent drop of plasma Aβ1-42 observed in both canines and humans as the disease progresses could be related to the deposition of Aβ around capillaries, which would seal off the blood–brain barrier. Thus, the results of the present work revealed a similar pattern of plasma Aβ changes in dogs and humans during the progression of cognitive impairment. This parallelism reinforces the similarities between canine CDS and AD and suggests that those dogs suffering mild cognitive impairment could model human MCI, whereas those displaying severe impairment could model early or mild sporadic AD. A longitudinal study (already in progress), rather than a cross-sectional approach, will help better explore these disease-related changes in plasma Aβ peptides in dogs.

Some limitations still remain regarding classification of the cognitive status in aged dogs. Notably, the available tools and criteria for diagnosis of age-associated cognitive impairment, mild cognitive impairment and dementia in canines (or other animals) are not as developed as in humans. In addition, it is possible that a CDS diagnosis in dogs could include dementias other than AD-like dementia (e.g.,

vascular dementia). We found that our owner-based TDS was strongly correlated with the RDS obtained with the test of Rofina et al. (Rofina et al., 2006). In RDS, the severity of cognitive impairment was not assessed by the owner, as it is in our questionnaire, but a pre-established score was arbitrarily assigned to each item. These authors showed a correlation between their dementia score and several brain lesions, including amyloid. In contrast, we did not find a correlation between plasma Aβ peptide levels and any cognitive score in our aged dogs (CU and CI groups). However, if we considered only the CU and mCI animals, plasma Aβ1-42 concentrations and the Aβ42/40 ratio significantly correlated with TDS, RDS and the total number of affected items. These results are congruent with the idea that changes in Aβ blood levels could be an early marker for the onset of brain amyloid pathology and cognitive impairment. At more advanced stages, probably after development of extensive cerebral amyloid angiopathy, plasma peptide levels would not correlate with ongoing brain pathology and cognitive dysfunction (Jack et al., 2009; Frisoni et al., 2010; Jack et al., 2010). Furthermore, in spite of the uncertainties of the veterinary clinical criterion standard, the AUC obtained for plasma Aβ1-42 levels and the Aβ42/40 ratio would allow for discrimination between mCI and CU dogs with a sensitivity and specificity close to, although still lower than, that considered suitable for most AD biomarkers. In our opinion, this is of the greatest interest because, from any practical point of view, it is at these early stages of AD when the diagnoses should be improved, and the canine model would be particularly useful in this context.

4.2. Conclusion

These results show that plasma Aβ1-42 and Aβ1-40 levels differ as a function of age in dogs and relate to the level and severity of cognitive impairment. Younger animals showed higher plasma Aβ1-42 and Aβ1-40 than normal aged dogs, suggesting that plasma Aβ levels may decrease as brain Aβ deposition increases with age. High Aβ1-42 and Aβ42/40 levels were found in dogs suffering mild cognitive impairment, as compared to both severely impaired dogs and control subjects. These findings suggest that changes in plasma Aβ1-42 levels in pet dogs during pathological aging might exhibit patterns similar to those previously reported for human MCI and AD.

Acknowledgements

Disclosure statements for the authors: PP, IM, and MS are employees at Araclon Biotech Ltd. AM-G and BR are supported by grants from Araclon Biotech to the University of Santiago and Zaragoza, respectively. GS, M-LS, SG-B and AV have no actual or potential conflict of interest. This work has been partially financed by the Spanish CEDTI and ENISA.

References

Assini, A., Cammarata, S., Vitali, A., Colucci, M., Giliberto, L., Borghi, R., Inglese, M.L., Volpe, S., Ratto, S., gna-Bricarelli, F., Baldo, C., Argusti, A., Odetti, P., Piccini, A., Tabaton, M., 2004. Plasma levels of amyloid beta-protein 42 are increased in women with mild cognitive impairment. Neurology 63, 828–831.

Azkona, G., García-Belenguer, S., Chacón, G., Rosado, B., León, M., Palacio, J., 2009. Prevalence and risk factors of behavioural changes associated with age-related cognitive impairment in geriatric dogs. J. Small Anim. Pract. 50, 87–91.

Bernedo, V., Insua, D., Suárez, M.-L., Santamarina, G., Sarasa, M., Pesini, P., 2009. Cortical beta-amyloid pathology in the dog is accompanied with loss of serotonergic neurons. J. Comp. Neurol. 513, 417–429.

Blasko, I., Jellinger, K., Kemmler, G., Krampla, W., Jungwirth, S., Wichart, I., Tragl, K.H., Fischer, P., 2008. Conversion from cognitive health to mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: prediction by plasma amyloid beta 42, medial temporal lobe atrophy and homocysteine. Neurobiol. Aging 29, 1–11.

Blennow, K., Hampel, H., Weiner, M., Zetterberg, H., 2010. Cerebrospinal fluid and plasma biomarkers in Alzheimer disease. Nat. Rev. Neurol. 6, 131–144.

Borras, D., Ferrer, I., Pumarola, M., 1999. Age-related changes in the brain of the dog. Vet. Pathol. 36, 202–211.

Bourdel-Marchasson, I., Laksir, H., Puget, E., 2010. Interpreting routine biochemistry in those aged over 65 years: a time for change. Maturitas 66, 39–45.

Colle, M.-A., Hauw, J.-J., Crespeau, F., Uchihara, T., Akiyama, H., Checler, F., Pageat, P., Duykaerts, C., 2000. Vascular and parenchymal Abeta deposition in the aging dog: correlation with behavior. Neurobiol. Aging 21, 695–704.

Cosentino, S.A., Stern, Y., Sokolov, E., Scarmeas, N., Manly, J.J., Tang, M.X., Schupf, N., Mayeux, R.P., 2010. Plasma β-Amyloid and Cognitive Decline. Arch. Neurol. 67, 1485–1490.

Cotman, C.W., Head, E., 2008. The canine (dog) model of human aging and disease: dietary, environmental and immunotherapy approaches. J. Alzheimers Dis. 15, 685–707.

DeMeyer, G., Shapiro, F., Vanderstichele, H., Vanmechelen, E., Engelborghs, S., De Deyn, P.P., Coart, E., Hansson, O., Minthon, L., Zetterberg, H., Blennow, K., Shaw, L., Trojanowski, J.Q., 2010. Diagnosis-independent Alzheimer disease biomarker signature in cognitively normal elderly people. Arch. Neurol. 67, 949–956.

Fagan, A.M., Holtzman, D.M., 2010. Cerebrospinal fluid biomarkers of Alzheimer's disease. Biomark. Med. 4, 51–63.

Fagan, A.M., Roe, C.M., Xiong, C., Mintun, M.A., Morris, J.C., Holtzman, D.M., 2007. Cerebrospinal fluid tau/beta-amyloid(42) ratio as a prediction of cognitive decline in nondemented older adults. Arch. Neurol. 64, 343–349.

Freeman, S.H., Raju, S., Hyman, B.T., Frosch, M.P., Irizarry, M.C., 2007. Plasma Abeta levels do not reflect brain Abeta levels. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 66, 264–271.

Frisoni, G.B., Fox, N.C., Jack Jr., C.R., Scheltens, P., Thompson, P.M., 2010. The clinical use of structural MRI in Alzheimer disease. Nat. Rev. Neurol. 6, 67–77.

Graff-Radford, N.R., Crook, J.E., Lucas, J., Boeve, B.F., Knopman, D.S., Ivnik, R.J., Smith, G.E., Younkin, L.H., Petersen, R.C., Younkin, S.G., 2007. Association of low plasma Abeta42/Abeta40 ratios with increased imminent risk for mild cognitive impairment and Alzheimer disease. Arch. Neurol. 64, 354–362.

Hansson, O., Zetterberg, H., Vanmechelen, E., Vanderstichele, H., Andreasson, U., Londos, E., Wallin, A., Minthon, L., Blennow, K., 2010. Evaluation of plasma Abeta (40) and Abeta(42) as predictors of conversion to Alzheimer's disease in patients with mild cognitive impairment. Neurobiol. Aging 31, 357–367.

Hayes, G., Mathews, K., Doig, G., Kruth, S., Boston, S., Nykamp, S., Poljak, Z., Dewey, C., 2010. The acute patient physiologic and laboratory evaluation (APPLE) score: a severity of illness stratification system for hospitalized dogs. J. Vet. Intern. Med. 24, 1034–1047.

Head, E., Torp, R., 2002. Insights into A[beta] and presenilin from a canine model of human brain aging. Neurobiol. Dis. 9, 1–10.

Head, E., Liu, J., Hagen, T.M., Muggenburg, B.A., Milgram, N.W., Ames, B.N., Cotman, C.W., 2002. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. J. Neurochem. 82, 375–381.

Head, E., Pop, V., Sarsoza, F., Kayed, R., Beckett, T.L., Studzinski, C.M., Tomic, J.L., Glabe, C.G., Murphy, M.P., 2010. Amyloid-beta peptide and oligomers in the brain and cerebrospinal fluid of aged canines. J. Alzheimers Dis. 20, 637–646.

Heath, S., 2002. Behaviour problems in geriatric pet. In: Horwitz, D., Mills, D., Heath, S. (Eds.), Manual of canine and feline behavioural medicine, British small animal veterinary association, Gloucester, pp. 109–118.

Insua, D., Suarez, M.-L., Santamarina, G., Sarasa, M., Pesini, P., 2010. Dogs with canine counterpart of Alzheimer's disease lose noradrenergic neurons. Neurobiol. Aging 31, 625–635.

Jack Jr., C.R., Lowe, V.J., Weigand, S.D., Wiste, H.J., Senjem, M.L., Knopman, D.S., Shiung, M.M., Gunter, J.L., Boeve, B.F., Kemp, B.J., Weiner, M., Petersen, R.C., 2009. Serial PIB and MRI in normal, mild cognitive impairment and Alzheimer's disease: implications for sequence of pathological events in Alzheimer's disease. Brain 132, 1355–1365.

Jack Jr., C.R., Knopman, D.S., Jagust, W.J., Shaw, L.M., Aisen, P.S., Weiner, M.W., Petersen, R.C., Trojanowski, J.Q., 2010. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. Lancet Neurol. 9, 119–128.

Johnstone, E.M., Chaney, M.O., Norris, F.H., Pascual, R., Little, S.P., 1991. Conservation of the sequence of the Alzheimer's disease amyloid peptide in dog, polar bear and five other mammals by cross-species polymerase chain reaction analysis. Brain Res. Mol. Brain Res. 10, 299–305.

Lambert, J.C., Schraen-Maschke, S., Richard, F., Fievet, N., Rouaud, O., Berr, C., Dartigues, J.F., Tzourio, C., Alperovitch, A., Buee, L., Amouyel, P., 2009. Association of plasma amyloid beta with risk of dementia: the prospective Three-City study. Neurology 73, 847–853.

Lewczuk, P., Kornhuber, J., Vanmechelen, E., Peters, O., Heuser, I., Maier, W., Jessen, F., Burger, K., Hampel, H., Frolich, L., Henn, F., Falkai, P., Ruther, E., Jahn, H., Luckhaus, C., Perneczky, R., Schmidtke, K., Schroder, J., Kessler, H., Pantel, J., Gertz, H.J., Vanderstichele, H., De, M.G., Shapiro, F., Wolf, S., Bibl, M., Wiltfang, J., 2010. Amyloid beta peptides in plasma in early diagnosis of Alzheimer's disease: a multicenter study with multiplexing. Exp. Neurol. 223, 366–370.

Lopez, O.L., Kuller, L.H., Mehta, P.D., Becker, J.T., Gach, H.M., Sweet, R.A., Chang, Y.F., Tracy, R., DeKosky, S.T., 2008. Plasma amyloid levels and the risk of AD in normal subjects in the cardiovascular health study. Neurology 70, 1664–1671.

Mayeux, R., Honig, L.S., Tang, M.X., Manly, J., Stern, Y., Schupf, N., Mehta, P.D., 2003. Plasma Aβ40 and Aβ42 and Alzheimer's disease: relation to age, mortality, and risk. Neurology 61, 1185–1190.

Mehta, P.D., Pirttila, T., Mehta, S.P., Sersen, E.A., Aisen, P.S., Wisniewski, H.M., 2000. Plasma and cerebrospinal fluid levels of amyloid beta proteins 1–40 and 1–42 in Alzheimer disease. Arch. Neurol. 57, 100–105.

Neilson, J.C., Hart, B.L., Cliff, K.D., Ruehl, W.W., 2001. Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218, 1787–1791.

Oh, E.S., Troncoso, J.C., Fangmark Tucker, S.M., 2008. Maximizing the potential of plasma amyloid-beta as a diagnostic biomarker for Alzheimer's disease. Neuromolecular Med. 10, 195–207.

2

Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs: Locomotor and exploratory behaviour.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

The Veterinary Journal 194 (2012) 189–195

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvjl

Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs – Part 1: Locomotor and exploratory behaviour

B. Rosado [a,1], Á. González-Martínez [b,1], P. Pesini [c,*], S. García-Belenguer [a], J. Palacio [a], A. Villegas [a], M.-L. Suárez [b], G. Santamarina [b], M. Sarasa [c]

[a] Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain
[b] Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain
[c] Araclon Biotech Ltd., 50012 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Canine
Aging
Cognitive dysfunction
Spontaneous activity
Open-field

ABSTRACT

Age-related cognitive dysfunction syndrome (CDS) has been reported in dogs and it is considered a natural model for Alzheimer's disease in humans. Changes in spontaneous activity (including locomotor and exploratory behaviour) and social responsiveness have been related to the age and cognitive status of kennel-reared Beagle dogs. The aim of this study was to assess the influence of age and severity of CDS on locomotor and exploratory behaviour of privately owned dogs. This is the first part of a two-part report on spontaneous activity in pet dogs.

An open-field (OF) test and a curiosity test were administered at baseline and 6 months later to young (1–4 years, $n = 9$), middle-aged (5–8 years, $n = 9$), cognitively unimpaired aged ($\geqslant 9$ years, $n = 31$), and cognitively impaired aged ($\geqslant 9$ years, $n = 36$) animals. Classification of cognitive status was carried out using an owner-based observational questionnaire, and in the cognitively impaired group, the dogs were categorised as having either mild or severe cognitive impairment. Dogs were recorded during sessions in the testing room and the video-recordings were subsequently analysed.

The severity of CDS (but not age) influenced locomotion and exploratory behaviour so that the more severe the impairment, the higher the locomotor activity and frequency of corner-directed (aimless) behaviours, and the lower the frequency of door-aimed activities. Curiosity directed toward novel stimuli exhibited an age-dependent decline although severely affected animals displayed more sniffing episodes directed towards the objects. OF activity did not change after 6 months. Testing aged pet dogs for spontaneous behaviour might help to better characterise cognitively affected individuals.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Dogs may naturally develop neuropathological and cognitive signs that parallel those seen in normal human aging and early Alzheimer's disease (AD) (Colle et al., 2000; Head et al., 2002; Pugliese et al., 2006; Rofina et al., 2006; Bernedo et al., 2009; Insua et al., 2010, 2012). Age-related cognitive deficits in learning, memory, executive and visuospatial function have been extensively studied in a systematic and controlled manner in laboratory Beagles through a number of standard cognitive tasks (Adams et al., 2000; Tapp and Siwak, 2006; Cotman and Head, 2008). Interestingly, other aspects of behaviour seem to be affected by age. Such behaviours are referred to as spontaneous activity and include locomotion, exploratory behaviour, and social responsiveness (Tapp and Siwak, 2006). Open-field (OF) activity investigation has been used to study these spontaneous behaviours during aging in kennel-housed dogs, mostly Beagles (Head et al., 1997; Siwak et al., 2001).

In veterinary medicine, the age-related cognitive decline in pets is referred to as cognitive dysfunction syndrome (CDS), and could affect more than 22% of the canine geriatric population (Neilson et al., 2001; Azkona et al., 2009). Diagnosis of CDS is made by pathological assessment once other medical and behavioural causes are ruled out (Landsberg and Araujo, 2005; Landsberg et al., 2011). Owner-based observational questionnaires are very useful to check behavioural and cognitive deficits, but the need for more accurate and objective diagnostic procedures in clinical settings has been recognised (Head et al., 2008). Testing dogs might help to better characterise affected individuals, and also help in the monitoring of the disease. To date there are no published data on spontaneous activity tests in client-owned dogs.

This is the first part of a two-part report on spontaneous activity in pet dogs. The aim of this study (Part 1) was to assess the effect of age and severity of cognitive dysfunction on the locomotor and

* Corresponding author. Tel.: +34 876 241 666.
E-mail address: pedropesini@araclon.com (P. Pesini).
[1] These authors contributed equally to the work.

1090-0233/$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.03.025

exploratory behaviour in dogs. To this end, an OF and a curiosity test were administered at baseline and 6 months later to client-owned dogs varying in age and cognitive status. We hypothesised that locomotor and exploratory behaviour would be related to age as well as to the severity of cognitive dysfunction in our dog population. Part 2 will further explore spontaneous activity in a human interaction test and a mirror test to assess social responses to humans and conspecifics, respectively (Rossado et al., 2012).

Materials and methods

Subjects

Two veterinary teaching hospitals (Universidad de Zaragoza and Universidad de Santiago de Compostela) contributed to the collection of cases used in this study. Dogs were small to medium-sized, living with their owners (as pets) and none had been referred to behavioural consultants at the time of admission. Prior to inclusion in the study, all dogs were screened by a routine physical and neurological examination, complete blood count, serum biochemistry, thyroid hormone measurement, and urinalysis when needed. Animals with primary organ system failure (other than brain degeneration), hypothyroidism, untreated Cushing's syndrome and seriously affected mobility were excluded from the study. Animals with severe loss of visual capacity were also excluded.

Eighty-five animals were initially enrolled in the study (baseline period) and followed up after 6 months. The classification of cognitive status was carried out using an owner-based observational questionnaire (Table 1). The owners of the aged dogs were asked to compare the dog's present behaviour to its behaviour prior to 9 years of age, when the dog was a younger adult. After matching the affected items (Yes or No answer), the owner was asked to grade the severity of the impairment for each category using a five-point scale (0 = non-impaired; 4 = severely impaired). A dog was considered cognitively impaired when two or more categories were impaired and the total dysfunction score (TDS, the sum of scores attributed by the owner to each of the four categories) was $\geqslant 2$ points. A score of 2–5 points was described as mild cognitive impairment (mCI) and $\geqslant 6$ points as severe cognitive impairment (sCI).

A study of plasma Aβ levels in this cohort of dogs has been recently published (González-Martínez et al., 2011). The subjects were sorted into (1) young (YG, 1–4 years, $n = 9$), (2) middle-aged (MA, 5–8 years, $n = 9$), (3) cognitively unimpaired aged (CU, $\geqslant 9$ years, $n = 31$), and (4) cognitively impaired aged (CI, $\geqslant 9$ years, $n = 36$). This last group was further subdivided into mild cognitively impaired (mCI, $n = 20$) and severe cognitively impaired (sCI, $n = 16$) animals (see above). Six CU and 13 CI (6 mCI and 7 sCI) dogs failed to complete the follow up.

Table 1
SDC observational questionnaire.

Category	Items
Sleep-wake cycle	
	Walking/pacing at night
	Vocalising (barking/whining) at night
	Sleeping less at night
	Sleeping noticeably more during the day
	Switching between insomnia and hypersomnia
Socio-environmental interactions	
	Decrease in greeting owners
	Decrease in soliciting attention from the owners
	Increase in following the owners around the house
	Decrease in playing with the owners
	Decrease in playing with other dogs
	Changes in personality (irritability, new fears, lack of interest on stimuli)
House-training and commands	
	Starting urinate/defecate in the house
	Decrease in signalling to go out for eliminating
	Decrease in urine marking (non-castrated males)
	Decrease in responding to prior learned commands
Disorientation	
	Staring into space (star gazing) or getting stuck
	Getting lost in the house or during routine walks
	Wandering (aimless walking) in the house
	Trying to pass through narrow places
	Standing at the wrong side of the door to go out
	Difficulty in navigating around or over obstacles
	Decrease in recognising familiar people

All animal procedures followed European and Spanish national legislation on animal protection (Directive 86/609/EEC, Real Decreto 1201/2005), and the Ethical Committees of both participating universities approved the experiments and procedures.

Test procedures

The testing rooms in both participating universities were 2.07 × 2.76 m in size. The floor was marked into 12 squares measuring 69 × 69 cm with black electrical tape to assist in localising the animal's position. Prior to each test session, the floor was thoroughly cleaned with a commercial enzymatic detergent solution for hygienic purposes and to prevent a behavioural response to the odour of other dogs.

Four spontaneous activity tests were conducted at both baseline and follow-up periods in the following sequence: (1) the OF test, (2) human interaction test, (3) curiosity test, and (4) a mirror test. All tests were of 3 min duration and there was a 5-min interval between tests, during which the dog was returned to the owner. In this first part (Part 1) of the work only the OF test and the curiosity test are described. The remaining tests are described in the companion paper (Rossado et al., 2012). The same person at each university conducted both tests. A modified version of testing procedures used by Siwak et al. (2001) in Beagle dogs was followed.

In the OF test, the animal was gently pushed to enter the testing room and the locomotor and exploratory behaviour in the absence of any stimuli was examined. For the curiosity test, three distinct objects (a red Kong, a yellow rubber ice tray and a plush-rattle ostrich) were placed in fixed positions in the central area of the testing room. The objects were cleaned with a detergent solution before each session. This test was conducted to assess the reaction of each dog to novel objects.

Dogs were continuously recorded during sessions with a lightweight video camera mounted above the testing room that enabled a clear view of the dog's behaviour during the tests. Videorecordings were subsequently analysed by two observers (BR and AG-M). Inter-observer reliabilities for the analysed measures expressed as an intra-class correlation coefficient ranged between 0.8 and 1.0 for both consistency and agreement assessment. A Fortran-77 software program was designed to assist in the calculation of the activity duration and frequency of occurrence from the data originally collected.

Behavioural measures

Behavioural measures for duration and frequency of occurrence are described in Table 2. These measures comprised a selection of a larger number of analysed behavioural measures. Thus, a broad list of behavioural measures was initially depicted based on preliminary observations (ad libitum sampling) and previous studies in the field (Head and Milgram, 1992; Head et al., 1997; Siwak et al., 2001).

Data reduction was based on distinct criteria and was performed in consecutive steps. First, we rejected those variables for which the frequency of occurrence was too low to be statistically analysed (e.g., elimination, stereotypical and other-scratching behaviours). Second, we explored data to detect those measures with more potential as explanatory variables, as noted by a higher number of correlations with the rest of variables across tests and groups (Spearman's rank correlation test). When two variables were consistently correlated, we selected the more easily measurable data. We summed simple structural measures not consistently correlated to create functional measures. This was the case for vocalisations, door-directed behaviours (door-DB) and corner-directed behaviours (corner-DB).

Statistical analysis

Average differences in quantitative variables between the general study groups (YG, MA, CU and CI) in each test were assessed either by ANOVA or Kruskal–Wallis test when the parameter distribution was normal or non-normal, respectively (normality assessed with the Kolmogorov–Smirnov test). Tukey's HDS post hoc analysis or the Mann–Whitney U test was used afterwards for multiple comparisons when a significant main effect of group was detected. Furthermore, Student's t test for paired samples or Wilcoxon signed-rank test was conducted to assess inter-test variations. A subsequent identical analysis was carried out considering only the three aged groups (i.e., CU, mCI and sCI). Distribution of qualitative variables was assessed by Chi-square test. Calculations were carried out using the statistical program SPSS 17.0 for Windows (SPSS, Inc.), and $P < 0.05$ denoted statistical significance.

Results

Descriptive information for each group at baseline is shown in Table 3. Non-significant differences were found for sex, reproductive status, and weight or body condition among groups. Aged groups (i.e., CU and CI) did not differ significantly in age.

The frequency of behavioural measures in each test within the general study groups as well as in the aged groups is summarised

Table 2
Behavioural measures in the OF and the curiosity tests.

Behavioural measure	Description
Vocalisations[a]	Total number of episodes of barking, whining or yelping. Individual barks whereas bursts of whine/yelps were considered each as discrete episodes
Total time in the door area[a]	Total time (s) spent in the door's squares
Average time in the door area[a]	Average time (s per occurrence) spent in the door's squares each time the animal enters this area
Locomotor activity (LA)[a]	Total number of squares entered. Entering a new square was considered when both forelimbs did it
LA into the central area[a]	Proportion (%) of LA displayed at the central squares
Immobility[a]	Total time (s) spent sitting or lying in the absence of all other measures except vocalisations
Door-DB[a]	Total number of episodes of door scratching, door sniffing, jumping, rearing or freezing
Corner-DB[a]	Total number of episodes of sniffing or standing against the corners of the room
Playing[b]	Total number of play related behaviours directed towards the objects, including pushing, biting, mouthing, throwing, etc. Tripping over the objects while walking was not considered a play episode.
Sniffing the objects[b]	Total number of episodes in which the dog moves the nose or exhibits clear sniffing movements over the objects

DB: directed behaviours.
[a] OF measures.
[b] Additional measures in the curiosity test.

in Tables 4a and 4b, respectively, whereas duration results are shown in Tables 5a and 5b. With a few exceptions, which are noted for the curiosity test, we found no significant differences between results at baseline and the follow-up across groups and tests. Considering this, data from both periods were analysed jointly. A description of the main features follows below.

OF test

Younger dogs (YG and MA) vocalised more than aged animals (CU and CI) (Table 4a). The total time spent in the door area did not significantly vary as a function of age in cognitively intact dogs (YG, MA and CU), but the average time in this area was higher in YG than in CU dogs (Table 5a). However, among the aged dogs, those that were cognitively impaired (CI) spent less time (total and average) at the door area than the younger groups, and showed less door-DB and more corner-DB than the rest of the groups (Tables 4a and 5a). When the severity of cognitive impairment was taken into account, it was observed that sCI animals showed less door-DB and more corner-DB than the CU group (Fig. 1). In addition, they showed less vocalisation than their healthy counterparts. Furthermore, each time that sCI dogs entered the door area they spent less time in this area than the rest of groups and displayed the highest LA, in parallel with a shorter amount of time spent in immobility (Tables 4b and 5b; Fig. 3).

Curiosity test

Despite introducing objects in the testing room, dogs suffering from sCI still showed more LA than the mCI and CU animals, as occurred in the OF test (Table 4b and Fig. 2). In addition, the sCI dogs spent less average time in the door area and less time in immobility than the mCI and CU groups (Table 5b). With regard to specific measures for this test, YG animals showed more playing episodes, more sniffing episodes directed towards the objects (Fig. 3), and consequently a higher LA into the central area where the objects were placed, compared to the rest of the study groups (Table 4a). Interestingly, sCI dogs displayed more sniffing episodes directed towards the objects than the rest of geriatric groups (Table 4b). In this test, the frequency of corner-DB in sCI dogs was higher than that seen in mCI and CU groups, whereas the frequency of door-DB was lower than that seen in the CU group.

With respect to the OF test, the curiosity test demonstrated a decrease in the frequency of vocalisations ($P < 0.05$) and door-DB ($P < 0.01$) only in YG animals. The MA group increased the amount of time spent in immobility ($P < 0.05$), and the aged groups actually increased the average time spent in the door area (CU, $P < 0.05$; CI, $P < 0.001$), yet decreased their general LA ($P < 0.001$). Further, the time spent in the door area increased in both mCI and sCI animals ($P < 0.001$). With respect to the OF conditions, the LA into the central area of the testing room, where the objects were placed, increased significantly in all cognitively-intact groups (YG, $P < 0.001$; MA and CU, $P < 0.05$) but not in the CI groups (mCI and sCI). In addition, the frequency of corner-DB decreased in all groups (YG, CU and mCI, $P < 0.001$; MA, $P < 0.05$), except for the sCI animals.

Compared to the baseline period, at follow-up, we found that mCI animals showed an increase in the average time spent in the door area and a decrease in the immobility position ($P < 0.05$), whereas sCI animals showed an increase in the total time spent in the door area ($P < 0.01$) and in the frequency of corner-DB ($P < 0.05$).

Table 3
Descriptive data in the studied canine population.

Group	Males (%)	Females (%)	Neutered (%)	Age (months) Mean ± SD	Weight (kg) Mean ± SD	Body condition score (1–5)[A] Mean ± SD
YG ($n = 9$)	55.6	44.4	33.3	31.1 ± 17.7	11.8 ± 5.7	3.2 ± 0.4
MA ($n = 9$)	33.3	66.7	33.3	81.2 ± 16.7	13.2 ± 11.1	3.2 ± 0.4
CU ($n = 31$)	48.4	51.6	41.9	146.4 ± 35.2	12.2 ± 7.7	3.5 ± 0.8
CI ($n = 36$)	61.1	38.9	44.4	153.2 ± 25.5	15.0 ± 9.3	3.4 ± 0.6
	$P = 0.45$[a]		$P = 0.89$[a]	$P = 0.14$[b]	$P = 0.59$[c]	$P = 0.52$[a]

YG: young; MA: middle-aged; CU: cognitively unimpaired aged; CI: cognitively impaired aged.
[A] Body condition scale: 1(too thin) – 3(thin) – 3(ideal) – 4(heavy) – 5(too heavy).
[a] Non-significant difference among groups (Chi-square test).
[b] Non-significant difference between CU and CI groups (Mann–Whitney *U* test).
[c] Non-significant difference among groups (Kruskal–Wallis test).

Table 4a
Behavioural measures scored for frequency of occurrence in the general groups.

Measure	Test	Mean ± SD			
		YG (n = 18)	MA (n = 18)	CU (n = 56)	CI (n = 59)
Vocalisations (times)	OF curiosity	35.4 ± 38.0^{CU,CI}	18.4 ± 13.5^{CU,CI}	10.8 ± 14.7^{YG,MA,ci}	11.2 ± 29.3^{YG,MA,cu}
		19.7 ± 22.5^{CI}	24.3 ± 29.0^{CI}	16.2 ± 20.1^{CI}	12.6 ± 30.2^{YG,MA,CU}
LA (number of squares crossed)	OF curiosity	25.4 ± 20.5^{ci}	21.8 ± 19.8^{ci}	28.0 ± 22.3^{CI}	44.8 ± 34.1^{yg,ma,CU}
		19.3 ± 14.6	16.2 ± 15.6	20.1 ± 21.1	30.7 ± 31.7
LA into central area (% of LA)	OF curiosity	21.0 ± 10.7	19.5 ± 15.3	20.0 ± 14.1	18.3 ± 12.1
		44.6 ± 11.0^{ma,CU,CI}	29.0 ± 14.4^{yg}	25.8 ± 20.1^{YG}	22.2 ± 16.1^{YG}
Door-DB (times)	OF curiosity	9.7 ± 7.7^{ci}	11.1 ± 8.0^{ci}	7.9 ± 6.5^{ci}	5.4 ± 5.5^{yg,ma,cu}
		3.6 ± 3.0^{ma}	9.5 ± 8.3^{yg,ci}	7.6 ± 8.1^{ci}	6.3 ± 10.2^{ma,cu}
Corner-DB (times)	OF curiosity	1.2 ± 1.5^{ci}	0.7 ± 1.0^{CI}	1.2 ± 2.2^{CI}	4.1 ± 5.9^{yg,MA,CU}
		0.1 ± 0.2^{CI}	0.2 ± 0.5^{CI}	0.5 ± 1.2^{CI}	2.1 ± 3.8^{YG,MA,CU}
Sniffing the objects (times)	Curiosity	4.3 ± 3.0^{ma,CU,CI}	2.2 ± 1.5^{yg}	1.9 ± 2.0^{YG}	2.0 ± 2.0^{YG}

YG, young; MA, middle-aged; CU, cognitively unimpaired aged; CI, cognitively impaired aged.
Different letters in each line indicate significant differences between groups (capital letters: $P < 0.01$; lower case letters: $P < 0.05$).

Table 4b
Behavioural measures scored for frequency of occurrence in the aged groups.

Measure	Test	Mean ± SD		
		CU (n = 56)	mCI (n = 34)	sCI (n = 25)
Vocalisations (times)	OF curiosity	10.8 ± 14.7^{S}	16.6 ± 37.2	3.9 ± 8.6^{CU}
		16.2 ± 20.1^{S}	20.0 ± 38.2^{s}	2.5 ± 4.7^{CU,m}
LA (number of squares crossed)	OF curiosity	28.0 ± 22.3^{S}	36.1 ± 31.8^{s}	56.7 ± 34.2^{CU,m}
		20.1 ± 21.1^{S}	23.4 ± 29.6^{s}	40.6 ± 32.4^{CU,m}
LA into central area (% of LA)	OF curiosity	20.0 ± 14.1	17.2 ± 13.8	19.7 ± 9.5
		25.8 ± 20.1	21.3 ± 14.8	23.5 ± 18.1
Door-DB (times)	OF curiosity	7.9 ± 6.5^{s}	6.2 ± 5.9	4.4 ± 4.8^{cu}
		7.6 ± 8.1^{s}	7.3 ± 11.7	4.9 ± 8.0^{cu}
Corner-DB (times)	OF curiosity	1.2 ± 2.2^{M,S}	3.9 ± 6.6^{CU}	4.3 ± 5.0^{CU}
		0.5 ± 1.2^{S}	1.3 ± 3.0^{s}	3.2 ± 4.5^{CU,m}
Sniffing the objects (times)	Curiosity	1.9 ± 2.0^{s}	1.5 ± 1.7^{s}	2.7 ± 2.3^{cu,m}

CU, cognitively unimpaired; mCI, mild cognitive impairment; sCI, severe cognitive impairment.
Different letters in each line indicate significant differences between groups (capital letters: $P < 0.01$; lower case letters: $P < 0.05$); m/M and s/S letters refer, respectively, to mCI and sCI.

Table 5a
Behavioural measures scored for duration in the general groups.

Measure	Test	Mean ± SD			
		YG (n = 18)	MA (n = 18)	CU (n = 56)	CI (n = 59)
Total time in the door area (s)	OF curiosity	115.6 ± 47.6^{CI}	110.2 ± 54.4^{CI}	82.8 ± 58.7	61.5 ± 47.0^{YG,MA}
		97.7 ± 63.9	118.3 ± 62.4	94.3 ± 61.5	88.5 ± 59.7
Average time in the door area (s/occurrence)	OF curiosity	33.0 ± 43.4^{cu,CI}	44.0 ± 62.0^{CI}	24.0 ± 40.6^{yg,ci}	11.9 ± 5.9^{YG,MA,cu}
		35.8 ± 44.9	33.9 ± 41.6	27.7 ± 36.3	31.0 ± 48.8
Immobility (s)	OF curiosity	75.7 ± 60.1^{ci}	58.4 ± 68.2	68.0 ± 62.7^{CI}	38.9 ± 50.7^{yg,CU}
		86.7 ± 71.0	82.3 ± 61.3	74.2 ± 61.9	54.1 ± 61.3

YG, young; MA, middle-aged; CU, cognitively unimpaired aged; CI, cognitively impaired aged.
Different letters in each line indicate significant differences between groups (capital letters: $P < 0.01$; lower case letters: $P < 0.05$).

Table 5b
Behavioural measures scored for duration in the aged groups.

Measure	Test	Mean ± SD		
		CU (n = 56)	mCI (n = 34)	sCI (n = 25)
Total time in the door area (s)	OF curiosity	82.8 ± 58.7^{s}	70.7 ± 51.7	49.0 ± 37.3^{cu}
		94.3 ± 61.5	97.0 ± 61.6	77.0 ± 56.3
Average time in the door area (s/occurrence)	OF curiosity	24.0 ± 40.6^{S}	16.1 ± 32.5^{s}	6.2 ± 10.0^{CU,m}
		27.7 ± 36.3^{s}	40.3 ± 54.8^{s}	18.2 ± 36.6^{cu,m}
Immobility (s)	OF curiosity	68.0 ± 62.7^{S}	50.0 ± 52.6^{s}	23.8 ± 44.8^{CU,m}
		74.2 ± 61.9^{s}	64.2 ± 59.3^{s}	40.3 ± 62.5^{cu,m}

CU, cognitively unimpaired; mCI, mild cognitive impairment; sCI, severe cognitive impairment.
Different letters in each line indicate significant differences between groups (capital letters: $P < 0.01$; lower case letters: $P < 0.05$); m/M and s/S letters refer, respectively, to mCI and sCI.

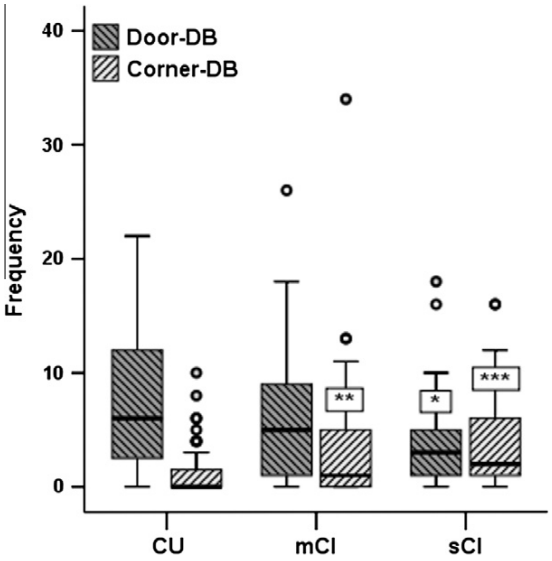


Fig. 1. Box and whisker plots (SE) for the frequency of door- and corner-DB in the aged groups during the OF test. Circles represent outliers, defined as those cases that extend more than 1.5 box-lengths from the edge of the box. Asterisks represent significance compared to the CU group. *, ** or *** represent $P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P \leqslant 0.001$, respectively.

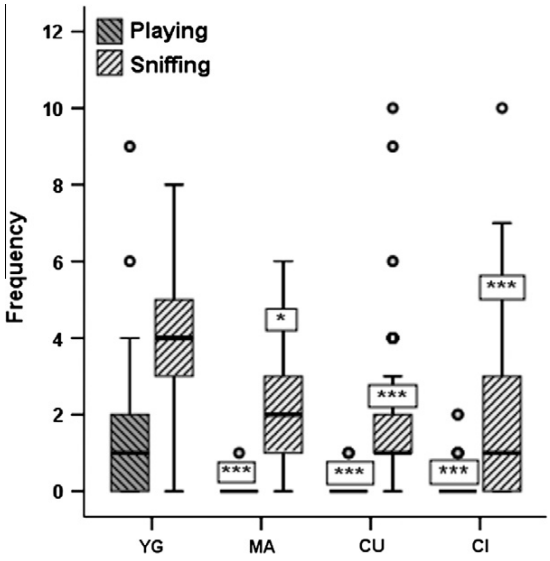


Fig. 3. Box and whisker plots (SE) for the frequency of playing and sniffing episodes directed towards the objects during the curiosity test. Circles represent outliers, defined as those cases that extend more than 1.5 box-lengths from the edge of the box. Asterisks represent significance compared to the YG group. * or *** represent $P < 0.05$ or $P \leqslant 0.001$, respectively.

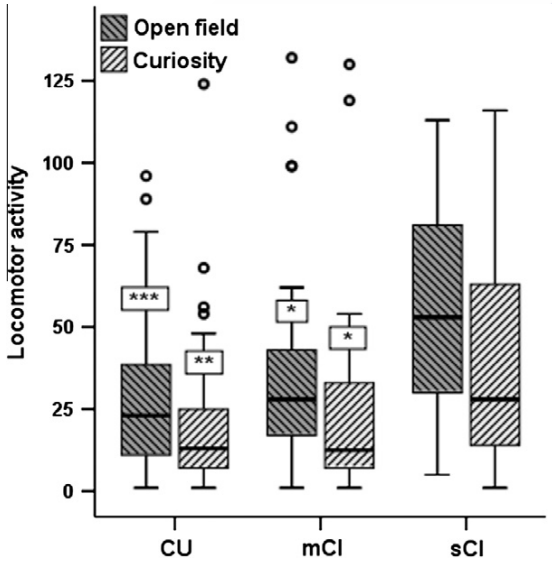


Fig. 2. Box and whisker plots (SE) for locomotor activity (i.e., number of squares crossed) in the aged groups during the OF and the curiosity tests. Circles represent outliers, defined as those cases that extend more than 1.5 box-lengths from the edge of the box. Asterisks represent significance compared to the sCI group. *, ** or *** represent $P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P \leqslant 0.001$, respectively.

Discussion

An OF test and a curiosity test were administered to 85 dogs varying in age and cognitive status in order to explore their locomotor and exploratory behaviour. The vocalisation results are discussed in the companion paper (Rossado et al., 2012). Each test was 3 min in duration, whereas previous OF studies in dogs used sessions lasting 10 min (Head and Milgram, 1992; Head et al., 1997; Siwak et al., 2001). The present results suggest that short sessions better yield valid behavioural measures and would probably reduce biased results related to individual variations in temporal activity patterns, as previously shown in some species of rodents (Montiglio et al., 2010).

Independent of the test administered, the cognitively intact animals (YG, MA and CU), showed no differences in LA. However, CI dogs showed higher LA in the OF test than the rest of the groups. Interestingly, when the severity of cognitive impairment was considered, sCI showed the highest LA in both tests. These results are consistent with previous studies in kennel-reared Beagles in which their locomotion was affected by cognitive status, not age (Head et al., 1997; Siwak et al., 2001, 2003). Similarly, increased activity in the OF test has also been reported in mouse models of AD (Pietropaolo et al., 2008; Filali et al., 2011).

An increase in aimless walking is frequently observed in human dementia. This apparent non-goal-directed locomotion is referred to as wandering, and its prevalence is thought to be more frequent in AD than in vascular dementia (Lai and Arthur, 2003). It has been suggested that increased walking is related to a dysfunction in the behavioural control mechanisms in the prefrontal cortical–striatal–pallidal circuitry (Siwak et al., 2001).

Exploratory behaviour partially depends on motor and spatial capabilities, and on the motivation to explore (Caston et al., 1998). In the present study, the behavioural activities displayed in certain areas of the testing room and the time spent in them were studied as measures of locomotor or exploratory behaviour. The door area was considered relevant since it was the key spatial location in the room to study the animal's response to social isolation forced by the test conditions. On the other hand, corner-DB (i.e., sniffing or standing against corner zones) might be an aimless activity.

We found that in cognitively intact dogs, the age of the animal did not affect the time it spent in the door area, independent of the test performed. This suggests that CU dogs were as spatially oriented as younger dogs. However, in the OF test, dogs with sCI spent less time in the door area than their healthy counterparts. In addition, regardless of the test, each time these severely affected dogs visited this area, they spent less time there than the CU and the mCI animals. Moreover, sCI animals showed the lowest frequency

of door-DB (i.e., jumping, rearing, door scratching or sniffing) and the highest frequency of corner-DB. Taken together, these findings suggest a degree of disorientation in CI dogs, especially in those that were severely impaired. Furthermore, the scarcity of door-DB in CI dogs could also be accounted for, at least partially, by the influence of the cognitive dysfunction on the attachment behavioural system (Topál et al., 1998).

Tests involving novel discrete stimuli, such as the curiosity test, can provide sensitive measures of exploratory behaviour (Siwak et al., 2001). This test showed that YG animals displayed the highest frequency of playing and sniffing episodes directed towards the objects, which was subsequently accompanied with a higher number of times entering the central area than the rest of the groups. Similar to our results, Siwak et al. (2001) observed that younger Beagles spent a longer time in contact with novel toys than impaired aged Beagles, but they did not find inter-group differences in the sniffing of the toys. A decline with age in exploratory behaviour toward novel stimuli has also been found in rodents (Furchtgott et al., 1961; Brennan et al., 1981; Willig et al., 1987; Soffie et al., 1992).

Interestingly, we found that sCI dogs demonstrated more sniffing episodes directed towards the objects than the rest of the geriatric groups. In addition, these sCI dogs maintained the frequency of corner-DB during the curiosity test compared to the OF test, while these behaviours decreased in all the other groups. This phenomenon, observed in the sCI dogs showing a high frequency of sniffing behaviour directed towards the room, the objects or the corners while maintaining a high LA, could be described as micro-stereotypies, as used by O'Keefe and Nadel (1978), when they referred to repetitive nosing and sniffing behaviours in rodents with hippocampal lesions.

Conclusions

This work shows that locomotor and exploratory behaviour varies as a function of age and the animal's cognitive status. In particular, we found an effect of the severity of CDS on the LA and exploratory behaviour directed to specific areas of the environment, so that the more severe the impairment, the higher the LA and frequency of corner-DB, and the lower the frequency of door-related activities. These changes in spontaneous activity resemble some aspects of human dementia, reinforcing canine CDS as a natural model of AD. We also observed an effect of age in exploratory behaviour directed to novel objects, with curiosity exhibiting an age-dependent decline. Testing spontaneous behaviour in aged pet dogs might help to better characterise cognitively affected individuals.

Conflict of interest statement

P.P. and M.S. are employees at Araclon Biotech Ltd. B.R. and A.G-M. are supported by Grants from Araclon Biotech to the Universidad de Zaragoza and Universidad de Santiago de Compostela, respectively. G.S., M.-L.S., S.G-B, J.P. and A.V. have no actual or potential conflict of interest.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Gema Yagüe for designing the Fortran-77 program. We also thank Dr. Ignacio de Blas for his valued advice on statistical analyses and Irene Gimeno for her help during animal recruiting and testing. This work has been partially financed by the Spanish CDTI and ENISA.

References

Adams, B., Chan, A., Callahan, H., Milgram, N.W., 2000. The canine as a model of human cognitive aging: Recent developments. Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry 24, 675–692.

Azkona, G., García-Belenguer, S., Chacón, G., Rosado, B., León, M., Palacio, J., 2009. Prevalence and risk factors of behavioural changes associated with age-related cognitive impairment in geriatric dogs. Journal of Small Animal Practice 50, 87–91.

Bernedo, V., Insua, D., Suárez, M.L., Santamarina, G., Sarasa, M., Pesini, P., 2009. Beta-amyloid cortical deposits are accompanied by the loss of serotonergic neurons in the dog. Journal of Comparative Neurology 513, 417–429.

Brennan, M.J., Dallob, A., Friedman, E., 1981. Involvement of hippocampal serotonergic activity in age-related changes in exploratory behaviour. Neurobiology of Aging 2, 199–203.

Caston, J., Chianale, C., Delhaye-Bouchaud, N., Mariani, J., 1998. Role of the cerebellum in exploration behaviour. Brain Research 808, 232–237.

Colle, M., Hauw, J., Crespeau, F., Uchihara, T., Akiyama, H., Checler, F., Pageat, P., Duykaerts, C., 2000. Vascular and parenchymal Abeta deposition in the aging dog: Correlation with behaviour. Neurobiology of Aging 21, 695–704.

Cotman, C.W., Head, E., 2008. The canine (dog) model of human aging and disease: Dietary, environmental and immunotherapy approaches. Journal of Alzheimer's Disease 15, 685–707.

Filali, M., Lalonde, R., Rivest, S., 2011. Anomalies in social behaviors and exploratory activities in an APPswe/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. Physiology and Behavior 104, 805–880.

Furchtgott, E., Wechkins, S., Dees, J.W., 1961. Open-field exploration as a function of age. Journal of Comparative and Physiological Psychology 54, 386–388.

González-Martínez, A., Rosado, B., Pesini, P., Suárez, M., Santamarina, G., García-Belenguer, S., Villegas, A., Monleón, I., Sarasa, M., 2011. Plasma beta-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease. Experimental Gerontology 46, 590–596.

Head, E., Milgram, N.W., 1992. Changes in spontaneous behaviour in the dog following oral administration of L-deprenyl. Pharmacology, Biochemistry, and Behaviour 43, 749–757.

Head, E., Callahan, H., Cummings, B.J., Cotman, C.W., Ruehl, W.W., Muggenberg, B.A., Milgram, N.W., 1997. Open field activity and human interaction as a function of age and breed in dogs. Physiology and Behaviour 62, 963–971.

Head, E., Liu, J., Hagen, T.M., Muggenburg, B.A., Milgram, N.W., Ames, B.N., Cotman, C.W., 2002. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. Journal of Neurochemistry 82, 375–381.

Head, E., Rofina, J., Zicker, S., 2008. Oxidative stress, aging and CNS disease in the canine model of human brain aging. The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice 38, 167–178.

Insua, D., Suárez, M., Santamarina, G., Sarasa, M., Pesini, P., 2010. Dogs with canine counterpart of Alzheimer's disease lose noradrenergic neurons. Neurobiology of Aging 3, 625–635.

Insua, D., Corredoira, A., González-Martínez, A., Suárez, M.-L., Santamarina, G., Sarasa, M., Pesini, P., 2012. Expression of p75NTR, a marker for basal forebrain cholinergic neurons, in young and aged dogs with or without cognitive dysfunction syndrome. Journal of Alzheimer's Disease 28, 291–296.

Lai, C.K., Arthur, D.G., 2003. Wandering behaviour in people with dementia. Journal of Advanced Nursing 44, 173–182.

Landsberg, G., Araujo, J.A., 2005. Behaviour problems in geriatric pets. The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice 35, 675–698.

Landsberg, G.M., Deporter, T., Araujo, J.A., 2011. Clinical signs and management of anxiety, sleeplessness, and cognitive dysfunction in the senior pet. The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice 41, 565–590.

Montiglio, P.O., Garant, D., Thomas, D., Reale, D., 2010. Individual variation in temporal activity patterns in open-field tests. Animal Behaviour 80, 905–912.

Neilson, J.C., Hart, B.L., Cliff, K.D., Ruehl, W.W., 2001. Prevalence of behavioural changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 218, 1787–1791.

O'Keefe, J., Nadel, L., 1978. Exploration. In: The Hippocampus as a Cognitive Map. Oxford University Press, pp. 240–265.

Pietropaolo, S., Feldon, J., Yee, B.K., 2008. Age-dependent phenotypic characteristics of a triple transgenic mouse model of Alzheimer disease. Behavioral Neuroscience 122, 733–747.

Pugliese, M., Geloso, M.C., Carrasco, J.L., Mascort, J., Michetti, F., Mahy, N., 2006. Canine cognitive deficit correlates with diffuse plaque maturation and S100beta (−) astrocytosis but not with insulin cerebrospinal fluid level. Acta Neuropathologica 111, 519–528.

Rofina, J.E., van Ederen, A.M., Toussaint, M.J., Secreve, M., van der Speak, A., van der Meer, I., Van Eerdenburg, F.J., Gruys, E., 2006. Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. Brain Research 1069, 216–226.

Rossado, B., González-Martínez, Á., Pesini, P., García-Belenguer, S., Palacio, J., Villegas, A., Suárez, M.-L., Santamarina, G., Sarasa, M., 2012. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs. Part 2: Social responsiveness. The Veterinary Journal. 194, 196–201.

Siwak, C.T., Tapp, P.D., Milgram, N.W., 2001. Effect of age and level of cognitive function on spontaneous and exploratory behaviours in the beagle dog. Learning and Memory 8, 317–325.

Siwak, C.T., Tapp, P.D., Zicker, S.C., Murphey, H.L., Muggenburg, B.A., Head, E., Cotman, C.W., Milgram, N.W., 2003. Locomotor activity rhythms in dogs vary with age and cognitive status. Behavioural Neuroscience 117, 813–824.

Soffie, M., Buhot, M.C., Poucet, B., 1992. Cognitive and noncognitive processes involved in selective object exploration: Comparison between young adult and old rats. Physiology and Behaviour 52, 1029–1035.

Tapp, D., Siwak, C.T., 2006. The canine model of human brain aging: Cognition, behaviour, and neuropathology. In: Conn, P.M. (Ed.), Handbook of Models of Human Aging. Elsevier Inc., Burlington, MA, pp. 415–434.

Topál, J., Miklósi, A., Csányi, V., Dóka, A., 1998. Attachment behavior in dogs (*Canis familiaris*): A new application of Ainsworth's (1969) Strange Situation Test. Journal of Comparative Psychology 112, 219–229.

Willig, F., Palacios, A., Monmaur, P., M'Harzi, M., Laurent, J., Delacour, J., 1987. Short-term memory, exploration and locomotor activity in aged rats. Neurobiology of Aging 8, 393–402.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

3

Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs: Social responsiveness.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

The Veterinary Journal 194 (2012) 196–201

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvjl

Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs – Part 2: Social responsiveness

B. Rosado [a,1], Á. González-Martínez [b,1], P. Pesini [c,*], S. García-Belenguer [a], J. Palacio [a], A. Villegas [a], M-.L. Suárez [b], G. Santamarina [b], M. Sarasa [c]

[a] Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain
[b] Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain
[c] Araclon Biotech Ltd. Zaragoza, 50012 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:
Canine
Aging
Cognitive dysfunction
Human interaction
Mirror test

ABSTRACT

Changes in social interactions with owners and other dogs are frequently observed in dogs with cognitive dysfunction syndrome (CDS). The aim of this work was to assess the effect of age and severity of CDS on social responsiveness. This is the second part of a 2-part report on spontaneous activity in pet dogs. A human interaction test and a mirror test were administered at baseline and 6 months later to assess social responses to humans and conspecifics, respectively, to four groups of privately-owned dogs: young ($n = 9$), middle-aged ($n = 9$), cognitively unimpaired aged ($n = 31$), and cognitively impaired aged ($n = 36$). The severity of cognitive impairment was considered in the last group and dogs were categorised as having either mild or severe CDS. The influence of the person and the mirror on locomotion and exploratory behaviour was also studied. Dogs were recorded in a testing room and the video recordings were subsequently analysed.

Young dogs displayed more interactions involving physical contact with a person. Young and middle-aged dogs showed more vocalisations in response to social isolation. In contrast, aged animals spent more time in front of the mirror. Changes in social responsiveness associated with severe CDS included decreased response to social isolation and human interaction and increased time in front of the mirror, suggesting a deficit in habituation. Testing of spontaneous activity might help to characterise CDS in aged dogs, a condition increasingly diagnosed in veterinary clinics and a potentially useful natural model of Alzheimer's disease in humans.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Dogs can suffer age-related neuropathology and cognitive deficits that parallel several key aspects of normal human aging and early Alzheimer's disease (AD). There is evidence of β-amyloid (Aβ) deposits and amyloid angiopathy in the brain of aged dogs, as well as other neuropathological features of AD, such as neurodegeneration and oxidative damage (Colle et al., 2000; Head et al., 2002; Pugliese et al., 2006; Rofina et al., 2006; Bernedo et al., 2009; Insua et al., 2010, 2012). Moreover, we have recently found changes in plasma Aβ-42 levels during pathological aging in dogs that might exhibit patterns similar to those previously reported for human mild cognitive impairment and AD (González-Martínez et al., 2011).

The so-called cognitive dysfunction syndrome (CDS) in aged dogs includes a constellation of behavioural and cognitive deficits normally affecting four categories: social interactions, sleep–wake cycles, orientation ability and housetraining habits. (Ruehl et al., 1998; Colle et al., 2000; Rofina et al., 2006; González-Martínez et al., 2011). Changes in social interactions include decreased interest in petting or even avoiding contact, decreased greeting behaviour, aggression toward the family members or unfamiliar people, and altered relationships with other household pets (less social or fearful and anxious behaviour) (Landsberg et al., 2011). Human patients suffering from AD also undergo several changes in social behaviour including aggression, culturally inappropriate behaviours, and affective disturbances (Shinosaki et al., 2000).

Spontaneous activity, including locomotion, exploratory behaviour and social responsiveness, has been previously tested in kennel-housed dogs, mostly Beagles. These studies show that cognitively impaired dogs display abnormal social responses, often engaging in undirected, stereotypical types of behavioural patterns (Head et al., 1997; Siwak et al., 2001), and it has been suggested that this behavioural profile is consistent with behavioural disruptions occurring in human dementia (Tapp and Siwak, 2006). Interestingly, several studies have indicated that behavioural and

* Corresponding author. Tel.: +34 876 241 666.
E-mail address: pedropesini@araclon.com (P. Pesini).
[1] These authors contributed equally to the work.

1090-0233/$ - see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2012.03.023

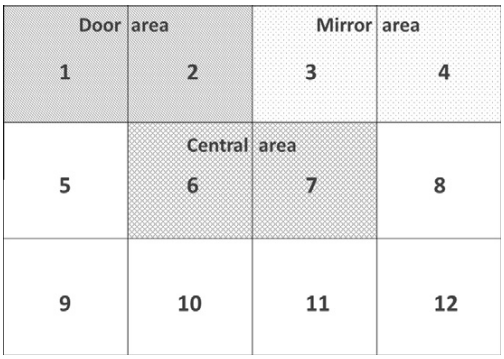


Fig. 1. Testing room. The floor was marked into 12 squares (69 × 69 cm) with black electrical tape to assist in localising the animal's position. Three main areas were distinguished, namely the door area, the mirror area and the central area.

psychological symptoms of human dementia are not merely an epiphenomenon of cognitive impairment, but could be attributed to specific biological brain dysfunction (Shinosaki et al., 2000).

This is the second part of a 2-part study. In Part 1, we tested changes in locomotion and exploratory behaviour as a function of age and cognitive impairment in pet dogs (Rossado et al., 2012). The aim of this work (Part 2) was to further explore spontaneous activity in a human interaction test and a mirror test to assess social responses to humans and conspecifics, respectively. The influence of these introduced stimuli (i.e. human and mirror) on locomotion and exploratory behaviour was studied by comparing these tests with a previously administered open-field (OF) test (Rossado et al., 2012). The tests were carried out at baseline and 6 months later in pet dogs varying in age and cognitive status. We hypothesised that social responsiveness would be related to age as well as to the severity of cognitive dysfunction.

Materials and methods

Subjects

The same animals participating in the companion paper (Part 1) were included in the present study. Classification of cognitive status was carried out using an owner-based observational questionnaire (González-Martínez et al., 2011; Rossado et al., 2012). Briefly, the subjects were sorted into (1) young (YG, 1–4 years, $n = 9$), (2) middle-aged (MA, 5–8 years, $n = 9$), (3) cognitively unimpaired aged (CU, ⩾9 years, $n = 31$), and (4) cognitively impaired aged (CI, ⩾9 years, $n = 36$). This last group was further subdivided into mild cognitively impaired (mCI, $n = 20$) and severe cognitively impaired (sCI, $n = 16$) animals. Six CU and 13 CI (6 mCI and 7 sCI) dogs failed to complete the follow up.

All animal procedures followed European and Spanish national legislation on animal protection (Directive 86/609/EEC, Real Decreto 1201/2005), and the Ethical Committees of both participating universities approved the experiments and procedures.

Test procedures

The testing room is illustrated in Fig. 1. A 3 min human interaction test and a 3 min mirror test were conducted at both baseline and follow-up periods. Dogs were also tested in an OF test and a curiosity test which are described in the companion paper (Part 1). A modified version of testing procedures conducted by Siwak et al. (2001) in Beagle dogs was used. In the human interaction test, a non-familiar person was seated in a fixed position in the central area of the testing room prior to the dog's entrance (Fig. 1). The person was instructed neither to respond nor to interact with the dog. This test was conducted to assess the reaction of each dog to the presence of a person. In the mirror test, a mirror (90 × 90 cm) was cleaned before each session and securely fixed to one wall of the testing room (Fig. 1). This test was aimed to examine the reaction of the dog to the presence of the mirror.

Dogs were continuously recorded during sessions and video recordings were subsequently analysed by two observers (BR and AG-M). A Fortran-77 software program was designed to assist in the calculation of the activity duration and frequency of occurrence from the data originally collected.

Table 1
Behavioural measures in the human interaction and the mirror tests.

Behavioural measure	Description
Immobility-cohesion[a]	Total number of episodes in which the dog remains sitting or lying in virtually physical contact with the person
Active interactions[a]	Total number of episodes in which the dog initiates physical contact with the person by climbing, pushing with the head and/or displays face-licking
Total time in the mirror area[b]	Total time (s) spent in front of the mirror
LA into the mirror area[b]	Proportion (%) of LA displayed at the mirror area

[a] Specific measures in the human interaction test.
[b] Specific measures in the mirror test.

Behavioural measures

Behavioural measures included those previously analysed in the OF test (see Rossado et al., 2012), namely: (1) vocalisations; (2) total time in the door area (s) and average duration in this area each time the animal entered it (s per occurrence); (3) locomotor activity (LA; number of squares crossed); (4) LA into the central area (proportion of LA displayed at the central squares); (5) time (s) in immobility (i.e., sitting or lying); (6) door and corner-directed behaviours (door-DB and corner-DB). Additional measures for the human interaction and the curiosity tests are described in Table 1.

Statistical analysis

Average differences in quantitative variables between the general study groups (YG, MA, CU and CI) in each test were assessed either by ANOVA or Kruskal–Wallis test when the parameter distribution was normal or non-normal, respectively (normality assessed with the Kolmogorov–Smirnov test). Tukey's HDS post-hoc analysis or the Mann–Whitney U test was used afterwards for multiple comparisons when a significant main effect of group was detected. Student's t test for paired samples or Wilcoxon signed-rank test was conducted to assess inter-test variations. A subsequent identical analysis was carried out considering only the three aged groups (i.e., CU, mCI and sCI). Distribution of qualitative variables was assessed by the chi-square test. Calculations were carried out using the statistical program SPSS 17.0 for Windows (SPSS, Inc.), and $P < 0.05$ denoted statistical significance.

Results

The frequency of behavioural measures in the human interaction and the mirror tests in the general study groups as well as in the aged groups is summarised in Tables 2a and 2b, respectively, whereas duration results are shown in Tables 3a and 3b. With one dog (1 MA) in the human interaction test and eight dogs (2 MA, 5 CU and 1 mCI) in the mirror test, testing was not performed according to procedures and these animals were excluded from analyses.

With a few exceptions, which are noted for each test, we found no significant differences between results at baseline and the follow-up across groups and tests, and data from both periods were analysed jointly. The frequency and durations results in the OF test are described in the companion paper (Rossado et al., 2012).

Human interaction test

In the presence of a person in the testing room, sCI dogs displayed less door-DB and spent less time in immobility than the mCI and the CU group (Tables 2b and 3b). Interestingly, we found that the frequency of corner-DB in this test increased after 6 months only in the sCI group ($P < 0.05$). On the other hand, YG animals displayed more active interactions with the person than the aged groups (Fig. 3). They also showed more immobility-cohesion episodes than the rest of the groups (Table 2a), but the frequency of these episodes decreased after 6 months ($P < 0.05$). Furthermore,

Table 2a
Behavioural measures scored for frequency of occurrence in the general groups.

Measure	Test	YG (n = 18)	MA (n = 18) Mean ± SD	CU (n = 56)	CI (n = 59)
Vocalisations (times)	Human	6.9 ± 6.2^{CI}	12.2 ± 19.0^{ci}	6.5 ± 8.8^{ci}	6.9 ± 20.0^{YG,ma,cu}
	Mirror	42.4 ± 43.6^{cu,CI}	23.1 ± 27.8^{ci}	18.1 ± 21.0^{yg,CI}	16.4 ± 34.2^{YG,ma,CU}
LA (number of squares crossed)	Human	23.3 ± 18.5	17.9 ± 16.5	30.1 ± 35.1	37.3 ± 33.1
	Mirror	19.7 ± 14.6	17.0 ± 17.1	21.2 ± 21.8	32.7 ± 31.8
LA into the central area (% of LA)	Human	34.0 ± 17.0^{CI}	28.2 ± 15.8	25.9 ± 17.0^{ci}	17.8 ± 16.8^{YG,cu}
	Mirror	23.1 ± 12.2	15.8 ± 16.0	15.7 ± 13.4	17.5 ± 13.4
Door-DB (times)	Human	3.0 ± 3.0	2.5 ± 2.7	4.8 ± 5.1^{ci}	3.1 ± 4.5^{cu}
	Mirror	6.3 ± 6.0^{ci}	7.9 ± 8.5	5.9 ± 7.0^{CI}	5.6 ± 15.6^{yg,CU}
Corner-DB (times)	Human	0.4 ± 0.8	0.1 ± 0.5^{ci}	0.2 ± 0.7^{CI}	2.0 ± 5.1^{ma,CU}
	Mirror	0.3 ± 0.5	0.4 ± 0.8	0.2 ± 0.6^{CI}	1.3 ± 2.5^{CU}
Immobility-cohesion (times)	Human	1.2 ± 0.9^{ma,CU,CI}	0.5 ± 1.0^{yg}	0.7 ± 1.2^{YG,ci}	0.3 ± 0.7^{YG,cu}
LA into the mirror area (% of LA)	Mirror	18.1 ± 12.3^{CU}	18.0 ± 12.3^{CU}	33.1 ± 16.0^{YG,MA}	27.8 ± 15.8

YG, young; MA, middle-aged; CU, cognitively unimpaired aged; CI, cognitively impaired aged. Human indicates the human interaction test.
Different letters in each line indicate significant differences between groups (capital letters: $P < 0.01$; lower case letters: $P < 0.05$).

Table 2b
Behavioural measures scored for frequency of occurrence in the aged groups.

Measure	Test	CU (n = 56)	mCI (n = 34) Mean ± SD	sCI (n = 25)
Vocalisations (times)	Human	6.5 ± 8.8^{s}	10.1 ± 25.4^{s}	2.6 ± 5.8^{s,m}
	Mirror	18.1 ± 21.0^{S}	24.0 ± 42.4^{s}	6.4 ± 14.2^{CU,m}
LA (number of squares crossed)	Human	30.1 ± 35.1	29.5 ± 29.9	47.9 ± 34.9
	Mirror	21.2 ± 21.8^{S}	22.0 ± 28.5^{S}	46.7 ± 30.9^{CU,M}
LA into the central area (% of LA)	Human	25.9 ± 17.0	17.8 ± 15.7	17.8 ± 18.5
	Mirror	15.7 ± 13.4	18.2 ± 14.9	16.6 ± 11.4
Door-DB (times)	Human	4.8 ± 5.1^{S}	4.3 ± 5.4^{s}	1.4 ± 1.7^{CU,m}
	Mirror	5.9 ± 7.0^{S}	8.5 ± 20.3^{s}	1.7 ± 2.3^{CU,m}
Corner-DB (times)	Human	0.2 ± 0.7^{m,S}	2.1 ± 6.3^{cu}	1.8 ± 2.8^{CU}
	Mirror	0.2 ± 0.6^{m,S}	0.9 ± 1.7^{cu}	1.9 ± 3.2^{CU}
Immobility-cohesion (times)	Human	0.7 ± 1.2^{s}	0.3 ± 0.8	0.2 ± 0.4^{cu}
LA into the mirror area (% of LA)	Mirror	33.1 ± 16.0^{m}	24.5 ± 17.0^{cu}	32.0 ± 13.3

CU, cognitively unimpaired; mCI, mild cognitive impairment; sCI, severe cognitive impairment. Human indicates the human interaction test.
Different letters in each line indicate significant differences between groups (capital letters: $P < 0.01$; lower case letters: $P < 0.05$); m/M and s/S letters refer, respectively, to mCI and sCI.

Table 3a
Behavioural measures scored for duration in the general groups.

Measure	Test	YG (n = 18)	MA (n = 18) Mean ± SD	CU (n = 56)	CI (n = 59)
Total time in the door area (s)	Human	69.1 ± 55.4	93.2 ± 66.5	72.1 ± 57.0	61.2 ± 52.2
	Mirror	112.8 ± 43.8^{CI}	105.3 ± 76.5^{ci}	85.2 ± 64.8^{ci}	55.4 ± 55.6^{YG,ma,cu}
Average time in the door area (s/occurrence)	Human	14.6 ± 15.3	27.7 ± 41.2^{ci}	17.1 ± 26.1	13.2 ± 21.5^{ma}
	Mirror	25.8 ± 19.8^{CI}	28.8 ± 44.8	22.6 ± 31.7^{CI}	11.9 ± 18.8^{YG,CU}
Immobility (s)	Human	54.8 ± 51.8	59.7 ± 68.0	49.7 ± 56.5	36.7 ± 55.7
	Mirror	83.1 ± 58.9^{cu,CI}	63.1 ± 66.6	55.9 ± 53.8^{yg,ci}	40.9 ± 58.5^{YG,cu}
Total time in the mirror area (s)	Mirror	22.8 ± 30.6^{cu,ci}	17.8 ± 25.3^{CU,CI}	55.1 ± 56.2^{yg,MA}	52.7 ± 49.4^{yg,MA}

YG, young; MA, middle-aged; CU, cognitively unimpaired aged; CI, cognitively impaired aged. Human indicates the human interaction test.
Different letters in each line indicate significant differences between groups (capital letters: $P < 0.01$; lower case letters: $P < 0.05$).

YG and CU dogs showed higher LA into the central area, where the person was sitting down, compared to the CI animals (Table 2a). In particular, the sCI group showed less immobility-cohesion episodes than their healthy homologous CU (Table 2b).

When comparing the results in this test with those previously obtained in the OF test, we found that the presence of a person was accompanied by a decrease in vocalisations ($P < 0.001$), and an increase in the LA into the central area ($P < 0.05$) in YG and CU groups. Moreover, YG dogs decreased the time spent in the door area ($P < 0.001$), whereas CU decreased the amount of time spent in immobility ($P = 0.05$). In the presence of a person, the frequency of door-DB ($P < 0.01$) as well as corner-DB (YG and MA, $P < 0.05$; CU and CI, $P < 0.001$) decreased in all groups with respect to the OF test.

Table 3b
Behavioural measures scored for duration in the aged groups.

Measure	Test	CU (n = 56) Mean ± SD	mCI (n = 34)	sCI (n = 25)
Total time in the door area (s)	Human	72.1 ± 57.0	65.7 ± 53.5	55.1 ± 50.8
	Mirror	85.2 ± 64.8^{S}	69.3 ± 66.3	37.2 ± 29.4^{CU}
Average time in the door area (s/occurrence)	Human	17.1 ± 26.1^{s}	13.3 ± 15.8^{s}	13.0 ± 27.9^{cu,m}
	Mirror	22.6 ± 31.7^{S}	17.1 ± 23.0^{s}	5.0 ± 7.2^{CU,m}
Immobility (s)	Human	49.7 ± 56.5^{S}	48.8 ± 60.2^{s}	20.3 ± 45.0^{CU,m}
	Mirror	55.9 ± 53.8^{S}	53.6 ± 60.1^{s}	24.2 ± 52.8^{CU,m}
Total time in the mirror area (s)	Mirror	55.1 ± 56.2	36.3 ± 42.7^{S}	74.4 ± 50.1^{M}

CU, cognitively unimpaired; mCI, mild cognitive impairment; sCI, severe cognitive impairment. Human indicates the human interaction test.
Different letters in each line indicate significant differences between groups (capital letters: $P < 0.01$; lower case letters: $P < 0.05$); m/M and s/S letters refer, respectively, to mCI and sCI.

Mirror test

In this test, YG dogs vocalised more frequently than CU dogs (Table 2a), whereas sCI animals vocalised less than any other group (Table 2b, Fig. 2a). Moreover, YG dogs spent a longer amount of time immobile than aged dogs (Table 4). Again, sCI animals spent less time immobile and showed less door-DB than the mCI and CU groups (Tables 2b and 3b). On the other hand, aged groups (CU and CI) spent more time in the mirror area than the younger groups (YG and MA) (Table 4). In addition, younger groups showed less LA into the mirror area than CU dogs (Table 2a).

With respect to the OF test, the introduction of the mirror was accompanied by an increase in vocalisations in CU ($P < 0.01$) and mCI groups ($P < 0.05$) and a decrease in LA in all age groups (CU and mCI, $P < 0.001$; sCI, $P < 0.05$). In addition, the frequency of door-DB and corner-DB in the mirror test decreased significantly in all groups with the exception of MA animals. Similarly, the time spent in the mirror area increased significantly in all animals with respect to the OF test, except for the MA and the mCI groups.

Compared to baseline, at the follow-up assessment the mCI animals showed a decrease in the time (total and average) spent in the door area ($P < 0.05$). In addition, YG dogs spent less time in the mirror area ($P < 0.05$), and with fewer entrances into this area ($P < 0.001$). This latter result was also observed in CU dogs ($P < 0.05$).

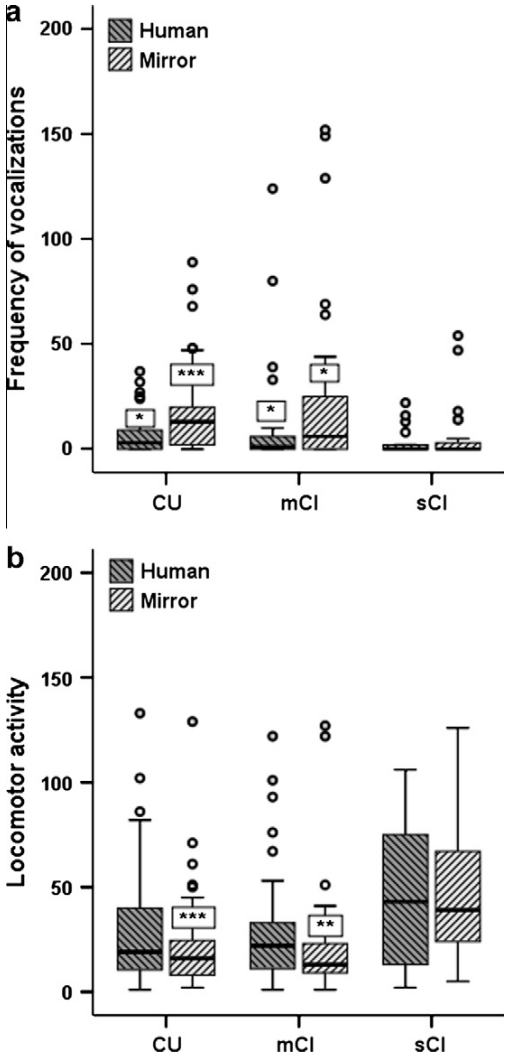


Fig. 2. (a and b) Box and whisker plots (SE) for the frequency of vocalisations (a) and locomotor activity (i.e., number of squares crossed) (b) in the aged groups during the human interaction and the mirror tests. Circles represent outliers, defined as those cases that extend more than 1.5 box-lengths from the edge of the box. Asterisks represent significance compared to the sCI group. *, ** or *** represent $P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P \leqslant 0.001$, respectively. Human indicates human interaction test.

Discussion

Dogs are a highly social species and establish strong relationships with their conspecifics and humans (Lindsay, 2001). In this regard, Tuber et al. (1996) found that kennel dogs exposed to a novel environment had lower activity (and glucocorticoid levels) when in the company of their human caretaker than with their kennel mates. This finding points to a difference in the nature of dog-human and inter-dog social relationships that we assessed by the human interaction test and the mirror test, respectively, in a cohort of companion dogs varying in age and cognitive status. All of them had been previously tested in an OF setting (see Rossado et al., 2012).

The YG dogs showed more active (i.e. displaying attention-seeking behaviours) and passive (i.e., remaining in physical contact) interactions with the human contact. In some instances these YG dogs climbed upon the person's lap for the total duration of the test. In agreement with these results, Siwak et al. (2001) found that young Beagles spent more time in contact with the human. The rest of the cognitively intact dogs (i.e., MA and CU groups) also varied their activity pattern in the presence of a person but to a lesser extent, and a decline in door-and corner-DB was observed in all groups with respect to the results in the OF test. Moreover, CU dogs and YG dogs decreased their frequency of vocalisations, and increased the times they entered the central area compared to the

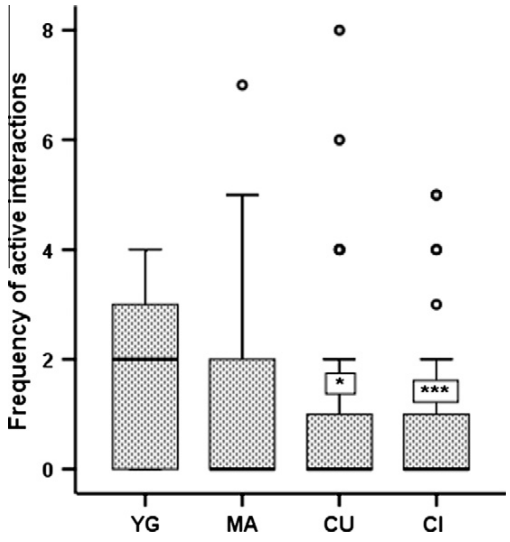


Fig. 3. Box and whisker plots (SE) for the frequency of active interactions directed towards the person during the human interaction test. Circles represent outliers, defined as those cases that extend more than 1.5 box-lengths from the edge of the box. Asterisks represent significance compared to the YG group. *, ** or *** represent $P < 0.05$, $P < 0.01$ or $P \leqslant 0.001$, respectively.

OF test, suggesting that being close to an unfamiliar person can attenuate the response to isolation from the owner in these animals.

In Part 1 of this study we reported sCI dogs showed the highest LA in an OF and a curiosity test (Rossado et al., 2012). This also occurred in the present mirror test but not in the human interaction test. Thus, when the person was present, those differences previously observed in locomotion between CI dogs, sCI animals in particular, and CU dogs disappeared. In this sense, it could be argued that CI dogs also reacted to the presence of the person, but to a lesser extent. However, sCI dogs appeared to be quite refractory to this strong social influence and displayed less passive interactions directed to the human being than to their healthy homologues. Furthermore, sCI dogs continued to spend less time immobile, which resembles the reduced sociability combined with increased activity recently described in a transgenic mouse model of AD (Filali et al., 2011).

Mirror self-recognition responses have been observed in some primates, dolphins and elephants (Plotnik et al., 2006). The reaction toward the mirror reflection in dogs is initially not a self-recognition response but an alien-directed response (Gallup, 1968; Tapp and Siwak, 2006). In our study, we used the time spent in the mirror area as well as the times (frequency) the dog entered this area as surrogate measures of the time spent reacting to the reflection. Since the mirror reflected the self-image, and therefore, a false conspecific image, habituation to the reflection would be expected after a while. Interestingly, mCI animals spent a shorter time reacting to the reflection than sCI animals.

We also found that the aged dogs (CU and CI) spent a longer time than the younger ones (YG and MA) in the mirror area, although they showed extensive variability in the way they reacted to the reflection (data not shown). It is possible that a more detailed analysis of the mirror-directed behaviour (instead of just the time spent in front of it) might yield stronger differences among groups. Regardless of this, the mirror test in our aged dogs revealed certain similarities with the inability of self-recognition observed in AD patients with severe degrees of dementia (Biringer et al., 1988; Biringer and Anderson, 1992; Mendez et al., 1992). Misidentification and facial misrecognition in human dementia have been related to right hemispheric pathology (Forstl et al., 1991; Silva et al., 1993; Ellis, 1994; Breen et al., 2001).

A typical context for barking in domestic dogs occurs when they are left alone in a room isolated from their owner, and this barking might play a role in the human-dog communication (Yin and McCowan, 2004; Pongracz et al., 2010). Thus the OF test could be used to obtain information not only on locomotor and exploratory behaviours, but also on the dog's response to social isolation in a novel environment. Besides vocalising, the previously described door-oriented activities might also reflect the response to social isolation. In the present study, younger dogs vocalised more than aged dogs during the OF test. Among the aged groups, animals suffering from sCI showed the lowest frequency of vocalisations in all tests, even during the mirror test, in which they spent a lot of time reacting to the reflected image. A weak response to isolation, as measured by few vocal communication behaviours together with other door-oriented activities, might denote disorientation and not a rapid habituation to separation from their owner.

Taking together the results from the two reports (Parts 1 and 2) on locomotor and exploratory behaviours, as well as on social responsiveness, it is possible to depict group behavioural profiles. In particular, the CU group, similar to younger dogs, was characterised by goal-directed activities in most cases. However, social and curiosity responses in this group were moderate with regard to YG animals, as they might prefer proximity to the person or the novel stimuli instead of physical contact.

Dogs with sCI were hyperactive, as measured by high LA levels and short durations of immobility. Regardless of the testing environment, these severely impaired animals often engaged in non-goal-directed activities, such as repetitive corner exploration, which we consider to be a stereotyped activity pattern. Moreover, this behavioural pattern was linked to a low (vocal and motor) response to both social isolation and human interaction. Dogs with mCI were characterised by an intermediate profile in the behavioural continuum between the intact dogs and the severely impaired ones. Thus, mCI dogs displayed similar locomotor and exploratory patterns to that exhibited by the CU dogs but, similar to the sCI dogs, they engaged in a high number of corner-DB. Furthermore, mCI dogs tended to be less reactive to any stimulus introduced in the testing environment than their healthy intact counterparts.

Considering the previous behavioural patterns, testing aged pet dogs for spontaneous behaviour, as well as countersign data obtained from owner-based questionnaires, might help to characterise the severity of canine CDS. In addition, some behavioural measures analysed during testing might help disease monitoring in impaired animals by comparisons with baseline measurements (e.g. increase in the frequency of corner-DB). This temporal evolution may suggest a possible worsening of clinical signs but this needs to be investigated further.

The behavioural profiles observed in this study consistently agree with the classification of cognitive status obtained by our questionnaire in the same cohort of dogs. Questionnaires that include psychometric scales have been successfully used for measuring and phenotyping behaviour in dogs (van den Berg et al., 2006). Furthermore, this questionnaire-based classification of cognitive status was related to plasma Aβ levels (González-Martínez et al., 2011). Nevertheless, it is possible that a CDS diagnosis included dementias other than AD-like dementia (e.g. vascular dementia). It is important to note that tools and criteria for CDS diagnosis in veterinary medicine still need considerable development and validation. We hope this study contributes to this aim.

Conclusions

Social responsiveness was primarily affected by age but also influenced by the severity of cognitive impairment. Young dogs displayed more interactions involving physical contact with humans and more vocalisations in response to social isolation but aged animals spent more time in the mirror area, suggesting a deficit in habituation to the reflection of a fake dog image. CDS, especially if severe, influenced social responsiveness so that it decreased the response to social isolation and increased the response to the mirror reflection. The results are congruent with the classification of cognitive status obtained by our questionnaire and may serve as an indirect validation of the approach for the diagnosis of CDS. Further research should be carried out to validate psychometric owner-based questionnaires for CDS diagnosis in dogs.

Conflict of interest statement

P.P. and M.S. are employees at Araclon Biotech Ltd. B.R. and A.G-.M. are supported by grants from Araclon Biotech to the Universidad de Zaragoza and Universidad de Santiago de Compostela, respectively. G.S., M-.L.S., S.G-.B, J.P. and A.V. have no actual or potential conflict of interest.

Acknowledgements

The authors wish to thank Dr. Gema Yagüe for designing the Fortran-77 program. We also thank Dr. Ignacio de Blas for his valued advice on statistical analyses and Irene Gimeno for her help during animal recruiting and testing. This work has been partially financed by the Spanish CDTI and ENISA.

References

Bernedo, V., Insua, D., Suárez, M.L., Santamarina, G., Sarasa, M., Pesini, P., 2009. Beta-amyloid cortical deposits are accompanied by the loss of serotonergic neurons in the dog. Journal of Comparative Neurology 513, 417–429.

Biringer, F., Anderson, J.R., Strubel, D., 1988. Self-recognition in senile dementia. Experimental Aging Research 14, 177–180.

Biringer, F., Anderson, J.R., 1992. Self-recognition in Alzheimer's disease: A mirror and video study. Journal of Gerontology 47, 385–388.

Breen, N., Caine, D., Coltheart, M., 2001. Mirrored-self misidentification: Two cases of focal onset dementia. Neurocase 7, 239–254.

Colle, M., Hauw, J., Crespeau, F., Uchihara, T., Akiyama, H., Checler, F., Pageat, P., Duykaerts, C., 2000. Vascular and parenchymal Abeta deposition in the aging dog: Correlation with behavior. Neurobiology of Aging 21, 695–704.

Ellis, H.D., 1994. The role of the right hemisphere in the Capgras delusion. Psychopathology 27, 177–185.

Filali, M., Lalonde, R., Rivest, S., 2011. Anomalies in social behaviors and exploratory activities in an APPswe/PS1 mouse model of Alzheimer's disease. Physiology and Behavior 104, 880–885.

Forstl, H., Almeida, O.P., Owen, A.M., Burns, A., Howard, R., 1991. Psychiatric, neurological and medical aspects of misidentification syndromes: A review of 260 cases. Psychological Medicine 21, 905–910.

Gallup, G.G., 1968. Mirror-image stimulation. Psychological Bulletin 70, 782–793.

González-Martínez, A., Rosado, B., Pesini, P., Suárez, M., Santamarina, G., García-Belenguer, S., Villegas, A., Monleón, I., Sarasa, M., 2011. Plasma beta-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease. Experimental Gerontology 46, 590–596.

Head, E., Callahan, H., Cummings, B.J., Cotman, C.W., Ruehl, W.W., Muggenberg, B.A., Milgram, N.W., 1997. Open field activity and human interaction as a function of age and breed in dogs. Physiology and Behavior 62, 963–971.

Head, E., Liu, J., Hagen, T.M., Muggenburg, B.A., Milgram, N.W., Ames, B.N., Cotman, C.W., 2002. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. Journal of Neurochemistry 82, 375–381.

Insua, D., Suárez, M., Santamarina, G., Sarasa, M., Pesini, P., 2010. Dogs with canine counterpart of Alzheimer's disease lose noradrenergic neurons. Neurobiology of Aging 3, 625–635.

Insua, D., Corredoira, A., González-Martínez, A., Suárez, M-.L., Santamarina, G., Sarasa, M., Pesini, P., 2012. Expression of p75NTR, a marker for basal forebrain cholinergic neurons, in young and aged dogs with or without cognitive dysfunction syndrome. Journal of Alzheimeŕs Disease 28, 291–296.

Landsberg, G.M., Deporter, T., Araujo, J.A., 2011. Clinical signs and management of anxiety, sleeplessness, and cognitive dysfunction in the senior pet. The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice 41, 565–590.

Lindsay, S.R., 2001. Handbook of Applied Dog Behavior and Training. Etiology and Assessment of Behavioral Problems, vol. 2. Iowa State University Press, Blackwell Publishing Professional.

Mendez, M.F., Martin, R.J., Smyth, K.A., Whitehouse, P.J., 1992. Disturbances of person identification in Alzheimer's disease. A retrospective study. The Journal of Nervous and Mental Disease 180, 94–96.

Plotnik, J.M., de Waal, F.B., Reiss, D., 2006. Self-recognition in an Asian elephant. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 103, 17053–17057.

Pongracz, P., Molnar, C., Miklosi, A., 2010. Barking in family dogs: An ethological approach. The Veterinary Journal 183, 141–147.

Pugliese, M., Geloso, M.C., Carrasco, J.L., Mascort, J., Michetti, F., Mahy, N., 2006. Canine cognitive deficit correlates with diffuse plaque maturation and S100beta (−) astrocytosis but not with insulin cerebrospinal fluid level. Acta Neuropathologica 111, 519–528.

Rofina, J.E., van Ederen, A.M., Toussaint, M.J., Secreve, M., van der Speak, A., van der Meer, I., Van Eerdenburg, F.J., Gruys, E., 2006. Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. Brain Research 1069, 216–226.

Rossado, B., González-Martínez, Á., Pesini, P., García-Belenguer, S., Palacio, J., Villegas, A., Suárez, M-.L., Santamarina, G., Sarasa, M., 2012. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs. Part 1: Locomotor and exploratory behaviour. The Veterinary Journal 194, 189–195.

Ruehl, W.W., Neilson, J., Hart, B., Head, E., Bruyette, D.S., Cummings, B.J., 1998. Therapeutic actions of L-deprenyl in dogs: A model of human brain aging. Advances in Pharmacology 42, 316–319.

Silva, J.A., Leong, G.B., Wine, D.B., 1993. Misidentification delusions, facial misrecognition, and right brain injury. Canadian Journal of Psychiatry 38, 239–241.

Siwak, C.T., Tapp, P.D., Milgram, N.W., 2001. Effect of age and level of cognitive function on spontaneous and exploratory behaviors in the beagle dog. Learning and Memory 8, 317–325.

Shinosaki, K., Nishikawa, T., Takeda, M., 2000. Neurobiological basis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer type. Psychiatry and Clinical Neurosciences 54, 611–620.

Tapp, D., Siwak, C.T., 2006. The canine model of human brain aging: Cognition, behavior, and neuropathology. In: Conn, PM. (Ed.), Handbook of Models of Human Aging. Elsevier Inc., Burlington, MA, pp. 415–434.

Tuber, D.S., Sanders, S., Hennessy, M.B., Miller, J.A., 1996. Behavioral and glucocorticoid responses of adult domestic dogs (*Canis familiaris*) to companionship and social separation. Journal of Comparative Psychology 110, 103–108.

van den Berg, L., Schilder, M.B., de Vries, H., Leegwater, P.A., van Oost, B.A., 2006. Phenotyping of aggressive behavior in golden retriever dogs with a questionnaire. Behavior Genetics 36, 882–902.

Yin, S., McCowan, B., 2004. Barking in domestic dogs: Context specificity and individual identification. Animal Behaviour 68, 343–355.

4

Effect of age and severity of cognitive dysfunction on two simple cognitive tasks in pet dogs.

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA

The Veterinary Journal 198 (2013) 176–181

Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: www.elsevier.com/locate/tvjl

Effect of age and severity of cognitive dysfunction on two simple tasks in pet dogs

Á. González-Martínez [a,1], B. Rosado [b,*,1], P. Pesini [c], S. García-Belenguer [b], J. Palacio [b], A. Villegas [b], M.-L. Suárez [a], G. Santamarina [a], M. Sarasa [c]

[a] Departamento de Ciencias Clínicas Veterinarias, Facultad de Veterinaria de Lugo, Universidad de Santiago de Compostela, 27002 Lugo, Spain
[b] Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, 50013 Zaragoza, Spain
[c] Araclon Biotech Ltd. Zaragoza, 50012 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Accepted 5 July 2013

Keywords:
Dog
Aging
Cognitive dysfunction
Memory
Learning

ABSTRACT

Dogs exhibit age-dependent losses in learning and memory as well as a progressive accumulation of neuropathology that parallels that observed in normal human aging and early Alzheimer's disease. These deficits have been extensively studied using a number of standard cognitive tasks in the laboratory; however, appropriate tools for their assessment in veterinary clinics are still lacking. The aim of this study was to evaluate the effect of age and the severity of cognitive dysfunction syndrome (CDS) on two simple tests conducted in a clinical setting. A food searching (FS) task and a problem-solving (PS) task were administered to young (1–4 years, $n = 9$), middle-aged (5–8 years, $n = 10$), cognitively unimpaired aged ($\geqslant$9 years, $n = 31$), and cognitively impaired aged ($\geqslant$9 years, $n = 37$) dogs. Cognitive status was classified using an owner-based questionnaire, and in the impaired group, dogs were categorized as having either mild or severe CDS.

During the FS task, younger dogs (<9 years) were able to locate the food more quickly and with more success than the aged groups ($\geqslant$9 years). Dogs with severe CDS exhibited poorer performance than those with mild CDS or their healthy counterparts. In the PS task, younger dogs performed better than the aged dogs in obtaining food, but there were no differences related to CDS severity. The FS task might help to better characterize cognitively affected dogs in the clinical setting than the PS task. These and similar tasks require further investigations in the field.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Age-related cognitive deficits in learning and memory have been extensively studied in a systematic and controlled manner in laboratory Beagles using a number of standard cognitive tasks (Adams et al., 2000; Tapp and Siwak, 2006). Aging Beagles have been categorized on the basis of neuropsychological test performance, and these categories have been proposed to model subgroups of aging humans, including those with normal aging, mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease (AD; Adams et al., 2000; Cotman and Head, 2008).

Cognitive decline in aged canines could have links to several types of progressive accumulation of neuropathology that also parallels that observed in normal human aging and dementia. For instance, there is evidence of β-amyloid (Aβ) deposits and amyloid angiopathy in the brains of aged dogs (Uchida et al., 1992; Borràs et al., 1999). Interestingly, we have recently found changes in plasma Aβ levels during pathological aging in companion dogs that exhibit patterns similar to those previously reported for human mild cognitive impairment and AD (González-Martínez et al., 2011). Other features of AD, such as neurodegeneration and oxidative damage, have also been reported in aged dogs (Colle et al., 2000; Head et al., 2002; Pugliese et al., 2006; Rofina et al., 2006; Bernedo et al., 2009; Insua et al., 2010).

Clinically, age-related cognitive decline in pets is referred to as cognitive dysfunction syndrome (CDS) and could affect more than 22% of the canine geriatric population (Neilson et al., 2001; Azkona et al., 2009). This syndrome includes a number of behavioural signs such as changes in the sleep–wake cycle, decreased social interaction, loss of prior housetraining, disorientation and changes in the level of activity (Ruehl and Hart, 1998; Landsberg et al., 2003). To determine whether a dog might be showing CDS signs, veterinarians must rely almost entirely on owner-reported history (Landsberg and Araujo, 2005). The abovementioned neuropsychological tests are labour intensive, requiring previous training for the dog and the tester, and are therefore nearly impossible to perform

* Corresponding author. Tel.: +34 87655 4108.
E-mail address: belen@unizar.es (B. Rosado).
[1] These authors contributed equally to the work.

1090-0233/$ - see front matter © 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.07.004

outside a laboratory setting. Although owner-based observational questionnaires are very useful for checking behavioural deficits, the need for more objective diagnostic procedures in clinical settings has been stressed in the veterinary literature (Head et al., 2008; Salvin et al., 2011a).

The aim of the present study was to assess the effect of age and the severity of cognitive dysfunction on two simple tasks administered in a clinical setting in pet dogs. We hypothesized that test performance would be related to both age and the severity of cognitive dysfunction.

Materials and methods

Animals

Two veterinary teaching hospitals (Universidad de Zaragoza and Universidad de Santiago de Compostela) contributed to the recruitment of cases used in the study. Dogs were small to medium-sized, living with their owners (i.e. pets) and had not been referred to behavioural consultants at the time of admission. Prior to inclusion in the study, all dogs were screened by a routine physical and neurological examination, complete blood count, serum biochemistry, thyroid hormone measurement and urinalysis when needed. Dogs with primary organ system failure (other than brain degeneration), hypothyroidism, untreated Cushing's syndrome and seriously affected mobility were excluded from the study. Dogs with severe loss of visual capacity were also excluded.

Eighty-seven dogs were enrolled in the study. These dogs had been previously tested in four 3-min spontaneous activity tests (Rosado et al., 2012a,b). Furthermore, a study documenting the plasma Aβ levels in this cohort of dogs has been recently published (González-Martínez et al., 2011). Cognitive status was based on a 'dysfunction score' obtained from an owner-based observational questionnaire (González-Martínez et al., 2011; Rosado et al., 2012a). The dogs were categorized as: (1) young (YG, 1–4 years, $n = 9$); (2) middle-aged (MA, 5–8 years, $n = 10$); (3) cognitively unimpaired aged (CU, $\geqslant 9$ years, $n = 31$); or (4) cognitively impaired aged (CI, $\geqslant 9$ years, $n = 37$). The last group was further subdivided into mild cognitively impaired (mCI, $n = 20$) and severe cognitively impaired (sCI, $n = 17$). The abbreviation YM was used to refer jointly to YG and MA individuals.

Distribution of breeds within each group was as follows: American Cocker spaniel (YM $n = 1$), Beagle (YM $n = 1$), Bloodhound (mCI $n = 1$), Bobtail (sCI $n = 1$), Border collie (YM $n = 1$), Boston terrier (YM $n = 1$), Dalmatian (CU $n = 1$), English bulldog (YM $n = 1$, sCI $n = 1$), English setter (mCI $n = 1$), English Cocker spaniel (YM $n = 1$, CU $n = 3$, mCI $n = 3$, sCI $n = 3$), Chihuahua (CU $n = 1$, sCI $n = 1$), Fox terrier (sCI $n = 1$), French bulldog (YM $n = 2$), German Shepherd (mCI $n = 1$), Labrador retriever (sCI $n = 1$), mixed breed (small-medium; YM $n = 8$, CU $n = 13$, mCI $n = 8$, sCI $n = 2$), Pomeranian (YM $n = 1$), Poodle (sCI $n = 1$), Samoyed (CU $n = 1$, sCI $n = 1$), Scottish terrier (mCI $n = 1$), Schnauzer (CU $n = 2$, mCI $n = 2$), Shih-Tzu (sCI $n = 1$), Siberian Husky (CU $n = 2$), Spaniel Breton (sCI $n = 1$), Spitz (CU $n = 4$), Teckel (CU $n = 1$), West Highland white terrier (YM $n = 3$, CU $n = 1$, sCI $n = 1$), and Yorkshire terrier (CU $n = 4$, sCI $n = 2$).

Dogs were treated according to European and Spanish legislation on animal protection (Directive 86/609/EEC, Real Decreto 1201/2005) and the Ethical Committees of both participating universities approved the experiments and procedures.

Test procedures

Tests were carried out at each of the veterinary teaching hospitals in a room measuring approximately 6.5 × 4.5 m. Both testing rooms contained furniture that did not hinder the movement of the dogs. The same person at each university conducted both tests. Dogs were tested after a fasting period of 10 h. The design of these tests was based on previously published tests, although these were not peer-reviewed or validated (Coren, 1994). A description of testing procedures is below.

Food searching (FS) task

The aim of this task was to test the dog's ability to search and locate food. The owner was instructed to have the dog sit in the centre of the room while on a leash. The tester was placed in front of the dog (approximately 60 cm away from the dog), and the tester showed the dog three small cube-like pieces of food (ham). The tester moved backward, shaking the hand containing the food while communicating and maintaining visual contact with the dog, and placed the food in a corner of the room. Once there, the tester stared and pointed at the food for a few seconds (2–3 s) to increase the visual processing time for the dog. Then, the owner was asked to leave the room with the dog on a leash and to wait outside for 15 s. Afterward, they returned to the room, and the dog was placed without a leash in the centre of the room, allowing him/her to freely explore the room for 1 min. Neither verbal cues nor gestures (e.g. pointing), that could give the dog clues to the location of food, were intentionally displayed by the owner or the tester. In addition, once in the centre of the room, the dog was positioned sitting with his/her back to the owner and the tester, to minimize the possible influence of human cues.

The previous procedure was conducted a maximum of three times. When a dog successfully completed one trial (i.e. found the food), the test was concluded. Otherwise the test was repeated. In each trial, the behaviour of the dog was classified and scored as follows: the dog goes directly towards the food (1 point); the dog searches for the food and finds it within a maximum of 1 min (2 points); the dog searches for the food but does not find it within a maximum of 1 min (3 points); the dog does not make any attempt to search for the food (4 points). The FS total score was the sum of the points obtained during the trials and ranged from 1 to 12 points.

Problem-solving (PS) task

The aim of this test was to assess the ability of a dog to obtain food by manipulating an object. The tester showed the dog three pieces of food (ham) and allowed the dog to sniff and lick the hand that held the food. Then, the food was placed on the floor and covered with a transparent plastic box that had been turned upside down. The dog was given 2 min to remove the box so the food could be eaten. During the task, the owner was urged to encourage the dog to search for the food and to point to the box.

The test was performed only once, and the behaviour of the dog was classified and scored as follows: the dog tries to get the food and obtains it within a maximum of 2 min (1 point); the dog tries to get the food but does not obtain it within a maximum of 2 min (2 points); the dog sniffs the box but does not try to get the food (3 points); and the dog does not make any attempt to get the food (4 points).

Statistical analysis

Distribution of qualitative variables was assessed by Chi-square test or Fisher's exact test when the expected frequencies were $\leqslant 5$, respectively. Average differences in the FS total score (quantitative variable) were assessed by the Mann–Whitney U test. Correlations were calculated using Spearman's rank correlation test. Calculations were performed using the statistical program SPSS 17.0 for Windows (SPSS, Inc.). $P < 0.05$ denoted statistical significance.

Results

There were no significant differences for any of the studied variables when the YG and MA groups were compared; therefore they were analysed jointly. Table 1 presents signalment information for each group at baseline. No significant differences were found for sex, reproductive status, bodyweight or body condition score among groups. Aged groups (CU and CI) did not differ significantly in age.

The task score results for the YM, CU and CI groups and for the aged groups (CU, mCI, sCI) are summarized in Figs. 1–6. A description of main features for each test follows below.

Food searching task

In this test, YM differed from dogs classified as CU and CI in all of the studied variables ($P < 0.01$). During the first trial, whereas all the dogs classified as YM ($n = 19$) searched for the dropped food, approximately 23% of the dogs classified as CU ($n = 7$) and approximately 49% of the dogs classified as CI ($n = 18$) did not make any attempt to search for the dropped food. Furthermore, all but one dog classified as YM ($n = 18$, approximately 95%) found the food during the first trial, whereas 65% of dogs classified as CU ($n = 20$) and 44% of dogs classified as CI ($n = 16$) found the food. Interestingly, most dogs classified as YM ($n = 16$, 84%) went directly towards the corner where the food was located once they were taken off of their leash, whereas this occurred in 32% of the dogs classified as CU ($n = 10$) and 22% of the dogs classified as CI ($n = 8$).

The CU and CI groups did not perform as well in this test as the younger dogs. This difference was reflected in the FS total score, which was significantly higher in the CU (4.29 ± 4.25) and the CI (6.61 ± 5.01) groups than in the YM group (1.32 ± 0.95; $P < 0.0001$). In general, the CI group displayed a poorer performance than the CU group. However, significant differences were

Table 1
Signalment and body size data in the studied canine population.

Group	Males (%)	Females (%)	Neutered (%)	Age (months; mean ± SD)	Bodyweight (kg; mean ± SD)	Body condition (1–5/5; mean ± SD)[A]
YM (n = 19)	42.1	57.9	36.8	58.5 ± 31.6	12.3 ± 8.4	3.2 ± 0.4
CU (n = 31)	48.4	51.6	41.9	146.4 ± 35.2	12.2 ± 7.7	3.5 ± 0.8
mCI (n = 20)	55.0	45.0	45.0	148.7 ± 26.8	15.4 ± 9.4	3.6 ± 0.7
sCI (n = 17)	64.7	35.3	41.2	157.24 ± 23.6	13.9 ± 9.4	3.2 ± 0.4
P		0.57[a]	0.98[a]	0.19[b]	0.58[c]	0.15[a]

YM, young and middle-aged; CU, cognitively unimpaired aged; mCI, mild cognitive impairment; sCI, severe cognitive impairment.
[A] Body condition scale (1–5) – 1, too thin; 2, thin; 3, ideal; 4, heavy; 5, too heavy.
[a] No significant difference among groups (Chi-square test).
[b] No significant difference between CU, mCI and sCI groups (Kruskal–Wallis test).
[c] No significant difference among groups (Kruskal–Wallis test).

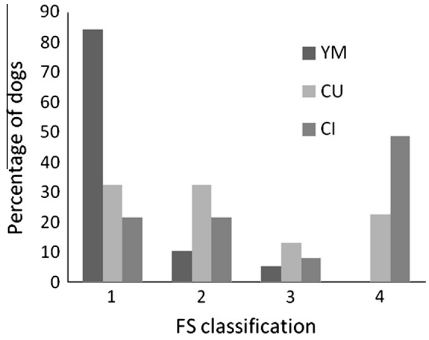


Fig. 1. Distribution (%) of dogs in the food searching (FS) task classification (first trial). YM, young and middle-aged; CU, cognitively unimpaired aged; CI, cognitively impaired aged.

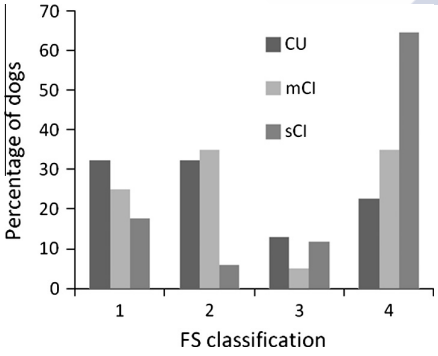


Fig. 2. Distribution (%) of aged dogs in the food searching (FS) task classification (first trial). CU, cognitively unimpaired; mCI, mild cognitive impairment; sCI, severe cognitive impairment.

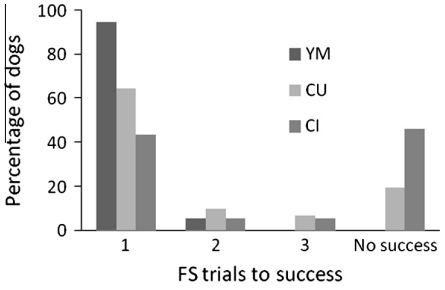


Fig. 3. Distribution (%) of dogs in the number of trials to success (finding the food) during the food searching (FS) task. YM, young and middle-aged; CU, cognitively unimpaired aged; CI, cognitively impaired aged.

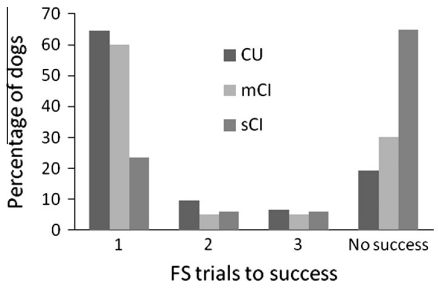


Fig. 4. Distribution (%) of aged dogs for number of trials to success during the food searching (FS) task. CU, cognitively unimpaired; mCI, mild cognitive impairment; sCI, severe cognitive impairment.

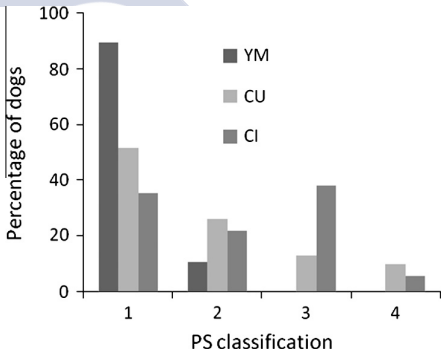


Fig. 5. Distribution (%) of dogs in the problem solving (PS) task classification. YM, young and middle-aged; CU, cognitively unimpaired aged; CI, cognitively impaired aged.

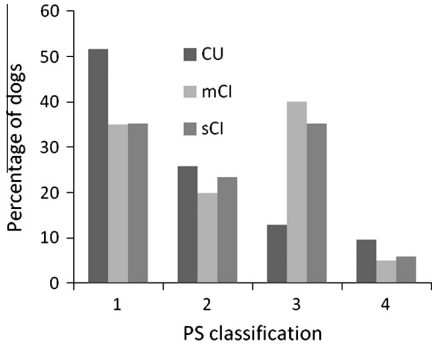


Fig. 6. Distribution (%) of aged dogs in the problem solving (PS) task classification. CU, cognitively unimpaired; mCI, mild cognitive impairment; sCI, severe cognitive impairment.

only found between the dogs classified as sCI and those classified as CU ($P < 0.05$), while there were no significant differences between the CU and mCI groups for any tested variable. In particular, during the first trial, almost two-thirds of dogs classified as sCI ($n = 11$, approximately 65%) did not attempt to search for the food. Only seven dogs classified as sCI (41%) searched for the food across the three trials and only six dogs (35%) finally found it. This result contrasts with the rest of the aged dogs, where 70% of the dogs classified as mCI ($n = 14$) and 81% of the dogs classified as CU ($n = 25$) successfully completed the test (i.e. found the food). The FS total score was significantly higher in dogs classified as sCI (8.65 ± 4.65) than in those classified as CU (4.29 ± 4.25; $P < 0.001$) or mCI (4.95 ± 4.77; $P < 0.05$).

The FS total score showed a significant correlation with the total number of items affected in the questionnaire ($r = 0.443$; $P < 0.001$) and the dysfunction score ($r = 0.427$; $P < 0.001$) obtained from the questionnaire across all dogs. Figs. 7 and 8 present scatter plots for these correlations. In the aged groups, only a weak correlation was found between the FS score and the ratio Aβ42/40 ($r = -0.25$; $P < 0.05$).

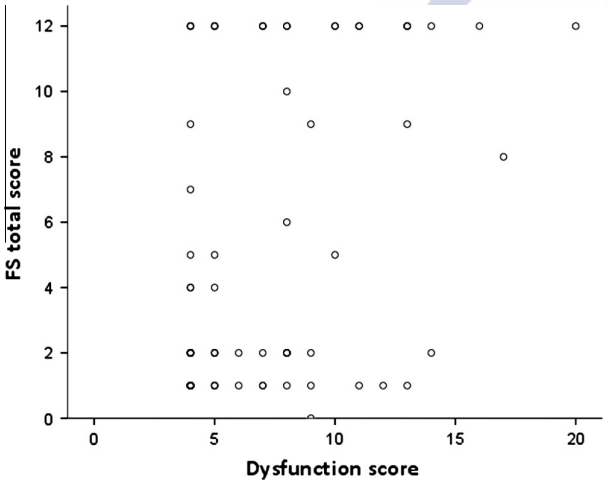


Fig. 7. Scatter plot of the correlation between the food searching (FS) total score and the dysfunction score.

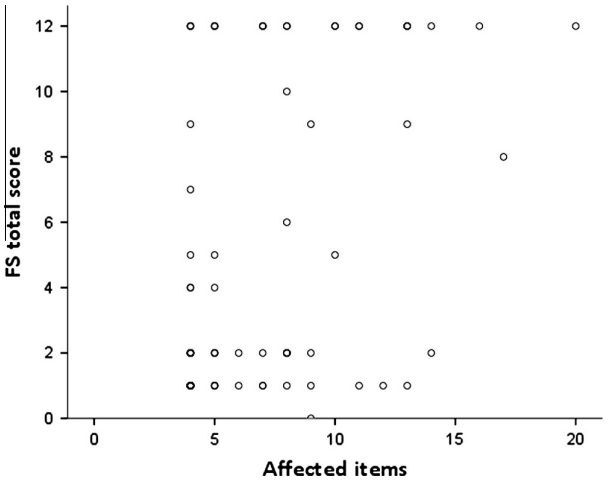


Fig. 8. Scatter plot of correlation between the food searching (FS) total score and the total number of items affected in the questionnaire.

Problem-solving task

During this test, dogs classified as YM differed from those classified as CU and CI in all of the studied variables ($P < 0.01$). All of the dogs classified as YM searched for the food by manipulating the box and most of them ($n = 17$, 89%) finally obtained it within a 2 min period. In contrast, just over half ($n = 16$, approximately 52%) of dogs classified as CU were able to locate the food within a 2 min period. These differences were even larger when compared to the CI group, where only 35% of dogs found the food (mCI $n = 7$; sCI $n = 6$). There were no differences among the aged groups for any of the studied variables.

Discussion

In this study, we tested 87 pet dogs, varying in age and cognitive status, using two simple tasks. Cognitive status was classified using an owner-based questionnaire, after other potential medical causes were ruled out. The questionnaire we used was not validated, but its scores have been shown to correlate with plasma Aß42 levels and Aß42/40 ratio values in unimpaired and mildly-impaired aged dogs (González-Martínez et al., 2011). Consistent behavioural profiles in spontaneous activity were also reported in the same cohort of dogs using the classification presented in this questionnaire (Rosado et al., 2012a,b).

It is important to stress that the two tests performed in our study were conducted in a clinical setting, in contrast with previously published laboratory studies of cognitive testing in Beagle dogs. The laboratory studies have shown age-related impairments in specific learning and memory measures, as well as in visuospatial and executive functions, through a number of standard cognitive tasks, which were systematically performed in a testing box (Adams et al., 2000; Tapp and Siwak, 2006; Cotman and Head, 2008). Considering the methodological differences in assessing cognitive function, caution should be exercised in any comparisons of our results with those previously obtained in laboratory settings.

The first test we administered was a FS task used to measure the ability of dogs to remember the location of food placed in a corner of a room for a short time (approximately 15 s) across a maximum of three trials. We found clear age-related differences in the FS task performance, with younger dogs (<9 years) performing better than aged dogs (⩾9 years) in speed and success in locating the food after a short delay outside the room. Thus, all younger dogs found the food across trials (all but one during the first trial), and in most cases, this goal was attained by directly heading towards the corner where the food was placed. However, the higher FS scores in the aged groups indicate that this ability is compromised in the aged dogs, especially in those showing CDS signs. In particular, the dogs classified as sCI achieved the highest FS scores, reflecting the great difficulty that the cognitively affected dogs experienced in finding the food.

Our results suggest that retention of spatial information about the food location (i.e. spatial episodic memory) was affected by age and cognitive status in the studied dogs. However, the FS task was not previously tested without the 15 s delay and, therefore, we cannot be sure that dogs displayed the same behaviour without the delay. Considering this, it is possible that the difficulty that aged dogs seemed to experience during the FS task in finding dropped food was a consequence of a more general age-related effect. Studies conducted in kennel-reared Beagles have shown that deterioration in spatial ability occurs early in the aging process, between 6 and 7 years of age. Impairments in spatial ability are also a common feature of human aging and are more severe in neurodegenerative disorders (Tapp and Siwak, 2006; Cotman and Head, 2008). However, cognitive decline in pet dogs might not become clinically

apparent until the age of 11 years or older (Landsberg and Araujo, 2005). Nevertheless, the FS task administered in this study was able to demonstrate differences between younger dogs and those clinically categorized as 'successful agers' (i.e. cognitively unimpaired older dogs, according to an owner-based observational questionnaire). Notably, according to a recent study of senior dogs, 'difficulty in finding dropped food' could be a common behavioural change that accompanies 'successful aging' (Salvin et al., 2011b).

We have shown that a simple food searching task was able to differentiate dogs with differing CDS severity. The results of this task, besides complementing data obtained from the owner-based questionnaire, could help to characterize the severity of canine CDS in aged pets. Unfortunately, this test was not sensitive enough to differentiate between dogs aging successfully and those with mild CDS, although more sophisticated spatial learning and memory tests can do this in a laboratory setting (Tapp and Siwak, 2006; Cotman and Head, 2008). It is also possible that the absence of statistically significant differences between the groups of aged dogs in our study related to the small group sizes.

The second test we administered was a PS task in which each dog manipulated (with the mouth or paws) a box covering pieces of food dropped on the floor. It is possible that the PS task could reflect prior procedural learning ability (i.e. the process of acquisition of sensorimotor and perceptual skills) in obtaining food by manipulating objects. Performance on procedural learning tasks in Beagle dogs is profoundly affected by previous life experiences, which suggests a complex relationship between age and this type of learning (Tapp and Siwak, 2006; Cotman and Head, 2008). In our study, all dogs were raised as pets, and they were therefore all expected to have had varied life experiences, including those that involved manipulating objects. We found that the PS task was age-sensitive, with younger dogs performing better than the aged groups. Almost 90% of the younger dogs obtained the food within a 2 min period, while only about half of the unimpaired aged and one third of the impaired aged dogs were able to do the same.

The poorer performance of aged dogs might be due to a reduced interest in exploring novel objects. Interestingly, our group recently reported an age-dependent decline in curiosity in the same cohort of dogs when using non-cognitive testing procedures (Rosado et al., 2012a). However, we did not find any significant difference among the aged groups on PS performance according to severity of CDS. Similarly, a number of studies have found intact procedural motor-learning capacities in AD patients, although their overall performance levels for reaction and movement time never reached those of healthy controls (van Halteren-van Tilborg et al., 2007).

All dogs were medically assessed and the questionnaire included questions related to sensory and physical impairment so that severely affected dogs could be excluded from our study (González-Martínez et al., 2011). However, we cannot rule out that some differences during the performance of both tasks among the aged dogs were related to mild sensory impairments. In addition, a simple lack of motivation related to the food provided could also have affected the responses in aged dogs.

Conclusions

This study demonstrated that a simple food searching task performed in a clinical setting was sensitive to age and the severity of cognitive dysfunction in dogs. Younger dogs (<9 years) were faster and more successful in locating food than the aged groups (>9 years). In particular, dogs exhibiting severe CDS displayed the poorest performance compared with those with mild CDS or their healthy counterparts. Moreover, this work also showed an age-related effect on test performance in a problem-solving task, as younger dogs were more able to obtain the food. There was not a similar effect related to severity of cognitive dysfunction. The results of this study have the potential to assist in the development of new tools for CDS diagnosis in veterinary medicine, although these or similar tasks require further investigation under field conditions. Since canine CDS is a model of AD, further interest in such studies is possible.

Conflict of interest statement

PP and MS are employees at Araclon Biotech Ltd. B.R. and A.G.-M. are supported by grants from Araclon Biotech to the Universidad de Zaragoza and Universidad de Santiago de Compostela, respectively. None of the other authors has a financial or personal relationship with other people or organisations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

Acknowledgements

This work has been partially financed by the Spanish CDTI and ENISA.

References

Adams, B., Chan, A., Callahan, H., Milgram, N.W., 2000. The canine as a model of human cognitive aging: Recent developments. Progress in Neuro-psychopharmacology and Biological Psychiatry 24, 675–692.

Azkona, G., García-Belenguer, S., Chacón, G., Rosado, B., León, M., Palacio, J., 2009. Prevalence and risk factors of behavioural changes associated with age-related cognitive impairment in geriatric dogs. Journal of Small Animal Practice 50, 87–91.

Bernedo, V., Insua, D., Suárez, M.L., Santamarina, G., Sarasa, M., Pesini, P., 2009. Beta-amyloid cortical deposits are accompanied by the loss of serotonergic neurons in the dog. Journal of Comparative Neurology 513, 417–429.

Borràs, D., Ferrer, I., Pumarola, M., 1999. Age-related changes in the brain of the dog. Veterinary Pathology 36, 202–211.

Colle, M., Hauw, J., Crespeau, F., Uchihara, T., Akiyama, H., Checler, F., Pageat, P., Duykaerts, C., 2000. Vascular and parenchymal Abeta deposition in the aging dog: Correlation with behavior. Neurobiology of Aging 21, 695–704.

Coren, S., 1994. The Intelligence of Dogs. Bantam Book, Broadway, New York, http://www.hankybean.ca/Files/HankyBean_CANINE_IQ_TEST.pdf (accessed 1 July 2013).

Cotman, C.W., Head, E., 2008. The canine (dog) model of human aging and disease: Dietary, environmental and immunotherapy approaches. Journal of Alzheimers Disease 15, 685–707.

González-Martínez, A., Rosado, B., Pesini, P., Suárez, M., Santamarina, G., García-Belenguer, S., Villegas, A., Monleón, I., Sarasa, M., 2011. Plasma beta-amyloid peptides in canine aging and cognitive dysfunction as a model of Alzheimer's disease. Experimental Gerontology 46, 590–596.

Head, E., Liu, J., Hagen, T.M., Muggenburg, B.A., Milgram, N.W., Ames, B.N., Cotman, C.W., 2002. Oxidative damage increases with age in a canine model of human brain aging. Journal of Neurochemistry 82, 375–381.

Head, E., Rofina, J., Zicker, S., 2008. Oxidative stress, aging and CNS disease in the canine model of human brain aging. The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice 38, 167–178.

Insua, D., Suárez, M., Santamarina, G., Sarasa, M., Pesini, P., 2010. Dogs with canine counterpart of Alzheimer's disease lose noradrenergic neurons. Neurobiology of Aging 3, 625–635.

Landsberg, G.M., Hunthausen, W., Ackerman, L., 2003. The effects of aging on the behavior of senior pets. In: Handbook of Behavior Problems of the Dog and Cat, Second Ed. WB Saunders, London, UK, pp. 269–304.

Landsberg, G., Araujo, J.A., 2005. Behavior problems in geriatric pets. Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice 35, 675–698.

Neilson, J.C., Hart, B.L., Cliff, K.D., Ruehl, W.W., 2001. Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 218, 1787–1791.

Pugliese, M., Geloso, M.C., Carrasco, J.L., Mascort, J., Michetti, F., Mahy, N., 2006. Canine cognitive deficit correlates with diffuse plaque maturation and S100beta (−) astrocytosis but not with insulin cerebrospinal fluid level. Acta Neuropathologica 111, 519–528.

Rofina, J.E., van Ederen, A.M., Toussaint, M.J., Secreve, M., van der Speak, A., van der Meer, I., Van Eerdenburg, F.J., Gruys, E., 2006. Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. Brain Research 1069, 216–226.

Rosado, B., González-Martínez, A., Pesini, P., García-Belenguer, S., Palacio, J., Villegas, A., Suárez, M.-L., Santamarina, G., Sarasa, M., 2012a. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs – Part 1: Locomotor and exploratory behaviour. The Veterinary Journal 194, 189–195.

Rosado, B., González-Martínez, A., Pesini, P., García-Belenguer, S., Palacio, J., Villegas, A., Suárez, M.-L., Santamarina, G., Sarasa, M., 2012b. Effect of age and severity of cognitive dysfunction on spontaneous activity in pet dogs – Part 2: Social responsiveness. The Veterinary Journal 194, 196–201.

Ruehl, W., Hart, B.L., 1998. Canine cognitive dysfunction. In: Dodman, N.H., Schuster, L. (Eds.), Psychopharmacology of animal behaviour disorders. Blackwell Science, Malden, 283–304.

Salvin, H.E., McGreevy, P.D., Sachdev, P.S., Valenzuela, M.J., 2011a. The canine sand maze: An appetitive spatial memory paradigm sensitive to age-related change in dogs. Journal of the Experimental Analysis of Behavior 95, 109–118.

Salvin, H.E., McGreevy, P.D., Sachdev, P.S., Valenzuela, M.J., 2011b. The canine cognitive dysfunction rating scale (CCDR): A data-driven and ecologically relevant assessment tool. The Veterinary Journal 188, 331–336.

Tapp, D., Siwak, C.T., 2006. The canine model of human brain aging: Cognition, behavior, and neuropathology. In: Conn, P.M. (Ed.), Handbook of Models of Human Aging. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, USA, pp. 415–434.

Uchida, K., Nakayama, H., Tateyama, S., Goto, N., 1992. Immunohistochemical analysis of constituents of senile plaques and cerebro-vascular amyloid in aged dogs. Journal of Veterinary Medicine Science 54, 1023–1029.

van Halteren-van Tilborg, I.A., Scherder, E.J., Hulstijn, W., 2007. Motor-skill learning in Alzheimer's disease: A review with an eye to the clinical practice. Neuropsychology Review 17, 203–212.

USC UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

USC
UNIVERSIDADE
DE SANTIAGO
DE COMPOSTELA