

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

DISSERTAÇÃO

Efeitos da Acupuntura na Disfunção Cognitiva Canina

Manoella Tuppan Da Rocha Lima

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)**

EFEITOS DA ACUPUNTURA NA DISFUNÇÃO COGNITIVA CANINA

MANOELLA TUPPAN DA ROCHA LIMA

Sob a Orientação da Professora
Magda Alves de Medeiros

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), Área de Concentração em Ciências Clínicas.

Seropédica, RJ
Agosto 2018

L732e Lima, Manoella Tuppan da Rocha, 1982-
Efeitos da Acupuntura na Disfunção Cognitiva Canina
/ Manoella Tuppan da Rocha Lima. - 2018.
57 f.

Orientadora: Magda Alves de Medeiros.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Medicina Veterinária, 2018.

1. Disfunção Cognitiva Canina. 2. Acupuntura. 3.
Colinesterases. I. Medeiros, Magda Alves de , 1973-
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro. Programa de Pós Graduação em Medicina
Veterinária III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA
(PATOLOGIA E CIÊNCIAS CLÍNICAS)

MANOELLA TUPPAN DA ROCHA LIMA

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**, no Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária (Patologia e Ciências Clínicas), área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 20/08/2018

Magda Alves de Medeiros (Ph. D) UFRRJ
(orientadora)

Alexandre Dos Santos Rodrigues (Ph. D) UFF

Marta Fernanda Albuquerque da Silva (Ph. D) UFRRJ

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação a todos os meus pacientes e a meus filhos Sushi, Shiguelinho e Marrie por fazerem meus dias mais felizes.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por me permitir essa realização, por ter me dado a vida, por me permitir acordar todos os dias, por estar comigo em todas as horas, por ser força nas minhas fraquezas e por cuidar de mim com seu imenso amor.

Agradeço a minha mãe, minha eterna amiga, incentivadora, que me deu muito amor enquanto estive nesse plano e que todos os dias me enche de saudades e de certeza de que um dia estaremos juntas novamente. Agradeço a meu pai por ter bastante orgulho de mim, por ser meu grande amigo, por me dar os melhores conselhos, por ser meu pai querido do coração e por fazer questão de patrocinar meus estudos.

Agradeço a meu irmão por seu amor, por me ouvir nas horas que preciso de um ombro amigo, por sempre me lembrar do que sou capaz e por me enxergar melhor do que me vejo. A ele também agradeço por ter me permitido ser tia e amar incondicionalmente o nosso César Augusto e por de tabela ainda me trazer uma grande amiga e incentivadora, minha cunhada Valéria.

Agradeço a toda a minha família Tuppan e Rocha Lima: meus avós, minhas tias, meus tios, meus primos e aos pets da família, meus primeiros pacientes.

Agradeço a minha avó Nilza por ter me ensinado o amor aos animais quando eu nem podia entender a magnitude disso. Agradeço ao vovô Tuppan por sempre me receber com um abraço e por dizer as mesmas palavras sempre: Nunu está sumida. Como está lá na Agronomia, tem “capado” muito gato? Você não vai trabalhar hoje não, né?

Agradeço a minha tia Rejane por ser minha amiga e por segurar minha mão, sempre me encorajando a seguir em frente. Agradeço a meu primo Calebe por dividir sua mãe comigo.

Agradeço a minha tia Zanza pelos conselhos e preocupação. Agradeço a minha prima Marcelle pelos melhores abraços.

Agradeço a minha tia Lilia por ser uma mãe querida e incentivadora. Agradeço a minha prima Fernanda por me olhar com imenso orgulho e por ter me dado de presente meu afilhado Arthur que enche meu coração de alegria a cada dia, assim como ter trazido o Renato para ser um Rocha Lima, orgulho da Rural, e também um grande incentivador.

Agradeço ao Liminha, meu primeiro cachorro, à Sula e ao Romário que já estão no céu, à Maguéia, ao Sushi, ao Shiguellino e à Marrie por me permitirem entender o que é conviver com cães e gatos diariamente e com isso me tornar uma veterinária melhor. Agradeço também a todos os cães, gatos, cavalos, cabras, coelhos, galinhas, galos e pintinhos que passaram pelo sítio de minha família, alguns nem nome tiveram, mas foram de uma importância imensa na minha educação e formação como pessoa, no sentido de aprender a amar e respeitar os animais e com certeza contribuíram para plantar a sementinha da Veterinária em mim. E nessa escola de amor aos animais destaco minha mãe, meu pai, minha avó Nilza, meu avô Silvio e vô Percílio.

Agradeço aos meus amigos veterinários que indicaram seus clientes para participarem do experimento: Flávio Ricardo, Thalita Baptista, Renaldo Nobrega, Márcia Paraski. Estes também disponibilizaram seus consultórios para que eu pudesse atender os animais se fosse necessário. Às funcionárias Sara e Patrícia do consultório Animanía de Nilópolis, de propriedade da grande amiga Márcia Paraski, por terem me ajudado nos experimentos. Agradeço também a amiga veterinária Viviane Garrido e toda equipe do laboratório Celv que me permitiram centrifugar algumas amostras.

Agradeço aos meus amigos e amigas, veterinários ou não que me ajudaram servindo como exemplo, ouvidos, ombros amigos, me enchendo de bons conselhos e incentivos. Priscila Pires, Erika Ramos Mello, Raquel Cristina, Maristela Groba, Geisy Leopoldo, Alexandre Lanchinho e Vivian Assunção. Agradeço também às amigas que fiz no

ambulatório de acupuntura: Carla, Júlia, Marimar, Ana Paula, Mariana, Tati, Carol, Amanda, que compartilharam conhecimento gratuitamente. Agradeço em especial a minha querida “dupla” de pesquisa, Soraya John que teve muita paciência comigo nesse período e muito me ajudou. Agradeço também ao Luiz que chegou no finalzinho pra que tudo desse certo.

Agradeço também a todos os tutores que se disponibilizaram a participar dessa pesquisa, assim como seus animais. Ver o resultado positivo e saber que ajudei de alguma forma a diminuir o incômodo da DCC foi muito gratificante.

Agradeço aos tutores dos meus pacientes semanais que foram bastante compreensivos quando precisei me ausentar para concluir o Mestrado. Agradeço também aos meus queridos pacientes que tornam o meu trabalho, motivo de grande alegria em minha vida. Posso dizer que ser veterinária, lidar com os animais, receber deles o carinho puro e sincero, faz dessa a melhor profissão.

Agradeço a todos os meus professores desde o maternal até a pós graduação.

Agradeço a minha orientadora, Magda, por ter me dado a oportunidade de ingressar nessa jornada e por ter me ensinado a trabalhar como veterinária acupunturista.

Agradeço também aos professores que aceitaram participar da Banca examinadora. Muito obrigada, professora Marta e professor Alexandre.

Essa foi uma jornada de muitos altos e baixos, foi muito prazerosa em alguns momentos, mas extremamente difícil em outros. Entrar para o Mestrado era um objetivo antigo, significava a continuidade da Graduação, foi um sonho realizado. E por isso, mais uma vez: obrigada, Deus!!! Obrigada papai, mamãe e meu irmãozinho por sempre me olharem com olhos de orgulho e por sempre estarem ao meu lado em todas as situações. Amo vocês.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

LIMA, Manoella Tuppan da Rocha. **Efeitos da acupuntura na disfunção cognitiva canina**. 2018. **57f**. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

A disfunção cognitiva canina (DCC) consiste na alteração de comportamento e aprendizado relacionados ao envelhecimento patológico. Os sinais da DCC que normalmente aparecem a partir dos 8 anos de idade, são: desorientação, decréscimo ou mudanças na interação socioambiental, alterações no ciclo de sono-vigília, prejuízo no treinamento higiênico e nas demais atividades rotineiras, assim como aumento da ansiedade. O aumento da expectativa de vida dos cães e conseqüentemente a maior incidência da doença, fez com que novos métodos de diagnóstico clínicos e laboratoriais, assim como alternativas de tratamento fossem buscados. A presente dissertação propõe a acupuntura como tratamento para a DCC, tendo seu efeito avaliado pelos escores obtidos em questionários diagnósticos e a dosagem das enzimas butirilcolinesterase (BChE), colinesterases (ChE) e catalase. Caninos com 8 ou mais anos de idade com sintomas compatíveis à DCC e oriundos do Estado do Rio de Janeiro foram avaliados clinicamente e seus tutores responderam a dois questionários diagnósticos. Estes animais foram submetidos à coleta de sangue para dosagem das enzimas BChE, ChE, catalase e receberam tratamento por acupuntura nos pontos Yintang, VG20, PC6, B23, E36 e R3, durante dez minutos, uma vez por semana, durante quatro semanas. Novas coletas de sangue e a reavaliação dos questionários foram realizadas ao final do tratamento. Na análise dos questionários foi verificada redução significativa dos sinais clínicos da doença ($p=0,0001$ no questionário 1 e $p<0,0001$ no questionário 2). No entanto, não houve alteração significativa na atividade das enzimas estudadas antes e após o tratamento. A melhora clínica dos animais tratados torna válido o uso da acupuntura no tratamento da DCC.

Palavras-chave: Disfunção cognitiva canina. Acupuntura. Colinesterases

ABSTRACT

LIMA, Manoella Tuppan da Rocha. **Effects of acupuncture in canine cognitive dysfunction**. 2018. 57f. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Canine cognitive dysfunction (CCD) is a pathology that consists of changes in the behavior and learning related to pathological aging. CCD signals that usually appear from 8 years of age are: disorientation, decrease or changes in social-environmental interactions, changes in sleep-wake cycle, prejudice in toilet training and other routine activities, as well as increased anxiety. The increase in the life expectancy of dogs and consequently the highest incidence of the disease contributed for the search of new approaches to clinical and laboratory diagnosis as well as alternative treatments. This dissertation proposes acupuncture as a treatment for CCD, having its effect evaluated by scores obtained in diagnostic questionnaires and the dosage of enzymes butyrylcholinesterase (BChE), cholinesterases (ChE) and catalase. Canines with 8 or more years of age with symptoms that are compatible to the CCD from the State of Rio de Janeiro were evaluated clinically and their tutors answered two diagnostic questionnaires. These animals were submitted to blood collection for dosage of BChE, ChE and catalase enzymes and received treatment by acupuncture in these acupoints: Yintang, GV20, PC6, B23, S36 and K3 for 10 minutes once a week for four weeks. New blood collection and reapplication of the questionnaires were completed by the end of the treatment. In the analysis of the questionnaires, we found a significant reduction of the clinical signs of disease ($p = 0.0001$ in questionnaire 1 and $p < 0,0001$ in the questionnaire 2). However, there was no significant change in the activity of the enzymes studied before and after treatment. The clinical improvement of the treated animals makes possible the use of acupuncture as one important tool in the treatment of CCD.

Keywords: Canine cognitive dysfunction, Acupuncture, Cholinesterases.

LISTA DE ABREVIACOES

AChe	Acetilcolinesterase
B23	Ponto de acupuntura 23 da bexiga
BChE	Butirilcolinesterase
C7	Ponto de acupuntura 7 do coração
CEUA	Comitê de tica de Uso de Animais
CFMV	Conselho Federal de Medicina Veterinária
ChE	Colinesterases
Cun	Unidade de medida chinesa que corresponde a distância entre as pregas da articulação interfalngeanas do dedo médio do paciente
DA	Doença de Alzheimer
SNC	Sistema nervoso central
DCC	Disfunção cognitiva canina
DISHA	Desorientation, interaction changes, sleep/awake disturbances, house soiling and activity changes
E36	Ponto de acupuntura 36 do estômago
ECDCC	Escala de classificação da disfunção cognitiva canina
F3	Ponto de acupuntura 3 do figado
HVPA	Hospital Veterinário de pequenos animais
IG4	Ponto de acupuntura 4 do intestino delgado
IVAS	Sociedade internacional de acupuntura veterinária
MTC	Medicina tradicional chinesa
PC6	Ponto de acupuntura 6 do pericárdio
R3	Ponto de acupuntura 3 do rim
RM	Ressonância magnética
RMF	Ressonância magnética funcional
TC	Tomografia computadorizada
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
YT	Yintang ponto extra de acupuntura

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	2
2 REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 Disfunção cognitiva canina (DCC)- sinais clínicos e prevalência.	4
2.2 Envelhecimento canino, Alzheimer e DCC	4
2.3 Diagnóstico da DCC	5
2.3.1 Questionários de Rofina e Salvin	6
2.3.2 Enzimas e acupuntura	6
2.4 Tratamento da DCC	7
2.5 Acupuntura na DCC	8
3 MATERIAL E MÉTODOS	10
3.1 Divulgação	10
3.2 Local do experimento	10
3.3 Desenho Experimental	10
3.4 Questionário de avaliação do DCC	13
3.5.3 Coletas de sangue e conservação das amostras	16
3.6 Dosagens enzimáticas	16
3.7 Análise estatística	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 Animais recrutados	17
4.2 Atendimentos por acupuntura	17
4.3 Efeito da acupuntura nas escalas de DCC	18
4.4 Relação das enzimas e acupuntura	36
4.5 Medicamentos utilizados e resultados	37
5 CONCLUSÃO	39
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
7 ANEXO	43
ANEXO 1 - Folder De Divulgação Da Pesquisa	43
ANEXO - 2: Termo De Consentimento Livre E Esclarecido	44
ANEXO 3 - Ficha De Cadastro	45
ANEXO 4 - Ficha Comportamental	46
ANEXO 5 - Questionário 1	48
ANEXO 6 - Questionário 2	49

1 INTRODUÇÃO

A população de cães idosos é crescente no mundo, e a Disfunção Cognitiva Canina (DCC) é uma das principais alterações comportamentais relacionadas ao envelhecimento canino, com alta prevalência, chegando a 68% em cães de 15-16 anos. Os sinais clássicos estão resumidos na sigla em inglês DISHA (disorientation, interaction changes, sleep/wake disturbances, house soiling and activity changes), que se refere à desorientação, decréscimo ou mudanças na interação socioambiental, mudanças no ciclo de sono-vigília, prejuízo no treinamento higiênico e demais atividades rotineiras. Essa doença afeta tanto o bem-estar do animal quanto a rotina dos tutores, que passam a ter um animal mais dependente.

DCC apresenta semelhanças com a Doença de Alzheimer (DA) dos humanos, e dessa forma o cão é visto como modelo de estudo para essa doença.

Para diagnóstico clínico são utilizados questionários com listas de sinais clínicos da doença. O diagnóstico definitivo é possível, principalmente *post mortem*, através do exame histopatológico do tecido cerebral onde são observadas as placas senis no tecido nervoso; DCC também pode ser suposta pelo exame de tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM), nos quais será observada a diminuição do cérebro, mas as placas senis não podem ser visualizadas. É importante que se faça o exame de TC ou de RM para que seja descartada a hipótese de neoplasia em tecido cerebral, porque os sintomas podem ser semelhantes aos da DCC; são exames onerosos e obrigam a sedação do animal para que sejam realizados, e tratando-se de animais idosos, é comum que os mesmos não apresentem condições clínicas para tal procedimento, por esse motivo, a busca de marcadores hematológicos representa uma excelente ferramenta no diagnóstico. Na DA há estudos correlacionando a doença às atividades das enzimas catalase, acetilcolinesterase e butirilcolinesterase, a primeira possui ação antioxidante e as duas últimas são utilizadas para evidenciar o déficit colinérgico.

Não há cura para DCC, porém os sintomas podem ser amenizados e até mesmo retardados, quando existe o cuidado de preparar o animal para um envelhecimento saudável. Os tratamentos utilizados são à base de nutracêuticos com ação antioxidante, vasodilatadores cerebrais, usados com o objetivo de melhorar a oxigenação cerebral, medicamentos que buscam regularizar os níveis de dopamina, e medicamentos para regularizar o ciclo do sono. O manejo não farmacológico está pautado no enriquecimento ambiental com o estímulo de atividades físicas, brincadeiras e treinamentos cognitivos, adequados à idade que além de melhorarem a condição cognitiva do animal, ajudam a mantê-lo ativo durante o dia para propiciar uma melhor noite de sono.

Na DA a acupuntura é utilizada e os resultados apresentam benefícios comprovados. As agulhas inseridas na pele em pontos determinados promovem estimulação sensorial que ativa fibras nervosas aferentes que através da medula e do bulbo, mandam projeções a diversas estruturas encefálicas, acionando eventos neurofisiológicos que geram os resultados terapêuticos. Imagens de ressonância magnética funcional (RMF) comprovam a ativação de determinadas áreas cerebrais, como lobo temporal, giro do hipocampo, lobo posterior e anterior do cerebelo, claustrum e lobus insularis, durante tratamento proposto para DA. Tendo por base os benefícios que a acupuntura promove em pacientes com DA, é proposto nessa dissertação o tratamento por acupuntura nos caninos com sinais de DCC, utilizando-se os acupontos Yintang, VG 20, e bilateralmente, PC6, B23, E36, R3, durante dez minutos, uma vez por semana, durante quatro semanas.

A justificativa para a execução do trabalho está relacionada ao aumento de casos de DCC , que está relacionado ao aumento na expectativa de vida dos animais de companhia. Os tratamentos disponíveis ainda apresentam eficácia limitada. Há grandes semelhanças entre a DCC e a DA, por isso o cão é considerado o modelo animal dessa doença. A Acupuntura foi escolhida por se tratar de uma das terapias da Medicina Tradicional Chinesa (MTC) que visa o tratamento e a prevenção de distúrbios fisiológicos e comportamentais, e tem sido usada para o tratamento da DA com eficácia comprovada, podendo ser mais eficaz do que as drogas ou potencializando o efeito de medicamentos para a função cognitiva na DA. Neste sentido, acreditamos que a acupuntura possa ser uma ótima ferramenta no tratamento de pacientes com DCC.

Esta afecção não possui formas de diagnóstico laboratorial *in vivo*, somente *post mortem* pela presença das placas senis no tecido nervoso. Busca-se também a dosagem de biomarcadores sanguíneos para o diagnóstico mais preciso desta doença, que atualmente apresenta um diagnóstico clínico, feito por meio de questionários-diagnósticos. Apesar de alguns estudos relacionarem a DCC com alterações comuns à DA no tecido encefálico, não encontramos nenhum estudo sobre biomarcadores sanguíneos da DCC. Porém na DA, em estudos das abordagens de diagnóstico, a atividade plasmática de BChE mostrou-se aumentada em pacientes da DA, em contrapartida, a atividade da catalase, que é uma enzima antioxidante, tende a estar diminuída nesses pacientes. Por esse motivo essas enzimas foram escolhidas como possíveis marcadores de DCC.

O objetivo geral dessa pesquisa é avaliar o efeito do tratamento por acupuntura nos sinais da DCC. Os objetivos específicos são: avaliar o efeito do tratamento semanal por acupuntura nos pontos Yintang, VG20, PC6, B23, E36 e R3 nos sinais da DCC, avaliados por questionários; e avaliar o efeito do tratamento semanal por acupuntura nos pontos nos Yintang, VG20, PC6, B23, E36 e R3 na atividade das enzimas butirilcolinesterase (BChE), colinesterases (ChE) e catalase em cães com DCC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Disfunção cognitiva canina (DCC)- sinais clínicos e prevalência.

DCC é uma desordem neurodegenerativa de cães idosos, de caráter progressivo que resulta num declínio gradual da função cognitiva. (STUDZINSKI et al, 2005, OSELLA et al 2007, LANDSBERG et al, 2005).

DCC é resultado do envelhecimento patológico e por esse motivo nem todo cão idoso desenvolverá a doença. Os sinais clássicos da DCC são desorientação, decréscimo ou mudanças na interação socioambiental, mudanças no ciclo de sono-vigília, prejuízo no treinamento higiênico e demais atividades rotineiras (LANDSBERG et al., 2005). Também é relatado o aumento da ansiedade. (LANDSBERG, 2012).

É uma das principais alterações comportamentais relacionadas ao envelhecimento canino, e sua prevalência aumenta com a idade. Azkona et al (2009), avaliaram 325 cães idosos com idade superior a 9 anos e a prevalência de DCC, chegou a 22,5% nessa população. Em 2010, na UFRRJ, Pantoja, obteve a taxa de 37,66% para casos sugestivos de DCC na amostra de 77 cães idosos, com faixa etária de 8 a 17 anos, em estudo que propôs um novo questionário-diagnóstico adaptado à realidade brasileira e avaliou os fatores predisponentes para a doença como maior idade, doenças concomitantes e castração nos machos, além de avaliar a disposição dos tutores para tratar seus animais.

2.2 Envelhecimento canino, Alzheimer e DCC

Com o processo do envelhecimento podem ocorrer alterações no SNC tais como: diminuição de volume do lóbulo frontal, aumento ventricular, calcificação meníngea, desmielinização, aumento de lipofucsina, aumento da apoptose, da degeneração neuroaxonal e redução da população de neurônios, além de alterações perivasculares como microhemorragias ou infartos em vasos periventriculares. Os processos oxidativos ocorrem com mais frequência pelo aumento de espécies reativas de oxigênio. Há aumento na atividade da monoamina oxidase B, o que pode aumentar a catálise da dopamina e como consequência, o aumento de radicais livres. Ocorre declínio no tônus colinérgico, evidenciado pela hipersensibilidade a anticolinérgicos, e diminuição na densidade de receptores muscarínicos. Essas alterações podem contribuir para os sinais clínicos de DCC referentes à memória, função motora e ciclo de sono/vigília. (LANDSBERG, 2012).

DCC reproduz várias características comuns à Doença de Alzheimer (DA). Ambas compartilham a presença de substância β -amiloide, que formam placas no córtex cerebral e hipocampo, sendo responsáveis por alterações neurodegenerativas, com sintomas de déficit de aprendizado e memória (CUMMINGS, et al., 1996; BERNEDO et al., 2009). A presença dessas placas também acompanha a perda de neurônios serotoninérgicos, tanto em humanos com DA, quanto em cães com DCC (BERNEDO et al., 2009). Em ambas as espécies ocorre déficit viso-espacial discreto que precede o depósito β -amiloide. O estresse oxidativo e o déficit colinérgico são observados na perda cognitiva precoce, tanto em DA, quanto em DCC. (STUDZINSKI et al., 2005). O modelo canino do envelhecimento também exhibe isomorfismo farmacológico com a demência humana, o que reforça o uso do cão como modelo experimental para o estudo da DA. (STUDZINSKI et al., 2005; GHI et al., 2009).

Placas de núcleo denso vistas na DA não são encontradas em cães ou gatos. As placas encontradas nesses animais são menos maduras. Emaranhados de neurofibrilas também não são encontradas na DCC; no entanto, hiperfosforilado tau é relatado em encéfalos cães e gatos idosos, que podem representar o pré-emaranhado das neurofibrilas. Cães com DCC não apresentam deficiências cognitivas extensas como perda da capacidade de comer, o que sugere que a progressão da doença em animais de estimação é compatível às fases anteriores da DA. (LANDSBERG, 2012)

As mudanças na interação social e ambiental são compartilhadas nas duas doenças. (HEAD et al., 1997, FRANK, 2002).

2.3 Diagnóstico da DCC

O diagnóstico da DCC, assim como da DA, é difícil de ser estabelecido de forma precoce e precisa, feito por exclusão de outros quadros mórbidos que podem afetar o desempenho cognitivo do paciente. Influências genéticas, metabólicas e nutricionais são considerados fatores de risco para DA e podem ser igualmente relevantes para os animais de estimação. No diagnóstico clínico são utilizados questionários com listas de sinais clínicos da doença que podem ser respondidos de forma qualitativa ou quantitativa. Nesses questionários há uma pontuação para cada sinal da doença, e ao final, é estabelecido um valor mínimo total para o animal ser considerado com DCC. (ROFINA, 2006)

O diagnóstico clínico da DCC é feito pelos questionários, porém o examinador chega à conclusão de que o animal apresenta sinais compatíveis com DCC.

É preciso que sejam excluídas doenças que produzam sintomas neurológicos semelhantes, como tumor encéfalo, uremia e encefalopatia hepática. Exame físico completo, exame neurológico (com ênfase nos nervos cranianos e reflexo anal), exames laboratoriais (hemograma, bioquímica renal, hepática, avaliação endócrina e urinálise), tomografia computadorizada (TC) ou ressonância magnética (RM) do encéfalo, tornam o diagnóstico de DCC preciso, apesar da não visualização das placas senis. (LANDSBERG, 2012). Essa bateria de exames, porém, torna o diagnóstico oneroso ao tutor e muitas vezes desgastante para o animal, que nem sempre terá condições clínicas para ser sedado para uma RM ou TC. Nesse sentido, buscam-se biomarcadores hematológicos para diagnóstico da doença. (ARAUJO et al, 2011, FAHNESTOK et al, 2012, SHUTT et al, 2015).

Testes cognitivos podem ser realizados para avaliar o grau e a evolução do tratamento. Um teste possível de ser utilizado na rotina clínica é o teste de curiosidade, em que diversos brinquedos são disponibilizados aos cães no momento da consulta. Não requer nenhum aparato específico nem treinamento prévio, visa avaliar a reação dos cães a objetos novos e seu comportamento exploratório. Em geral, cães saudáveis exploram mais o ambiente e buscam mais contato com os objetos novos do que os cães com DCC, que apresentam menor comportamento exploratório e mostram-se indiferentes ao ambiente. (HEAD et al., 2001; FRANK, 2002, LANDSBERG, 2005).

O diagnóstico definitivo é possível através do exame histopatológico do tecido cerebral (obtido por biópsia ou *post-mortem*), onde são observadas as placas senis no tecido nervoso. (CUMMINGS, 1996)

2.3.1 Questionários de Rofina e Salvin

Os questionários utilizados para o diagnóstico clínico da DCC, listam os sinais clínicos da doença e determinam pontuação para cada um deles. Um estudo feito por Schütt et al (2015) comparou dois questionários já publicados anteriormente, um feito por Rofina et al (2006) e outro feito por Salvin et al (2011) para avaliar a eficácia dos dois no diagnóstico clínico da DCC, e obteve a conclusão de que os dois questionários eram igualmente eficazes para tal.

O questionário de Rofina foi desenvolvido a partir de estudo feito com 30 cães com idades de 1 ano a 19 anos, e os resultados obtidos pelos questionários eram confrontados com o exame *post mortem*, onde eram avaliados deposição de beta-amiloide, atrofia cortical e danos oxidativos. O questionário de Rofina apresenta perguntas relacionadas à memória, orientação, interação social, ciclo de sono/vigília, sede, apetite e agressividade. Rofina et al (2006) não separaram os grupos, então Schütt et al (2015) sistematizaram a divisão de grupos para melhor comparar os questionários, então, os cães foram alocados em 3 grupos: cães com uma pontuação igual a 10 (o grupo não DCC), cães com pontuação variando de 11 a 15 (DCC no limite) e o grupo de DCC com um total de mais de 15 pontos.

O questionário de Salvin foi desenvolvido a partir de um estudo de questionário online, incluindo 957 cães com mais de 8 anos de idade. Os cães não foram avaliados clinicamente e não houve exames *post-mortem*. Os dados coletados foram utilizados para estabelecer uma "escala de classificação de disfunção cognitiva canina" (ECDCC)), que abrange 13 perguntas, dentre elas, em 7 perguntas o entrevistado foi indagado sobre quantas vezes o comportamento em questão foi observado e para as 6 restantes, o entrevistado teve de afirmar se a frequência do comportamento foi alterada em comparação aos 6 meses anteriores. As categorias estudadas foram orientação, memória, apatia, olfação e locomoção. O escore total varia de 13 a 80 pontos. Com base na pontuação total que um cão pode ser alocado em 3 grupos: cães com uma pontuação 13-39 (grupo não DCC), cães com pontuação variando de 40 a 49 (DCC no limite, risco de desenvolver a doença) e o grupo de DCC com um total de 50 -80 pontos.

2.3.2 Enzimas e acupuntura

O estresse oxidativo e o déficit colinérgico são observados na perda cognitiva precoce, tanto em DA quanto em DCC. (STUDZINSKI et al., 2005).

Tang et al (2003), trataram com acupuntura, 8 pacientes diagnosticados com demência e DA, diariamente por 10 minutos, durante 1 mês, utilizando os pontos R3 e C7. Foi observada melhora clínica dos pacientes, porém não houve diferença na atividade da AChE plasmática medida antes e depois do tratamento.

Jinatta (2017) utilizou laser acupuntura por 14 dias, durante 10 minutos, diariamente, no VG 20 para avaliar seu efeito no trauma cerebral em modelos experimentais de ratos. Foram observados diminuição da região lesada, por exame *post mortem* e aumento da dosagem da enzima antioxidante catalase no cérebro.

Phunchago et al (2015), também utilizaram tratamento por acupuntura para avaliar a atividade das enzimas ACh e catalase em déficit de memória e estresse oxidativo, mas em modelo de alcoolismo em ratos. Foi usado o ponto C7, 1 vez ao dia, por 1 minuto, durante 14 dias, e teve como resultado a redução significativa da atividade da AChE, e aumento significativo da atividade da catalase no hipocampo.

2.4 Tratamento da DCC

Os tratamentos disponíveis ainda apresentam eficácia limitada. DCC não apresenta cura, mas a deterioração do SNC pode ser desacelerada, e os sinais clínicos amenizados, se os animais forem preparados para um envelhecimento saudável e se os tutores forem orientados a buscar auxílio veterinário ao observarem sinais sutis da doença. (LANDSBERG, 2005; OSELLA et al., 2007).

Os tratamentos farmacológicos disponíveis utilizam medicamentos como a selegilina e vasodilatadores cerebrais como propentofilina, pentoxifilina e nicergolina. (LANDSBERG, 2005). Extrato de ginkgo biloba também é usado como tratamento (OSELLA et al, 2007).

Selegilina é um inibidor seletivo e irreversível da monoamina oxidase que pode aumentar os níveis de dopamina e outras catecolaminas no córtex e no hipocampo. Pode ser considerada um neuroprotetor tanto pela redução da produção de radicais livres, quanto pela capacidade de aumentar os níveis das enzimas superóxido desmutase e catalase, responsáveis por eliminar os radicais livres. Seus efeitos clínicos são geralmente observados dentro de 2 semanas ou mais. Não deve ser usada simultaneamente com outros inibidores da monoamina oxidase (por exemplo, amitraz) e deve ser evitada ou utilizada com cautela, com drogas que melhoram a transmissão da serotonina (como inibidores da recaptação de serotonina, antidepressivos tricíclicos, bupiriona, Trazodona, tramadol e Dextrometorfano). (LANDSBERG, 2012)

Propentofilina é indicado para tratamento da apatia, letargia e comportamento deprimido em cães idosos, aumenta o fluxo sanguíneo para o coração, músculos esqueléticos e encéfalo, possui também ação neuroprotetora devido à inibição da captação de adenosina e bloqueio a fosfodiesterase. (LANDSBERG, 2012)

Dieta rica em antioxidantes reduz os efeitos negativos dos radicais livres. Outra estratégia é uma dieta contendo ácidos graxos de cadeia média, que são convertidos em corpos cetônicos pelo fígado. A redução do metabolismo cerebral da glicose e a redução do metabolismo energético são associados ao déficit cognitivo, dessa forma, o uso dos corpos cetônicos é visto pelo organismo como uma via de energia alternativa a ser usada pelo encéfalo. Além disso, os ácidos graxos de cadeia média aumentam a função mitocondrial, aumentam os níveis de ácidos graxos polinsaturados no encéfalo, e diminui o precursor de proteína amiloide no córtex parietal de cães idosos.(LANDSBERG, 2012) No Brasil, há disponível a ração neurologic care da Purina, que é enriquecida com ácidos graxos de cadeia média, e em forma in natura, esses ácidos graxos estão presentes no óleo de coco.

Tratamento utilizando uma série híbrida de potentes seletivos agonistas de receptor $\alpha 7$ nicotínico de acetilcolina é tido como promissor no tratamento do prejuízo cognitivo (NENCINI et al., 2014).

2.5 Acupuntura na DCC

A acupuntura é uma antiga modalidade da Medicina Tradicional Chinesa (MTC), utilizada por mais de 3000 anos e tem como princípio básico a estimulação de pontos específicos no corpo com propósito terapêutico. Nas últimas décadas, a acupuntura ganhou grande popularidade no Ocidente como uma terapia da medicina alternativa e complementar. No ano 1974, no Brasil, foi fundado o IVAS (Sociedade Internacional de Acupuntura Veterinária), e a acupuntura foi reconhecida como especialidade médico veterinária, conforme a resolução CFMV nº 1051, de 14 de fevereiro de 2014.

Como proposta terapêutica, a acupuntura parece ser um bom instrumento na DCC, dado seu bom desempenho no tratamento da DA. A estimulação de pontos de acupuntura pode promover a liberação de diferentes neurotransmissores no sistema nervoso central (SNC), e isso foi comprovado por imagens de ressonância magnética, realizada após sessão de acupuntura, na ocasião do estudo foram estimulados os pontos F 3 (Tai Chong) e IG 4 (He gu) em pacientes com DA, e houve ativação de certas regiões do encéfalo relacionadas com a função cognitiva (WANG et al, 2012). Estudo recente sugere que a acupuntura melhora a função cognitiva na DA pela regulação do metabolismo da glicose, melhorando a neurotransmissão assim como reduz o estresse oxidativo e o depósito de A β proteína, e a apoptose neuronal (CAO et al, 2016). Um estudo de meta-análise, analisou o efeito da acupuntura sobre os sintomas da DA. Neste estudo, dez ensaios clínicos randomizados com um total de 585 participantes foram incluídos. Os resultados combinados de 6 ensaios mostraram que a acupuntura foi melhor do que drogas na pontuação na escala da Mini Avaliação do Estado Mental (do inglês Mini Mental State Examination, MMSE), utilizada no diagnóstico e avaliação de progressão da DA. Os autores concluíram que a acupuntura pode ser mais eficaz do que as drogas e pode aumentar o efeito de medicamentos para o tratamento de DA, melhorando a função cognitiva. (ZHOU et al, 2014). A acupuntura também pode ser mais eficaz do que drogas na melhoria da capacidade dos pacientes com DA para levar a cabo suas vidas diárias (ZHOU et al, 2015).

Os sinais da DCC, desorientação, déficit de aprendizado, não reconhecimento de ambiente e pessoas, estão relacionados à função encefálica, que na MTC é regida pelo rim, cujo elemento é a água. Esse órgão é responsável por abastecer o cérebro e controlar ossos, governar a água, controlar os dois orifícios inferiores, abrigar a força de vontade, controlar a porta da vida (representada pelo coração, que na MTC é representado pelo elemento fogo). Mudanças no ciclo de sono-vigília, representam desordem no coração, segundo a MTC, que tem a função de abrigar a mente, exercer funções relacionadas a afetos, memória e sono. (MACIOCIA, 2007) Como o rim é responsável por controlar o coração, segundo a MTC, estando debilitado, possibilita que o coração fique sem controle, no sentido de abrigar a mente, e por isso ocorrem as desordens relacionadas ao ciclo de sono-vigília. Os pontos escolhidos nessa dissertação apresentam principalmente a função de tonificar o rim, com o objetivo de melhorar a função encefálica e de exercer melhor controle sobre coração. A

justificativa para a escolha dos pontos

se baseia nos estudos de Leung et al. (2015).

Yintang, localizado na cabeça, na linha média entre as sobrancelhas. Tem a função de acalmar a mente. (MACIOCIA, 2007)

VG20, localizado na linha média dorsal da cabeça, na linha entre o canto cranial da base da orelha, no encontro entre a crista sagital e a crista frontal. Tem a função de nutrir o cérebro e acalmar a mente, indicado para insônia, agitação, confusão mental, demência. (MACIOCIA, 2007; SCHOEN, 2006; XIE, 2011)

PC6, localizado a aproximadamente 2 cun acima da prega do carpo, entre os tendões dos músculos flexor carporradial e flexor digital superficial, tem a função de regular a função

do coração, clareia e acalma a mente, consolida a essência e regula o rim, indicado para insônia, confusão mental, delírio e ansiedade. (SCHOEN, 2006; XIE, 2011).

B23, localizado a 1,5 cun lateral à linha mediana, entre os processos espinhosos da segunda e terceira vértebras lombares. Tonifica os rins e a essência, tonifica os ossos e as medulas, reforça a coluna lombar e os joelhos. (SCHOEN, 2006; XIE, 2011)

E36, localizado 3 cun abaixo de depressão lateral à borda inferior da patela, a 1 cun lateral à tuberosidade anterior da tíbia. Tonifica o qi (energia), o sangue e o wei qi (energia de defesa), aumenta a resistência, regula os níveis defensivos e nutritivos. Indicado para cansaço, insônia, anorexia, dor no joelho e perna. (SCHOEN, 2006; XIE, 2011)

R3, localizado na metade da distância entre o maléolo interno e o tendão do calcâneo. Tonifica os rins, beneficia a essência, reforça as articulações dos membros posteriores. (SCHOEN, 2006; XIE, 2011).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Divulgação

O trabalho experimental foi divulgado por meio de folder (em Anexo 1), compartilhado pelas redes sociais Facebook, Instagram e WhatsApp. Esses canais foram utilizados para a comunicação entre a pesquisadora e os tutores.

3.2 Local do experimento

O trabalho experimental foi realizado no Hospital Veterinário de Pequenos Animais (HVPA) da UFRRJ, no Consultório Veterinário Animania, de propriedade da Médica Veterinária Márcia Paraski, e em atendimentos domiciliares. Todos os procedimentos estão de acordo com a lei de bem-estar animal, Instrução Normativa nº56 de 2008. O presente experimento encontra-se aprovado pelo Comitê de Ética na Pesquisa da UFRRJ/ CEUA- IV, nº 2082310317.

3.3 Desenho Experimental

Frente a divulgação, alguns tutores entraram em contato com a pesquisadora e outros foram acionados por indicação de colegas veterinários.

Crítérios de seleção: Foram selecionados 10 cães a partir de 8 anos de idade, com sinais clínicos da doença, independente de raça, sexo, peso e histórico clínico, após assinatura de consentimento livre e esclarecido de seus tutores (Anexo 2). Os critérios de seleção dos animais foram: diagnóstico sugestivo de DCC pela aplicação dos questionários, não foi permitida a inclusão de medicamentos comumente utilizados para tratamento da DCC durante o tratamento por acupuntura, sendo permitidos a continuidade de todos os medicamentos que faziam parte da rotina clínica dos animais. Animais que faziam uso de medicamentos para DCC há menos de 2 meses não foram incluídos na pesquisa, para evitar que houvesse interferência na interpretação dos resultados. Deveriam ser animais acompanhados por veterinário clínico e com histórico de vacinação e exames laboratoriais de rotina (hemograma, ALT, FA, uréia e creatinina) recentes, para que fossem considerados excluídos os animais que apresentassem doença clínica aguda que pudesse ser diagnóstico diferencial de DCC, como encefalopatia hepática e uremia intensa. Animais que apresentavam doença crônica controlada, como insuficiência renal, foram aceitos. Animais incapazes de se locomoverem também não foram aceitos, porque nos questionários há itens relacionados ao ato de deambular aos quais esses animais não se enquadrariam. A seleção dos animais também teve de obedecer à compatibilidade de horário e local entre os tutores e a pesquisadora.

Os animais atendidos foram denominados em letras (M1, M2, M3... M10) para haver compatibilidade de dados com a pesquisa-irmã desta dissertação, intitulada: “Enzimologia aplicada a uma nova abordagem de diagnóstico da disfunção cognitiva canina e à busca de novos adjuvantes ao tratamento desta patologia”: M1(Fígaro), M2 (Paçoca), M3 (Athirson), M4 (Dante), M5 (Bethânia), M6 (Biscuit), M7 (Nina), M8 (Luna), M9 (Brigitte) e M10 (Toff).

Foram preenchidas ficha de cadastro (Anexo 3) e ficha comportamental (Anexo 4).

Os animais foram submetidos a exame clínico geral.

Os tutores responderam, por meio de entrevista face a face com a pesquisadora, a dois questionários (Anexos 5 e 6) para o diagnóstico da DCC, contendo sinais da doença, versando sobre o comportamento dos animais com ênfase em mudanças nos últimos 6 meses. A partir dos resultados os animais foram selecionados. Foram submetidos a coleta de sangue inicial, para análise das enzimas-diagnósticas.

Os tutores se comprometeram a permitir uma coleta de sangue inicial no primeiro dia, o tratamento dos animais pela acupuntura 1 vez por semana, durante 4 semanas seguidas e, na quinta semana, à coleta de sangue. Foram orientados a observar os sintomas presentes durante as quatro semanas de tratamento.

O tratamento por acupuntura consistiu na inserção de agulhas de acupuntura de aço inox, descartáveis e estéreis da marca Dong Bang, de espessura 0,20x15mm, na pele dos animais, nos seguintes pontos de acupuntura: Yintang, Baihui (VG20), ambos unitários, e nos bilaterais Neiguan (PC6), Shenshu (B23), Zusanli (E36), Taixi (3R), seguindo essa ordem (fig. 1). Nos bilaterais não houve um padrão de início em lado direito ou esquerdo, foi aleatório. Obedeceu-se, portanto a direção cranial-caudal.



Figura 1- Canino Biscuit: na cabeça, mais cranial é o ponto YT, mais caudal o VG20; membro anterior, PC6; dorso, B23; membro posterior, mais dorsal está o E36, e na prega do calcâneo medial está o R3. (Arquivo pessoal, autorizado pelo tutor)

Foram escolhidas agulhas finas, chamadas japonesas ou coreanas, para proporcionar maior conforto aos animais durante a inserção. As agulhas foram inseridas com profundidade de aproximadamente 4mm, determinando uma inserção superficial, o que é recomendado para idosos (INADA, 2003); e mantidas nos animais durante dez minutos, sendo recolocadas se caíssem durante a sessão.

Durante cada sessão os tutores eram indagados sobre como o animal se apresentou durante a semana, se houve melhora ou piora dos sintomas, ou se não houve alteração.

Após 4 semanas de tratamento os animais foram reavaliados. Nova coleta de sangue foi realizada e os tutores responderam novamente aos questionários.

3.4 Questionário de avaliação do DCC

Para o diagnóstico de DCC foram utilizados o questionário proposto por Rofina et al. (2006) quadro 1, denominado “questionário 1”, e a escala de classificação da disfunção cognitiva canina (ECDCC), quadro 2 (SALVIN et al., 2011), denominado “questionário 2”, sendo considerados com DCC animais que apresentaram pontuações maior que 15 no questionário 1 e iguais ou maiores que 50 no questionário 2. O layout dos questionários foi modificado para melhor compreensão do tutor, e estão disponibilizados nos anexos 6 e 7, respectivamente.

Quadro 1

Perguntas e pontuação do questionário desenvolvido por Rofina et al (2006) para diagnóstico da DCC. Traduzido de Schütt et al (2015)

Comportamento	Pontuação
Apetite	
Normal	1
Diminuído	2
Aumentado e com diarreia	3
Aumentado e sem diarreia	4
Ingesta de água	
Normal	1
Aumentado	3
Urina e fezes	
Urina e defeca nos locais de costume	1
Urinando dentro de casa	2
Urinando e defecando em qualquer lugar da casa	4
Ciclo de sono e vigília	
Normal	1
Dormindo mais	2
Dorme durante o dia e fica acordado à noite	3
Comportamento repetitivo	
Sem comportamento repetitivo	1
Olhando fixo para o “nada”	2
Andar sem rumo	3
Andar em círculos	4
Atividade e interação	
Normal	1
Diminuído	2
Não interage com outros animais ou com o tutor	4
Perda da percepção	
Não há perda da percepção do ambiente	1
Colide com obstáculos	2
Tenta passar por espaços estreitos	5
Tenta passar pelo lado errado da porta	5
Desorientação	
Não apresenta	1
Em lugares desconhecidos	2
Em lugares de rotina	4
Em casa	5
Memória	
Normal	1
Não reconhece familiares	2
Não reconhece o tutor após o final de semana	4
Não reconhece o tutor diariamente	5
Mudança na personalidade	
Sem alteração	1
Agressivo, ou deixou de ser, com outros animais ou crianças	3
Agressivo, ou deixou de ser, com o dono	4

Rofina et al (2006)

Quadro 2

Perguntas e pontuação do questionário desenvolvido por Salvin et al (2011) para diagnóstico da DCC. Traduzido de Schütt et al (2015)

	Nunca (1)	1x/ mês (2)	1x/ sem (3)	1x/ dia (4)	> 1x/ dia (5)	Total
Com que frequência seu cão “anda de um lado para outro”, anda em círculos ou vaga sem direção ou propósito?						
Com que frequência seu cão olha fixamente paredes ou o chão?						
Com que frequência seu cão falha ao reconhecer pessoas ou outros animais?						
Com que frequência seu cão tenta ultrapassar paredes ou portas?						
Com que frequência seu cão anda enquanto, ou evita, ser acariciado?						
	Nunca (1)	1-30% das vezes (2)	31-60% das vezes (3)	61-99% das vezes (4)	Sempre (5)	
Com que frequência seu cão tem dificuldade de encontrar comida deixada no chão?						
	Muito menos (1)	Ligeiramente menos (2)	Sem alteração (3)	Levemente mais (4)	Muito mais (5)	
Comparando com os últimos 6 meses, o seu cão andou de um lado para o outro, andou em círculos, ou vagou sem direção ou propósito?						
Comparando com os últimos 6 meses, seu cão ficou olhando fixamente paredes ou chão?						
Comparando com os últimos 6 meses, seu cão urinou ou defecou em área que anteriormente era mantida limpa, ou seja, defecou ou urinou em locais não destinados a essa função (se seu cão não tinha o costume de urinar ou defecar em casa, marque)						
Comparando com os últimos 6 meses, seu cão teve dificuldade em encontrar comida deixada no chão?						
Comparando com os últimos 6 meses, seu cão falhou a reconhecer pessoas ou outros animais?						
	Muito mais (1)	Ligeiramente mais (2)	Sem alteração (3)	Levemente menos (4)	Muito menos (5)	
Comparando com os últimos 6 meses, quanto tempo seu cão se						

mantém ativo?						
					Total	

EDCC Salvin et al. (2011)

3.5.3 Coletas de sangue e conservação das amostras

As coletas de sangue foram realizadas antes da primeira sessão de acupuntura e 1 semana após a última sessão de acupuntura. Foram coletados cerca de 2 ml de sangue que foram divididos em 2 tubos, sendo um com EDTA e outro sem anticoagulante. Foi puncionada a veia cefálica, utilizados scalp número 23 e seringa de 5ml.

As amostras foram acondicionadas em isopor contendo gelo, para fins de transporte. A amostra do tubo com EDTA foi congelada entre -1°C e -4°C , sem sofrer qualquer processamento, enquanto a sem anticoagulante foi centrifugada, com o objetivo de se obter o soro, que também foi congelado entre -1°C e -4°C . A centrifugação foi feita num período de no máximo 2 dias após a coleta, e a amostra, antes de ser centrifugada, foi mantida em temperatura de refrigeração entre 2°C e 4°C . Depois de centrifugada foi separado o soro e o mesmo foi congelado entre -1°C e -4°C .

3.6 Dosagens enzimáticas

As dosagens das enzimas BChE, AChE e catalase foram realizadas pelo Laboratório de Bioquímica do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, sob orientação da Professora Cristiane Martins Cardoso de Salles, pela pesquisadora Soraia John, aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química da UFRRJ.

Para os ensaios de colinesterases o soro foi diluído com tampão de ensaio (diluição 1:10). A presença da atividade das colinesterases em soro diluído foi determinada utilizando o método de Ellman (1961) modificado. O soro foi adicionado a poços de uma placa de ELISA contendo tampão de ensaio (fosfato de sódio 0,1 M pH 7,5). Posteriormente foi adicionado DTNB 0,32 mM dissolvido em tampão. O ensaio foi iniciado pela adição do substrato iodeto de butiriltiocolina 0,6 mM ou iodeto de acetiltiocolina 1,5 mM, obtendo assim um volume reacional de 220 μL . A densidade ótica dos meios reacionais foi medida em intervalos de 10 segundos durante 100 segundos a 412 nm, em um espectrofotômetro. O coeficiente de absorvidade molar utilizado foi de $14,15 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Os meios referentes ao ensaio dos brancos não tiveram adição de soro.

Para ensaio da catalase foi utilizado sangue total, como descrito por Basso et al. (2014). Para ocorrência de lise a amostra foi congelada e no momento do ensaio enzimático, o sangue foi diluído a 1:40 em tampão de ensaio (fosfato de potássio 50 mM pH 7,0). A atividade de catalase foi determinada pelo método de Nelson e Kiesow (1972), com modificações, utilizando peróxido de hidrogênio a 12 mM como substrato. A amostra de sangue total diluída foi adicionada ao tampão de ensaio e posteriormente o substrato da reação também foi adicionado, obtendo assim um volume reacional de 600 μL . A densidade ótica dos meios reacionais foi medida em intervalos de 10 segundos durante 100 segundos a 240 nm. O coeficiente de extinção molar utilizado foi de $18 \times 10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Os meios referentes ao ensaio dos brancos não tiveram adição de sangue.

3.7 Análise estatística

Os gráficos e as análises estatísticas dos resultados dos questionários foram confeccionados utilizando-se a ferramenta GraphPad Prism 5. Foi realizado o teste t pareado, com o objetivo de verificar se houve diferença significativa entre os resultados dos questionários antes e após o tratamento.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Animais recrutados

Um animal, Luna (M8), foi eutanasiado entre a primeira e a segunda sessão de acupuntura, por apresentar sinais graves de doença neurológica, que tanto poderia ser DCC grave, como também havia a possibilidade de tumor encefálico; não foi feito exame de imagem e tampouco necropsia do animal em questão. Por esse motivo foi retirada da análise estatística.

4.2 Atendimentos por acupuntura

Nem todos os animais seguiram o protocolo de 1 sessão por semana. Ora havia falha do proprietário, ora o animal não estava em condições físicas para ser atendido, porém todos os animais foram submetidos a 4 sessões de acupuntura (com o máximo de 5 semanas de tratamento), conforme mostra a tabela 1.

Tabela 1: Rotina de atendimentos do experimento

Animais	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4	Semana 5	Semana 6
M1	C + A	A	A	A	C	
M2	C + A	- (D)	A	A	A	C
M3	C + A	A	A	- (T)	A	C
M4	C + A	A	A	A	C	
M5	C + A	A	- (T)	A	A	C
M6	C + A	A	A	A	C	
M7	C + A	- (T)	A	A	A	C
M8	C + A	- (E)				
M9	C + A	A	A	A	C	
M10	C + A	A	- (T)	A	A	C

C: coleta de sangue; A: acupuntura; - (D): não fez tratamento por motivo de doença; - (T): não fez tratamento por impossibilidade do tutor; - (E): animal eutanasiado.

4.3 Efeito da acupuntura nas escalas de DCC

Questionário 1: Para esse questionário são considerados positivos para a doença, os animais que obtiverem pontuação maior que 15. Nesse questionário houve diminuição significativa das médias dos resultados, tendo por média o valor de 29 antes da acupuntura e de 22 depois da acupuntura. Foi observada diferença significativa nas pontuações obtidas pelos animais antes e depois do tratamento por acupuntura ($p=0,0001$, teste t pareado) fig. 2. Desta forma, cabe a interpretação de que a acupuntura obteve efeito positivo nos sinais dos animais com DCC. Os animais, porém, continuaram na faixa de resultado de positividade da doença, o que já seria esperado para uma doença que não tem cura. Resultado semelhante a esse foi observado por em análise feita por Osella et al (2006), em que 8 cães idosos utilizaram composto nutracêutico a base de ginkgo Giloba por um período de 28, 56 e 84 dias, todos apresentaram melhora clínica, avaliada por questionário diagnóstico, mas não houve remissão dos sintomas.

Os itens do questionário que apresentaram diferença significativa no tratamento por acupuntura foram: Ciclo de sono e vigília, atividade e interação, apetite, comportamento repetitivo e memória

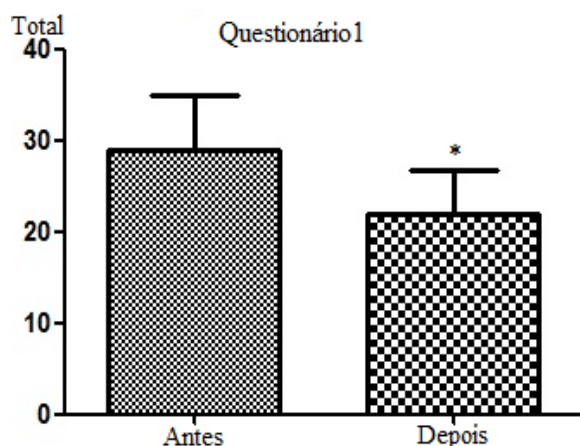


Figura 2: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Rofina et al (2006) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0001$)

A desorientação avaliada pelo questionário 1 não foi alterada pelo tratamento (figura 3).

Como foi considerada desorientação qualquer alteração de comportamento compatível com DCC, nenhum animal deixou de apresentar, uma vez que os sinais da doença foram amenizados e não extintos, o que justifica o resultado obtido nesse item.

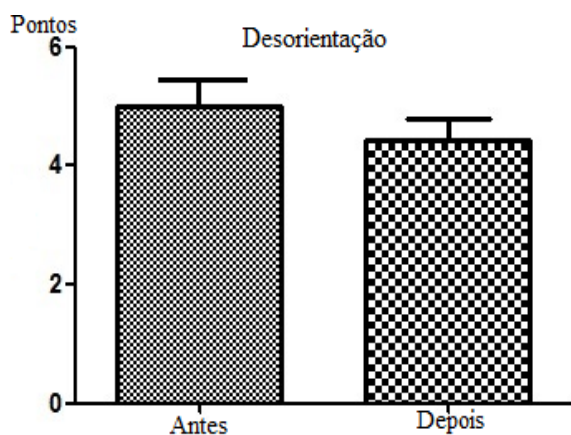


Figura 3: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Rofina et al (2006), no item “Desorientação”, em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença não significativa no teste t pareado ($p=0,1388$)

O ciclo de sono e vigília apresentou diferença estatisticamente significativa com o tratamento (figura4).

Sinais comportamentais como: ansiedade por separação, vocalização, andar compulsivo noturno e agressividade, são espontaneamente relatados pelos tutores, por serem alterações de comportamento que mais impactam a vida do tutor (LANDSBERG, 2012).

Na alteração do ciclo de sono vigília podem ser incluídos a vocalização, a ansiedade por separação e o andar compulsivo noturno. Os tutores relatam que esse é o item de maior desconforto, porque afeta a vida de todos os integrantes da família e ainda pode causar transtorno com a vizinhança em função do barulho. Quando o animal inicia a vocalização, os tutores relatam que saem de suas camas para ficarem ao lado do animal para tentar acalmá-los e muitas vezes não obtém sucesso, relatam estarem cansados por estarem com uma qualidade de sono muito ruim.

Com a acupuntura os animais passaram a dormir mais, ou passaram a ter noites de sono normais, o que foi um grande ganho dessa pesquisa, com diferença estatisticamente significativa no teste t pareado (Fig. 4)

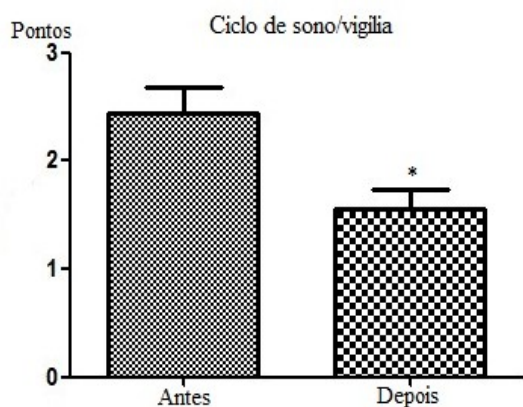


Figura 4: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Rofina et al (2006), no item "ciclo de sono/vigília", em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,002$)

Não houve diferença significativa entre o comportamento apresentado antes e depois do tratamento para o treinamento higiênico dos cães (Fig. 5).

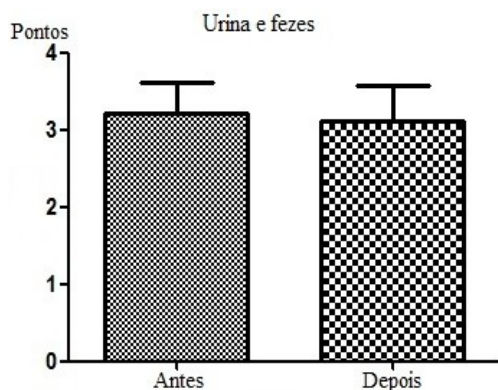


Figura 5: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Rofina et al (2006) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, no item “Urina e fezes”, antes e após tratamento por acupuntura. Não foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,3466$)

Atividade e interação teve diferença estatisticamente significativa quando avaliada pelo questionário 1 (figura 6). –

Todos os animais passaram a interagir pelo menos com o tutor o que já os colocavam numa categoria anterior. Foi relatado por alguns tutores que alguns animais passaram a brincar, o que já não faziam há muito tempo.

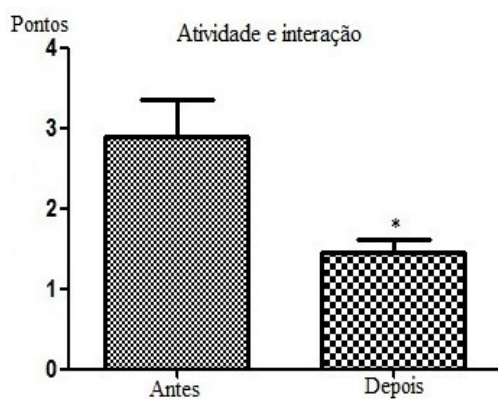


Figura 6: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Rofina et al (2006) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, no item “Atividade e interação”, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0027$)

Animais com DCC, assim como os pacientes com DA, esquecem que já comeram ou beberam água e por isso o ato de comer é visto como ação cognitiva. (LANDSBERG, 2012) Os animais tratados obtiveram melhora, como foi observado no resultado apresentado na figura 7.

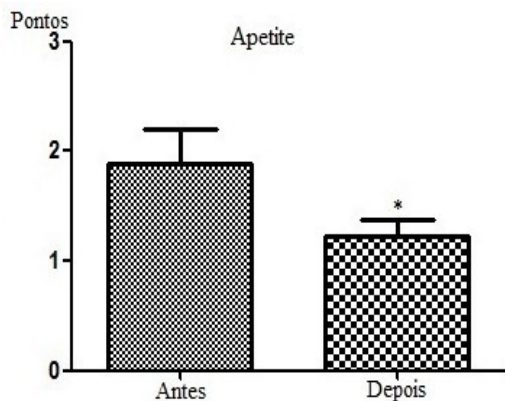


Figura 7: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Rofina et al (2006) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, no item “Apetite”, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0222$)

O resultado dos animais tratados, na avaliação do item ingestão de água não foi semelhante ao encontrado no item apetite. Não houve diferença estatisticamente significativa, como apresentado na figura 8.

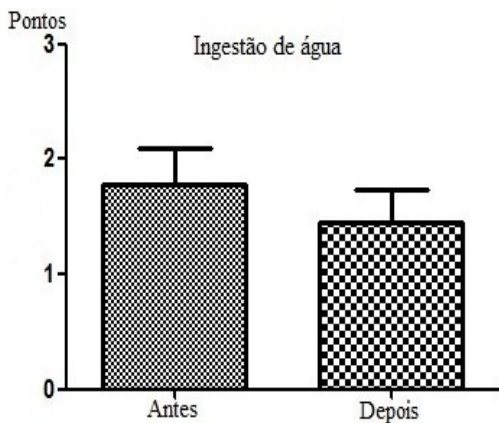


Figura 8: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Rofina et al (2006) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, no item “Ingestão de água”, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença não significativa no teste t pareado ($p=0,3466$)

Os animais apresentaram melhora clínica no comportamento repetitivo, quando examinados pelo questionário 1. Houve diferença estatisticamente significante nesse item (figura 9)

Esse item está relacionado à qualidade de vida desses animais, uma vez que andar em círculos ou sem rumo causa fadiga e gasto de energia desnecessariamente no organismo idoso. Com a acupuntura, esses cães ficaram na média entre 2 e 3 pontos o que foi um ganho em qualidade de vida para os mesmos

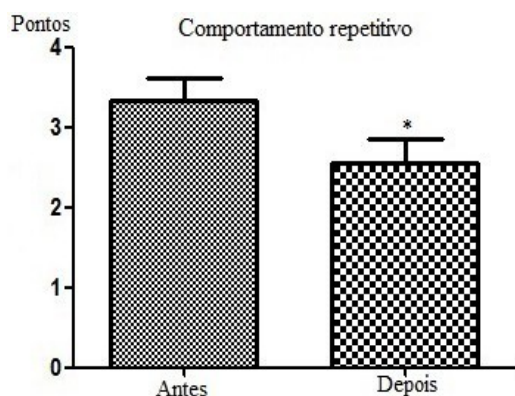


Figura 9: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Rofina et al (2006) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, no item “Comportamento repetitivo”, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0431$)

Quanto à perda da percepção, o questionário 1 não mostrou diferença estatisticamente significante (figura 10).

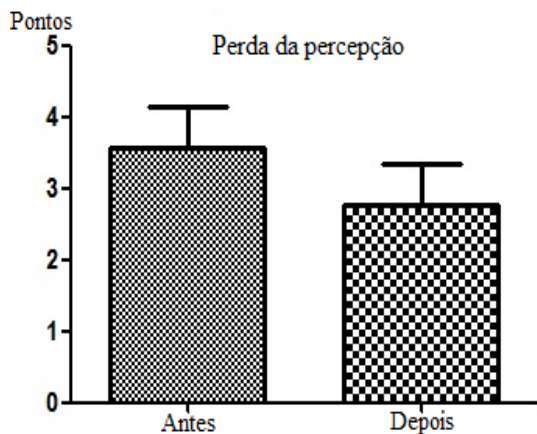


Figura 10: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Rofina et al (2006) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, no item “Perda da percepção”, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença não significante no teste t pareado ($p=0,2738$)

A memória avaliada pelo questionário 1 foi alterada pelo tratamento (figura 11).

Tutores relatam diminuição da afetividade dos cães e o não reconhecimento dos membros da família, (HEAD et al., 1997, FRANK, 2002). Essa falta de afetividade certamente está relacionada à memória desses animais, difícil expor afetividade se não se lembra. Um ponto que foi bem colocado por todos os tutores que participaram do experimento foi o relato de indiferença dos animais, para eles parecia que os animais estavam em um mundo “à parte”. Nesse ponto, com o tratamento proposto, os tutores relataram que os animais ficaram mais atentos e menos indiferentes em relação ao ambiente, durante o período do experimento.

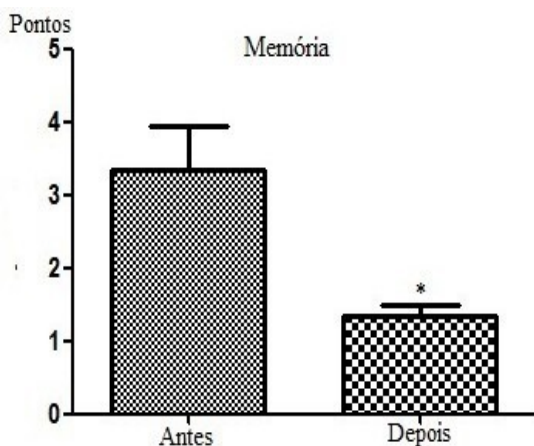


Figura 11: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Rofina et al (2006) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, no item “Memória” antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0147$)

Não houve diferença estatisticamente significativa na mudança de personalidade (figura 11).

A agressividade, uma mudança de personalidade, é responsável por 45% de procura do tutor por consultas veterinárias de animais com DCC (LANDSBERG, 2012). Na pesquisa, somente os caninos M5 e M10 apresentavam sinais de agressividade, que foram amenizados com a acupuntura, e não resolvidos, ou seja, não puderam descer de categoria no questionário. O relato foi que os animais ficaram mais calmos. O canino M1 convivia com filhotes e o relato dos tutores foi a falta de tolerância com os mais jovens, mas não chegava a ser agressividade, e com a acupuntura M1 começou a aceitar as brincadeiras dos pequenos sem reagir negativamente.

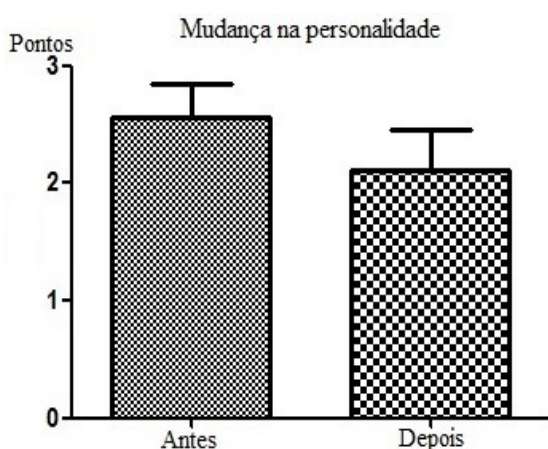


Figura 12: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Rofina et al (2006) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, no item “Mudança de personalidade”, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença não significativa no teste t pareado ($p=0,1690$)

No questionário 2 são considerados positivos para a doença, os animais que obtiverem pontuação igual ou maior que 50, tendo por média o valor de 59 antes da acupuntura e de 41 depois da acupuntura. Foi observada diferença significativa nas pontuações obtidas pelos animais antes e depois do tratamento por acupuntura ($p < 0,0001$) fig. 13.

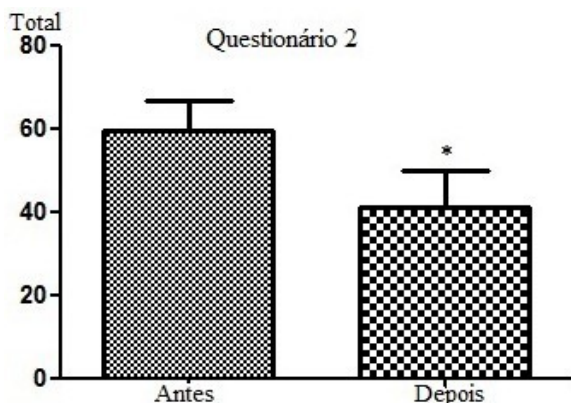


Figura 13: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p < 0,0001$)

Nesse questionário os animais saíram da faixa de pontuação que os enquadravam como positivos para DCC, o que não corresponde à realidade. Esse resultado se deve aos itens “comparando aos últimos 6 meses”, em que após o tratamento por acupuntura, todos os tutores julgaram os animais na faixa do “sem alteração”, “um pouco menos” ou “muito menos”, diminuindo bastante o resultado individual de cada animal na escala de DCC. O tutor de um **animal sem tratamento** se comparar sua situação de **não tratamento** a uma situação de 6 meses atrás, terá uma resposta logicamente pior se comparado a esse mesmo **animal tratado com acupuntura**, que teve um resultado benéfico. Não foi relatada piora em nenhum dos animais tratados, que estariam listados nos itens de resposta “um pouco mais” ou “muito mais”. Dessa forma, os resultados do questionário 2, tiveram redução mais expressiva (30.5%) que o questionário 1 (24,13%).

Os itens do questionário 2 que apresentaram diferença significativa no tratamento por acupuntura foram: anda de um lado para o outro, olha fixamente, falha ao reconhecer, tem dificuldade para encontrar comida, seu cão se mantém ativo (figs. 14 a 22).

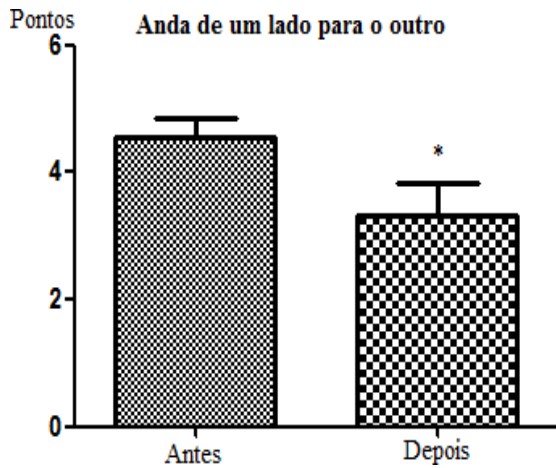


Figura 14: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, em relação ao item “Anda de um lado para o outro”, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0384$)

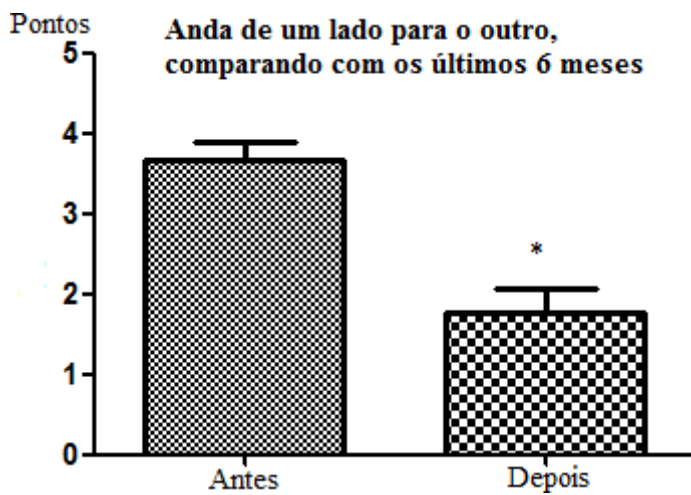


Figura 15: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, em relação ao item “Anda de um lado para o outro, comparando com os últimos 6 meses” antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0003$)

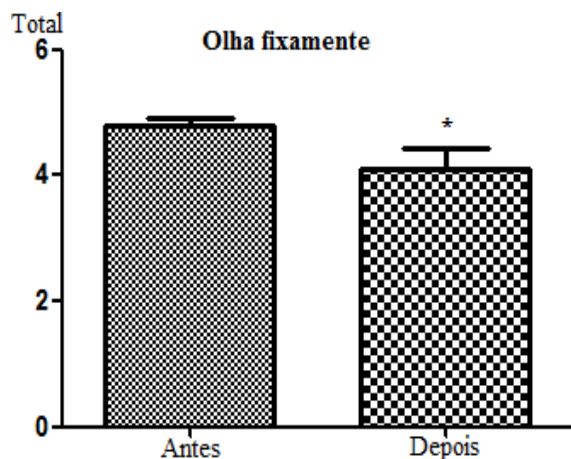


Figura 16: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, em relação ao item “Olha fixamente” antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0222$)

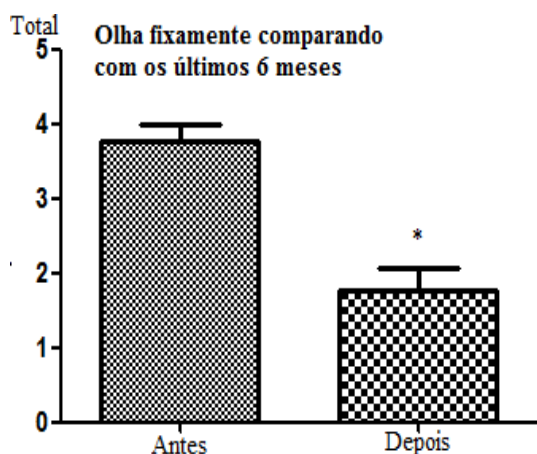


Figura 17: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, em relação ao item “Olha fixamente, comparando com os últimos 6 meses” antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0019$).

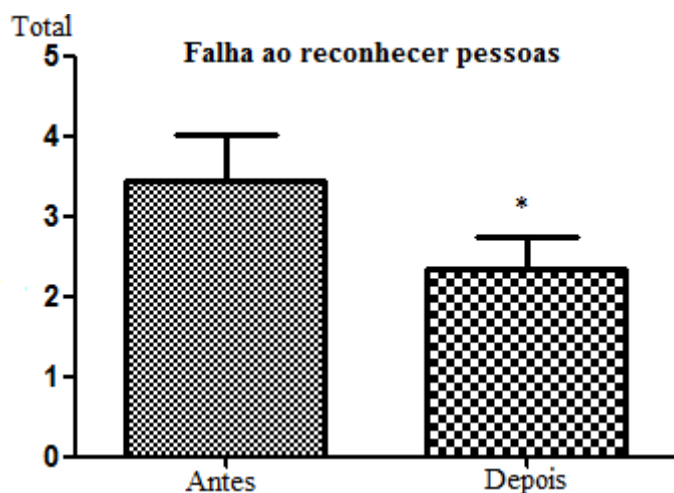


Figura 18: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, em relação ao item “Falha ao reconhecer pessoas” antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0133$)

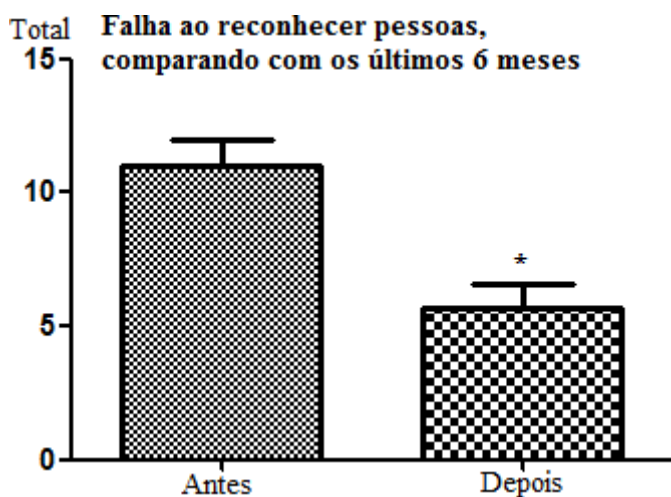


Figura 19: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, em relação ao item “Falha ao reconhecer pessoas, comparando com os últimos 6 meses” antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0175$)

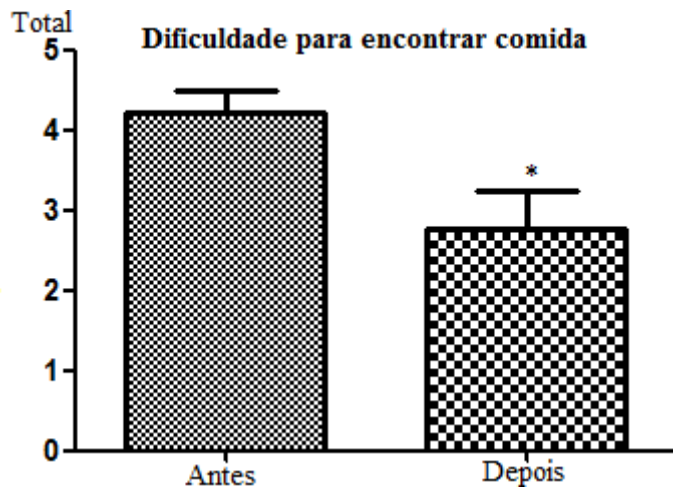


Figura -20: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, em relação ao item “Dificuldade para encontrar comida” antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0208$)

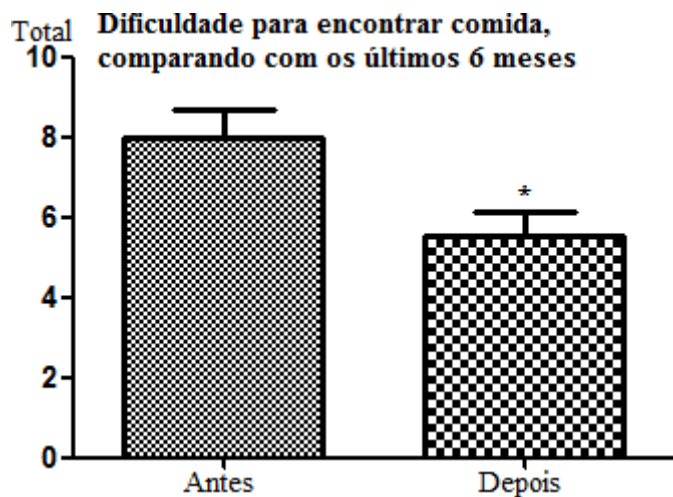


Figura -21: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, em relação ao item “Dificuldade para encontrar comida, comparando com os últimos 6 meses” antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0100$)

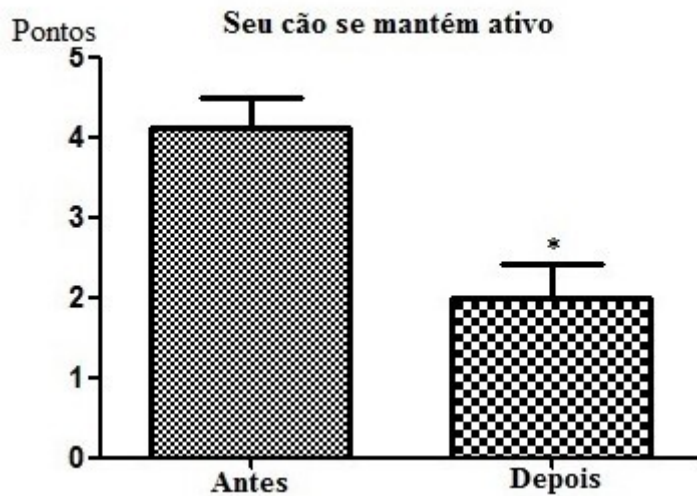


Figura22: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, em relação ao item “Seu cão se mantém ativo” antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0024$)

O item “seu cão se mantém ativo” mascara uma melhora do quadro clínico para os animais que tiveram o andar compulsivo melhorado com a acupuntura. Esses animais mostraram sinais de relaxamento e mais sonolência, em substituição ao andar compulsivo, e por isso, aparentemente menos ativos.

Nos itens “Tenta ultrapassar paredes ou portas”, “Fica preso atrás de objetos”, “Urinou ou defecou em locais inapropriados” e “Evita ser acariciado”, do questionário 2, não houve diferença significativa com a aplicação do tratamento por acupuntura (figs. 23 a 26).

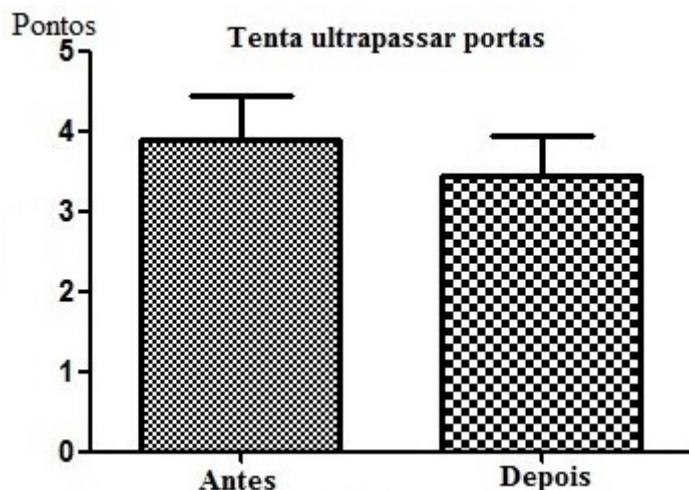


Figura 23: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, em relação ao item “Tenta ultrapassar portas” antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença não significativa no teste t pareado ($p=0,1038$)

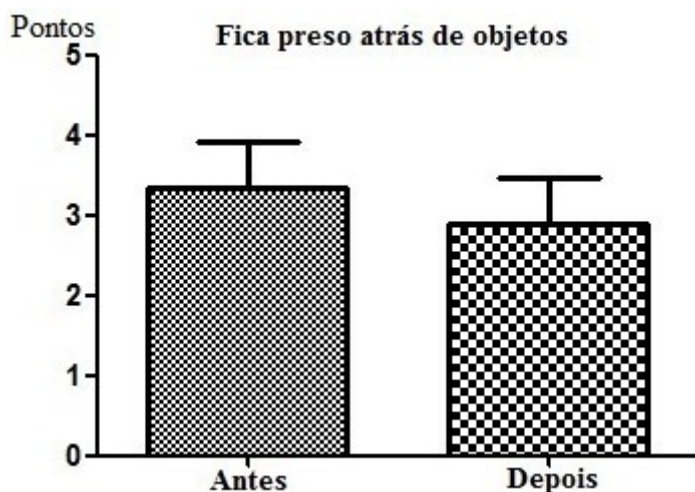


Figura 24: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, em relação ao item “Fica preso atrás de objetos”, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença não significativa no teste t pareado ($p=0,3765$)

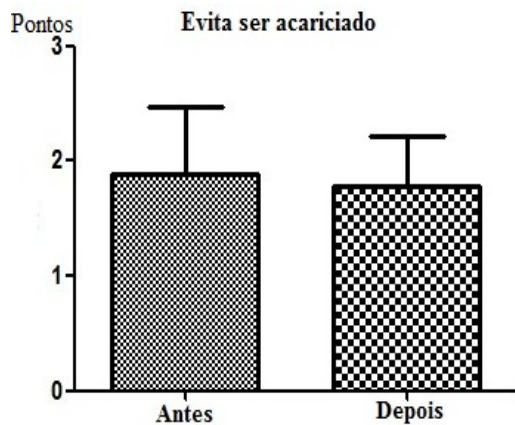


Figura 25: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença não significativa no teste t pareado ($p=0,8337$)

O item “evita ser acariciado”, deixou dúvida entre os tutores no sentido de aceitar carinho ou levar susto ao ser tocado, o que é mais observado no animal com DCC, dos 10 animais atendidos, 8 apresentavam esse sinal, e esses 8 melhoraram após o tratamento. Os tutores responderam com a interpretação de “aceitar carinho, por isso o sinal de “levar susto ao ser tocado” não pôde ser avaliado estatisticamente.

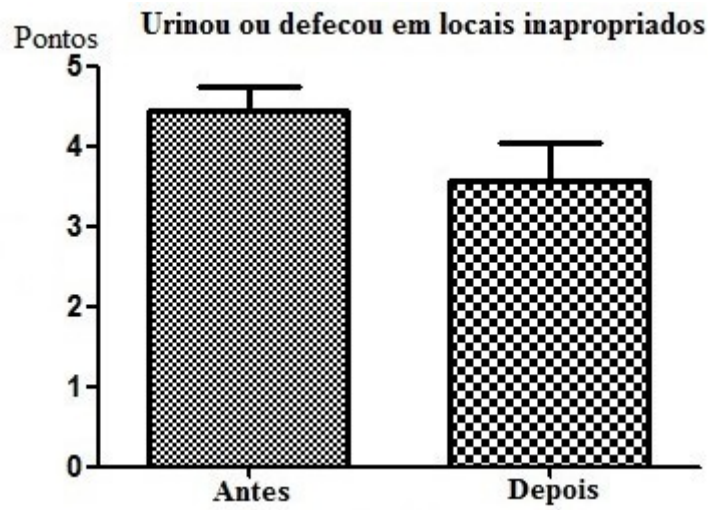


Figura 26: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina no item “Urinou ou defecou em locais inapropriados”, antes e após tratamento por acupuntura. Foi observada diferença não significativa no teste t pareado ($p=0,0865$)

Alguns itens que apresentaram diferença significativa nos dois questionários coincidem. “Atividade e interação” coincidem com “seu cão se mantém ativo”, “comportamento repetitivo” coincide com “anda de um lado para o outro” e “olha fixo”, “memória” coincide com falha ao reconhecer. Outros como ciclo de sono e vigília e apetite são itens apresentados somente no questionário 1, assim como “tem dificuldade para encontrar comida”, só aparece no questionário 2, que está relacionado à cognição ou até mesmo olfato.

A melhora clínica dos animais está relacionada também à múltipla função dos pontos utilizados. Seguindo a Medicina Tradicional Chinesa, os pontos foram escolhidos no sentido de tonificar a função do rim, pensando-se na função encefálica e no sentido de acalmar o shen para que fosse regulado o ciclo de sono-vigília. Porém, pontos como R3, E36 e B23 atuam no controle da dor, e como esses animais certamente apresentam alterações degenerativas a nível ósseo, foram beneficiados também nesse sentido. Em relação ao item apetite, o ponto E36 exerce ação nesse aspecto, melhorando a qualidade do sangue e a energia Qi nutritiva, restaura também a consciência. O YT acalma a mente e reforça a ação de todos os pontos. O PC6 revigora o sangue e acalma a mente. VG20 além de beneficiar o cérebro e os sentidos, também resolve prolapsos (canino M1 apresentava pequeno prolapso de reto, que foi resolvido durante o período de atendimento). B23 nutre a essência, fortalece a coluna lombar, beneficia ossos e medula, ilumina os olhos. R3 também fortalece a lombar, acalma a mente e beneficia a essência (MACIOCIA, 2007; SCHOEN, 2006; XIE, 2011).

A não adesão do protocolo semanal de alguns dos animais parece não ter tido interferência nos resultados dos questionários, dados os resultados estatísticos.

O tempo de 4 semanas de tratamento é considerado um tempo curto para avaliar o efeito do tratamento que deverá ser de longo prazo, dada a cronicidade da doença. Mas foi notável a melhora clínica desses animais nesse curto período.

Todos os animais obtiveram melhora no estado geral depois das quatro semanas de tratamento. Foi relatado pelos tutores que a acupuntura melhorou a qualidade do sono dos animais, o humor, que ficaram mais atentos, que passaram a ficar mais orientados e ativos. Para animais que diminuíram ou cessaram o andar compulsivo, foi relatado que ficaram mais sonolentos e relaxados, o que à primeira vista poderia ser interpretado como piora dos sinais, mas corresponde a conquista do conforto e bem-estar para esses cães.

4.4 Relação das enzimas e acupuntura

Os gráficos e as análises estatísticas dos resultados das atividades das enzimas também foram confeccionados utilizando-se a ferramenta GraphPad Prism 5. Foi realizado o teste t pareado, com o objetivo de verificar se houve diferença significativa entre os resultados das enzimas (variáveis numéricas), entre os dois grupos de interesse (resultados antes e resultados depois do tratamento por acupuntura). As amostras são dependentes, ou seja, cada animal foi medido mais de uma vez, e a amostra está normalmente distribuída.

Como não há parâmetros clínicos documentados para as dosagens dessas enzimas para avaliação do DCC, somente foi feita a interpretação do efeito esperado pela acupuntura frente às funções dessas enzimas no organismo. Os dados relacionados ao diagnóstico pelas atividades enzimáticas serão discutidos em tese de doutorado da pesquisadora Soraia John: “Enzimologia aplicada a uma nova abordagem de diagnóstico da disfunção cognitiva canina e à busca de novos adjuvantes ao tratamento desta patologia”, cujos dados serão publicados em breve.

Os resultados das análises das enzimas estão representados nos gráficos da figura 27.

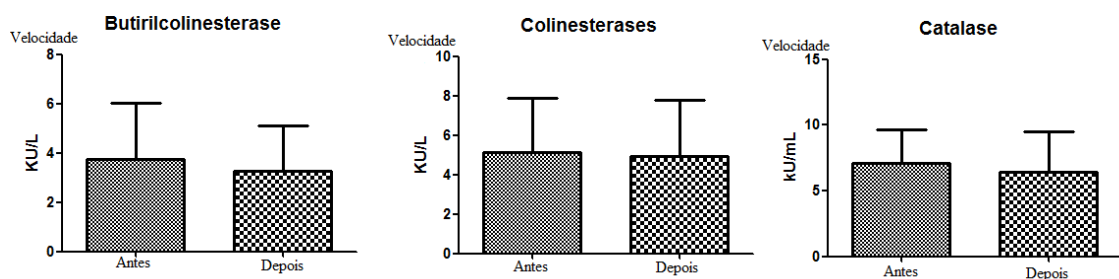


Figura 27: Pontuação média (+/- DP) obtida na atividade das enzimas antes e após tratamento por acupuntura de cães com Disfunção Cognitiva. Foi observada diferença não significativa no teste t pareado ($p > 0,05$)

A análise estatística da atividade da BChE apresentou resultado considerado não significativo ($p=0,5479$). Esperava-se que a atividade da BChE antes do tratamento estivesse maior que no final do tratamento, uma vez que na DA a atividade dessa enzima está aumentada, justificando o déficit colinérgico nesses pacientes.

A análise estatística de ChE apresentou resultado considerado como não significativo ($p=0,7483$). Assim como a BChE, esperava-se que a atividade da ChE antes do tratamento estivesse maior que no final do tratamento, pelo mesmo motivo apresentado para a BChE, o déficit colinérgico dos pacientes com DA.

A análise estatística da atividade da catalase também apresentou resultado considerado não significativo ($p=0,7128$). Esperava-se que a atividade da catalase aumentasse com o tratamento da acupuntura, por se tratar de uma enzima antioxidante. O efeito antioxidante aumentado justificaria a melhora no quadro clínico dos animais tratados.

4.5 Medicamentos utilizados e resultados

Na tabela 2 estão dispostos os medicamentos que já eram utilizados pelos animais antes do início do tratamento por acupuntura. Medicamentos utilizados para controle de cardiopatia, como benazepril, anlodipino, aminofilina, furosemida serão denominados “cardiopatia”; complexos vitamínicos para idosos e ômega3 serão denominados “nutracêuticos”.

Tabela 2: Medicamentos que cães com Disfunção Cognitiva já utilizavam antes do tratamento por acupuntura.

Animais	Cardiopatia	Nutracêuticos	Propentofilina	Antibióticos	Fenobarbital
M1	Não	Não	Não	Não	Não
M2	Sim	Sim	Não	Sim	Não
M3	Sim	Não	Sim	Sim	Não
M4	Sim	Sim	Não	Não	Não
M5	Não	Não	Não	Não	Não
M6	Sim	Sim	Não	Sim	Não
M7	Não	Sim	Não	Não	Não
M8	Não	Não	Não	Não	Não
M9	Não	Sim	Não	Não	Sim
M10	Não	Não	Não	Não	Não

Dos medicamentos utilizados pelos animais participantes da pesquisa, somente nutracêuticos e propentofilina são considerados tratamento para DCC, e como somente um animal utilizava propentofilina, foi escolhida a categoria nutracêuticos para fim de comparação entre os resultados.

Tanto os animais que utilizavam nutracêuticos quanto os animais que não faziam uso desses suplementos, tiveram diferença significativa nos questionários 1 e 2, figura 28 e figura 29, respectivamente.

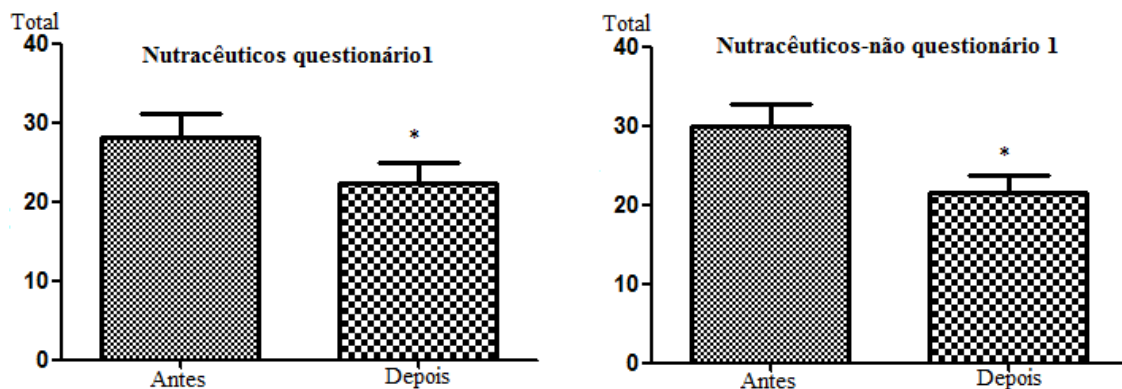


Figura 28: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Rofina et al (2006) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, antes e após tratamento por acupuntura. 5 animais utilizavam nutracêuticos e 4 não utilizavam. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0001$)

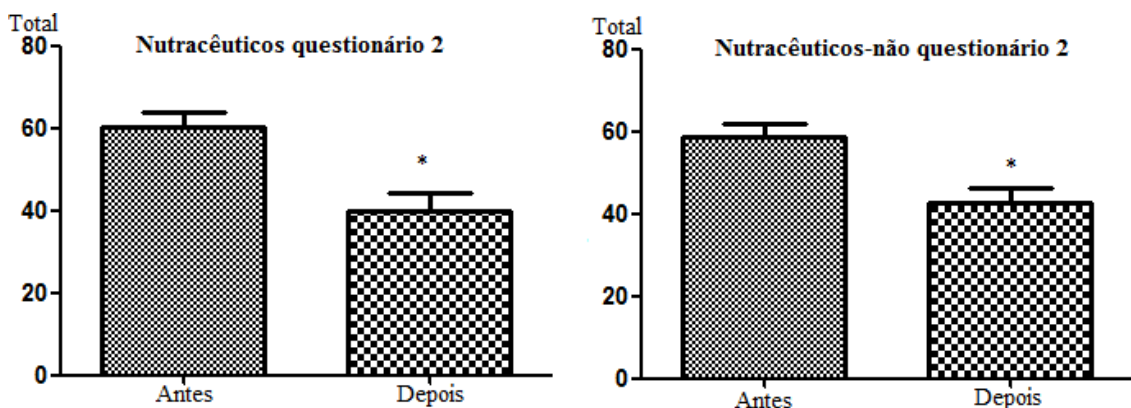


Figura 29: Pontuação média (+/- DP) obtida da aplicação do questionário proposto por Salvin et al (2011) em 9 cães com diagnóstico de Disfunção cognitiva canina, antes e após tratamento por acupuntura. 5 animais utilizavam nutracêuticos e 4 não utilizavam. Foi observada diferença significativa no teste t pareado ($p=0,0001$)

5 CONCLUSÃO

O tratamento por acupuntura nos pontos Yintang, VG20, PC6, B23, E36 e 3R, durante dez minutos, uma vez por semana, durante quatro semanas melhora os sintomas da DCC em cães.

As dosagens das atividades enzimáticas não tiveram alteração significativa nos quesitos antes e depois da acupuntura. Porém, por não existirem parâmetros laboratoriais dessas enzimas para cães, é necessário que se façam mais estudos a cerca desse tema.

Os animais que não utilizavam antioxidantes tiveram melhora nos sinais de DCC, assim como os animais que faziam uso desses medicamentos. Dessa forma, o resultado do tratamento por acupuntura para DCC independe do uso de antioxidantes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, J. A., NOBREGA, J. N., RAYMOND, R., MILGRAM, N.W. Aged dogs demonstrate both increased sensitivity to scopolamine impairment and decreased muscarinic receptor density. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. v. 98. p. 203-209, 2011.

AZKONA, G., GARCÍA-BELENGUER, S., CHACÓN, G., ROSADO, B., LÉON, M., PALACIO, J. Prevalence and risk factors of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in geriatric dogs. **Journal of Small Animal Practice**. v. 50. p. 87-91, 2009.

BERNEDO, V., INSUA, D., SUÁREZ, M., SANTAMARINA, G., SARASA, M., PESINI, P. β -Amyloid cortical deposits are accompanied by the loss of serotonergic neurons in the Dog. **The Journal of Comparative Neurology**. v. 513. p. 417-429, 2009.

BONO, G. **Investigação de associação entre a Butirilcolinesterase e a doença de Alzheimer**. 2014. 96 f. Dissertação (Mestrado em Genética). Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2014.

CAO, Y., ZHANG, L., WANG, J., DU, S., XIAO, L., TU, J., LIU, C. Mechanisms of acupuncture effect on Alzheimer disease in animal-based researches. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v. 16. p. 574-578, 2016.

CUMMINGS, B.J., SATOU, T., HEAD, E., et al. Diffuse plaques contain C-terminal A β 42 and not A β 40: Evidence from cats and dogs. **Neurobiology of Aging**. v. 17 p. 653-659, 1996.

ELLMAN, G.L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**. v. 7. n. 2. p. 88-95, 1961.

FAHNESTOCKA, M., MARCHESEA, M., HEAD, E., POP, V., MICHALSKIA, B., MILGRAM, W. M., COTMAN, C.W. BDNF increases with behavioral enrichment and an antioxidant diet in the aged dog. **Neurobiology of Aging**. v. 33. p. 546-554, 2012.

FRANK, D. Cognitive Dysfunction in Dogs. **Hill's European Symposia on Canine Brain Ageing**. 2002.

GHI, P., Di BRISCO, F., DALLORTO, D., OSELLA, M.C., ORSETTI, M. Age-related modifications of egr1 expression and ubiquitin-proteasome components in pet dog hippocampus. **Mechanisms of Aging and Development**. v. 130. p. 320-327, 2009.

HEAD, E. Brain Aging in Dogs: Parallels with Human Brain Aging and Alzheimer's Disease. **Veterinary Therapeutics**. v. 2. n. 3. p. 247-260, 2001.

HEAD, E., CALLAHAN, H., CUMMINGS, B., COTMAN, C., RUEHL, W., MUGGENBERG, B., MILGRAM, N. Open field activity and human interaction as a function of age and breed in dogs. **Physiology & Behavior**. v. 62. n. 5. p. 963-971, 1997.

HEAD, E., ROFINA, J., ZICKER, S. Oxidative stress, aging and CNS disease in the canine model of human brain aging. **Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice**. v. 38. p. 167-171, 2008.

INADA, T. **Técnicas simples que complementam a acupuntura e a moxabustão**. São Paulo: Roca. 2003.

JINATTA, J. Laser acupuncture at GV20 improves brain damage and oxidative stress in animal model of focal ischemic stroke. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**. 2017.

LAFLAMME, D. P. Nutricional care for aging cats and dogs. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. v. 42. p. 769-791, 2012.

LANDSBERG, G. Therapeutic agents for the treatment of cognitive dysfunction syndrome in senior dogs. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 29. n. 3. p. 471-479, 2005.

LANDSBERG, G., et al. Cognitive dysfunction syndrome a disease of canine and feline brain aging. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. v. 42. p. 749-768, 2012.

LEUNG, A.W., LAM, LC., KWAN, A.K., TSANG, C.L., ZHANG, H.W., GUO, Y. Q., Xu. CS7. Electroacupuncture for older adults with mild cognitive impairment: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 16 p. 232, 2015.

MACIOCIA, G. **Fundamentos da medicina chinesa**. São Paulo: ROCA. 658p, 2007.

NELSON, D., KIESOW, L. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25C (with molar extinction coefficients of H₂O₂ solutions in the UV). **Analytical Biochemistry**. v. 49. p. 474-478, 1972.

NENCINI, A., CASTALDO, C., COMERY, T. A., DUNLOP, J., GENESIO, E., GHIRON, C., HAYDAR, S., MACCARI, L. MICCO, I., TURLIZZI, E., ZANALETI, R., ZHANG, J. Design and synthesis of a hybrid series of potent and selective agonists of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.78. p. 401-418, 2014.

OSELLA, M. C., RE, G., ODORE, R., GIRARDI, C., BADINO, P., BARBERO, R., BERGAMASCO, L. Canine cognitive dysfunction syndrome: prevalence, clinical signs and treatment with a neuroprotective nutraceutical. **Animal Behaviour Science**. v. 105. p. 297-310, 2007.

PANTOJA, L.N. **Contribuição ao diagnóstico clínico da disfunção cognitiva canina**. Dissertação. Mestrado em Medicina Veterinária. Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

PHUNCHAGO, N., WATTANATHORN, J., CHAISIWAMONGKOL, K. Acupuncture Reduces Memory Impairment and Oxidative Stress and Enhances Cholinergic Function in an Animal Model of Alcoholism. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**. p. 23-29, 2015.

ROFINA, J.E., VAN EDEREN, A.M., TOUSSAINT, M.J., SECREVE, M., VAN DER SPEK, A., VAN DER MEER, I., VAN EERDENBURG, F.J., GRUYS, E. Cognitive disturbances in old dogs suffering from the canine counterpart of Alzheimer's disease. **Brain Research**. v. 1069. p. 216-226, 2006.

SALVIN, H. E., et al. The canine cognitive dysfunction rating scale (CCDR): A data-driven and ecologically relevant assessment tool. **The Veterinary Journal**. 2011. v. 188. p.331-336.

SCHOEN, A.M. **Acupuntura Veterinária - Da Arte Antiga à Medicina Moderna**. 2ª Ed. São Paulo: Roca. 2006.

SCHÜTT, T., TOFT, N., BERENDT, M. A comparison of 2 screening questionnaires for clinical assessment of canine cognitive dysfunction. **Journal of Veterinary Behavior**. v. 10. p. 452-458, 2015.

STUDZINSKI, C. M., et al. Visuospatial function in the beagle dog: An early marker of cognitive decline in a model of human aging and dementia. **Neurobiology of Learning and Memory**. v.86. p. 197-204, 2006.

STUDZINSKI, C.; ARAUJO, J.; MILGRAM, N. The canine model of human cognitive aging and dementia: pharmacological validity of the model for assessment of human cognitive-enhancing drugs. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**. v. 29. n. 3. p. 489-498, 2005.

TANG, Y., YU S., CHEN, J., ZHANG, W. Acupuncture on gnosis and acetylcholinesterase in senile dementia patients. **Journal of Acupuncture and Tuina Science**. v. 1. n. 1, 2013.

WANG, Z., NIE, B., LI, D., ZHAO, Z., HAN, Y., SONG, H., XU, J., SHAN, B., LU, J., LI, K. Effect of Acupuncture in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease: A Functional MRI Study. **PLOS ONE**. v. 7. issue 8. E 42730, 2012.

XIE, H.; PREAST, V. **Acupuntura Veterinária Xie**. São Paulo: MedVet. 2011.

ZHOU, J., PENG, W., XU, M., LI, W., LIU Z. The Effectiveness and Safety of Acupuncture for Patients With Alzheimer Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **Fogarty. S**, ed. *Medicine*. v. 94(22). e933. doi:10.1097/MD.0000000000000933, 2015.

ZHOU, J., PENG, W., XU, M., LI, W., LIU, Z. Acupuncture for patients with Alzheimer disease: a systematic review protocol. **BJM Open**. 2014.

7 ANEXO

ANEXO 1 - Folder De Divulgação Da Pesquisa

Seu cão idoso (a partir de 8 anos) passou a não dormir à noite?

- Está interagindo menos com os membros de sua família?
- Erra nos hábitos de higiene (xixi e cocô no local errado)?
- Fica perdido na própria casa ou não consegue ultrapassar obstáculos simples?

Ele pode ter DCC (disfunção cognitiva canina), o "Alzheimer canino"

Estamos propondo tratamento alternativo para essa doença, em dissertação de mestrado da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

O tratamento dos animais selecionados será gratuito e poderá ser realizado em Seropédica ou em Nova Iguaçu



Contato: (21) 97555-5535- Manoella Tuppan

Médica Veterinária-CRMV RJ 8412-Aluna de Mestrado PPGMV/UFRRJ



ANEXO - 2: Termo De Consentimento Livre E Esclarecido

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Animal n°: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA E

RESPONSÁVEL: A- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE:

Nome: _____ Raça: _____ Pelagem: _____

Sexo: (M) (F) Castrado? () SIM () NÃO Data de Nascimento: ____/____/____.

B- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO RESPONSÁVEL LEGAL:

Nome: _____

Identidade: _____ CPF: _____ Sexo ____ -Tel: _____

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____

Email: _____

II – DADOS DA PESQUISA: PROGRAMAS DE PÓS GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA E QUÍMICA

A-TÍTULO DO PROTOCOLO DA PESQUISA: “Enzimologia aplicada a uma nova abordagem de diagnóstico da disfunção cognitiva canina e à busca de novos adjuvantes ao tratamento desta patologia”

B-TÍTULO DO PROTOCOLO DA PESQUISA: “Disfunção cognitiva canina : comparação de modelos-diagnósticos e efeitos do tratamento por acupuntura”

C- PESQUISADORES: SORAIA JOHN DA SILVA (DOUTORANDA) - CRISTIANE MARTINS CARDOSO DE SALLES (ORIENTADORA)- MANOELLA TUPPAN DA ROCHA LIMA (MESTRANDA) MAGDA ALVES MEDEIROS (ORIENTADORA)

C- GRAU DE RISCO DA PESQUISA: SEM RISCO

IV - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

A - Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

B - Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo.

C - Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.

V. INFORMAÇÕES DE NOMES E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS:

Méd. Vet. Soraia J. da Silva soraiajohndasilva@gmail.com Cel: (21) 98826
7933

Méd. Vet. Manoella T. R. Lima manutuppanvet@yahoo.com.br Cel:

(21)
988267933

Profª Drª. Magda Alves magda.medeiros@gmail.com Cel: (21) 99427-
Medeiros 8179

VI - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que foi explicado, consinto que meu animal participe do presente Protocolo de Pesquisa.

Local: _____, _____ de _____ de _____.

Assinatura do pesquisador

Assinatura do responsável legal

ANEXO 3 - Ficha De Cadastro

Nome:	Raça:	Pelagem:	Peso:
Sexo:	Idade:		
Nome do tutor:			
Endereço:			
Telefone:			
Antecedentes clínicos:			
Castrado?	Caso afirmativo: com que idade, qual o motivo? Mudou o comportamento? Já teve cria?		
Se o animal não é castrado, você planeja que ele procrie? () Sim () Não			
Seu cão já cruzou? () Sim () Não			
Se já castrado e fêmea, quantosaios ocorreram antes da gestação?			
Data da última visita ao veterinário:	Motivo:		
Vacinado? () Sim () Não	Qual(is) vacinas?		
Vermifugado? () Sim () Não	Pulgas? () Sim () Não		
Carrapatos? () Sim () Não			
Faz uso de medicamento(s)? () Sim () Não	Qual (is) e desde quando?		
Já fez alguma cirurgia? () Sim () Não	Qual(is)?		
Possui outros animais? () Sim () Não	Qual(is)? Algum animal doente? Como é o relacionamento entre eles?		
Problema atual:			
Histórico:			
Seu animal possui alteração comportamental anterior ao envelhecimento?			
Você acha que o aparecimento do problema comportamental foi motivado por algum fato (sons, pessoas estranhas)? () Sim			
() Não Qual?			

ANEXO 4 - Ficha Comportamental

FICHA COMPORTAMENTAL

Animal no. _____

data: ___/___/_____

Pesquisador: _____

Nome:	Raça:	Sexo	Peso:
Proprietário:			
Aspectos gerais			
Idade do animal adoção/compra: _____ Quanto tempo tem este animal? _____			
Outros donos? () S () N Quantos? _____ Não sabe? _____			
Por que ele foi doado?			
Há quanto tempo você tem?			
Como você adquiriu este animal? () Encontrado na rua () Abrigo de animais; () Compra em Canil/Pet-shop () Adoção de Amigo; () Outro Qual?			
Por que você adquiriu este animal?			
Você permite que seu cão: () Corra livre sem guia na rua; () Corra livre no canil/quintal/casa; () Ande com coleira; () Ande sem coleira com sua supervisão; () Fique apenas dentro de casa			
Qual tipo de moradia você vive? () Apartamento; () Casa na cidade/Condomínio () Casa com quintal pequeno () Casa com quintal grande; () Sítio/Fazenda			
Quantas vezes seu cão caminha ou sai de casa por dia?			
Se seu cão caminha, qual a média de tempo de cada caminhada (em minutos)?			
Quantas vezes seu animal se alimenta por dia?			
Quantas vezes seu animal come petiscos por dia (Biscoitos, bifinhos)?			
O que exatamente seu animal come? (incluir marcas de ração/alimento humano)?			
Seu cão tem alergia?			
Houve alguma mudança significativa na sua casa desde que adquiriu este animal? Se sim, qual? () Morte de pessoa da família () Morte de animal da família () Divórcio () Casamento () Nascimento de bebê () Criança movida () Animais adicionados () Mudança de casa () Rotina da família mudada (perda ou ganho de emprego) () Outros Descreva:			
Onde seu animal dorme? () Em cima da sua cama () Embaixo da sua cama () Na cama dele no seu quarto () Numa caixa no seu quarto () No chão do seu quarto () Fora do seu quarto porque você não deixa ele entrar () Em outro quarto voluntariamente () Numa caixa em outro quarto			
Você brinca com brinquedos ou jogos com seu animal dentro ou fora de casa diariamente? _____ Com que frequência? _____			
Como você se prepara para sair de casa quando o animal vai ficar sozinho? () Você ignora seu animal; () você busca por ele e se despede () Você demonstra um afeto exagerado por ele?			
O que seu animal faz quando você se prepara para sair?			
Seu cão foi adestrado? () S () N Se sim: Como? Onde? Quanto tempo? Idade do início do treinamento? Idade			

do fim do treinamento? Quais os comandos ele obedece?

Como seu animal reage a estranhos?

Como seu animal se comporta no veterinário?
Seu animal já esteve num hotel para cães? () S () N Como se comportou?
Seu animal já esteve num banho/tosa para cães? () S () N Como se comporta?
Histórico de comportamentos estereotipados ou ritualísticos
Em qual das categorias abaixo o animal se adequa? () Autolesivo (mastigando si próprio, sucção do flanco); () alucinatório (olhar paralisado, ataque a objetos invisíveis); () orais (mastigar pedra/sujeira/outros objetos); () locomotor (andar em círculo, correr atrás da cauda); () vocalização (Latido rítmico, latido, rosnar, uivar)
Houve alguma mudança na casa ou algum evento que possa ser associado com o desenvolvimento do comportamento? Qual?
Existe alguma hora do dia que o comportamento se mostra mais ou menos intenso? Que parte do dia?
A presença de uma pessoa/outro animal faz aumentar a intensidade do comportamento? Quem?
Qual a atitude do animal quando realiza o comportamento? () Angústia () Medo () Alívio
O animal responde pelo seu nome ou aparenta consciência do seu arredor durante a manifestação do comportamento?
É possível fazer o animal parar a manifestação do comportamento chamando por ele ou utilizando uma restrição física?
Existe um local que o animal prefere para manifestar o comportamento? Qual?
Para distúrbios orais, que tipo de objetos são ingeridos? Seja bem específico.
Existe um padrão de comportamento? Qual a duração, frequência e características? () Padrão (após a refeição/pela manhã) () Duração (dia, semana, meses) () Frequência (de hora em hora, diariamente, esporadicamente)
Algum evento ou comportamento rotineiro ocorre imediatamente antes ou após o comportamento iniciar?
O comportamento geral do animal mudou de alguma maneira desde que apareceu o comportamento atípico (cão mais afastado, cão mais agressivo)?
O animal teve a sua dieta alterada recentemente?
Histórico de agressividade canina
Seu cão tem histórico de agressividade (já mordeu alguém)? Quando iniciou?
Há ação legal tomada contra o proprietário decorrente da mordida do seu animal?
Frequência de ocorrência do comportamento indesejável (mordedura): () Diário () Semanal () Mensal
A frequência ou a intensidade de ocorrência do comportamento mudaram desde que o problema começou? () S () N
Correção e/ou terapia medicamentosa até o momento? () S () N Resultado?
Os pais do animal apresentam comportamento similar?
Você sabe se outros filhotes da mesma ninhada apresentam comportamento similar?

ANEXO 5 - Questionário 1

Questionário desenvolvido por Rofina et al. (2006).

Animal: _____

Pontos

Desorientação

1. não apresenta 2. em lugares desconhecidos 3- em lugares de rotina 4- em casa

Ciclo de sono e vigília

1. normal 2. dorme mais 3- dorme durante o dia e fica acordado à noite

Urina e fezes

1. urina e defeca nos locais de costume 2. urina dentro de casa 3- urina e defeca em qualquer local da casa

Atividade e interação

1. normal 2. diminuído 3- não interage com outros animais ou com o tutor

Apetite

1. normal 2. diminuído 3-aumentado e com diarréia 4- aumentado e sem diarréia

Ingestão de água

1. normal 2. diminuído 3-aumentado

Comportamento repetitivo

1. se apresenta em comportamento repetitivo 2. olha “fixo” para o nada 3- anda sem rumo 4- anda em círculos

Perda da percepção

1. sem alteração 2. bate em obstáculos 3- tenta passar por espaços estreitos

4- tenta
passar pelo
lado errado da
porta

Memória

1. normal 2. não reconhece
familiares

3-
n
ã
o

r
e
c
o
n
h
e
c
e

o

t
u
t
o
r
a
p
ó
s

u

m fim de semana

ANEXO 6 - Questionário 2

Animal no. _____

Questionário 2

Questionário, desenvolvido por Salvin et al. (2011).

						Pont os
Anda de um lado para outro, anda em círculos ou vaga sem direção ou propósito?	Frequência					
	Nunca (1) <input type="checkbox"/>	1x/mês (2) <input type="checkbox"/>	1x/sem (3) <input type="checkbox"/>	1x/dia (4) <input type="checkbox"/>	>1x/dia (5) <input type="checkbox"/>	
	Comparando com os últimos 6 meses					
	Muito menos (1) <input type="checkbox"/>	Um pouco menos (2) <input type="checkbox"/>	Sem alteração (3) <input type="checkbox"/>	Um pouco mais (4) <input type="checkbox"/>	Muito mais(5) <input type="checkbox"/>	
Olha fixamente para paredes ou chão?	Frequência					
	Nunca (1) <input type="checkbox"/>	1x/mês (2) <input type="checkbox"/>	1x/sem (3) <input type="checkbox"/>	1x/dia (4) <input type="checkbox"/>	>1x/dia (5) <input type="checkbox"/>	
	Comparando com os últimos 6 meses					
	Muito menos (1) <input type="checkbox"/>	Um pouco menos (2) <input type="checkbox"/>	Sem alteração (3) <input type="checkbox"/>	Um pouco mais (4) <input type="checkbox"/>	Muito mais(5) <input type="checkbox"/>	
portas Falha ao reconhecer pessoas ou outros animais?	Frequência					
	Nunca (1) <input type="checkbox"/>	1x/mês (2) <input type="checkbox"/>	1x/sem (3) <input type="checkbox"/>	1x/dia (4) <input type="checkbox"/>	>1x/dia (5) <input type="checkbox"/>	
	Comparando com os últimos 6 meses					x3=
	Muito menos (1) <input type="checkbox"/>	Um pouco menos (2) <input type="checkbox"/>	Sem alteração (3) <input type="checkbox"/>	Um pouco mais (4) <input type="checkbox"/>	Muito mais(5) <input type="checkbox"/>	
Tenta ultrapassar paredes ou	Frequência					
	Nunca (1) <input type="checkbox"/>	1x/mês (2) <input type="checkbox"/>	1x/sem (3) <input type="checkbox"/>	1x/dia (4) <input type="checkbox"/>	>1x/dia (5) <input type="checkbox"/>	
Evita ser acariciado?	Frequência					
	Nunca (1) <input type="checkbox"/>	1x/mês (2) <input type="checkbox"/>	1x/sem (3) <input type="checkbox"/>	1x/dia (4) <input type="checkbox"/>	>1x/dia (5) <input type="checkbox"/>	
Tem dificuldade de encontrar comida deixada no chão?	Frequência					
	Nunca (1) <input type="checkbox"/>	1-30% das vezes (2)	30-60% das vezes (3) <input type="checkbox"/>	61-99% das vezes (4) <input type="checkbox"/>	Sempre (5) <input type="checkbox"/>	