

## ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

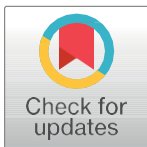
# Perfil de la cohorte: El Golden Retriever Lifetime Study (GRLS)

Julia Labadie<sup>1\*</sup>, Brenna Swafford<sup>1</sup>, Mara DePena<sup>1</sup>, Kathy Tietje<sup>1</sup>, Rodney Page<sup>2‡</sup>, Janet Patterson-Kane<sup>1‡</sup>

**1** Departamento de Programas Científicos, Morris Animal Foundation, Denver, Colorado, Estados Unidos, **2** Flint Animal Cancer Center, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, Estados Unidos

Los principales autores de este trabajo son ‡ RP y JPK.

\* <mailto:mjdlabadie@gmail.com>



## Resumen:

Con este artículo, se espera brindar una descripción detallada del Golden Retriever Lifetime Study (GRLS). Este es un estudio de cohortes prospectivo mediante el que se investigan los factores de riesgo genéticos, nutricionales, ambientales y del estilo de vida que puedan producir cáncer y otras enfermedades frecuentes en los perros. Entre los resultados principales de interés se incluyen el hemangiosarcoma, el linfoma, el osteosarcoma y los tumores de mastocitos de alto grado. Entre los resultados secundarios de interés se incluyen otros tipos de cáncer, el hipotiroidismo, la epilepsia, la atopía, la otitis externa, la displasia de cadera, la insuficiencia cardíaca y la insuficiencia renal. Desde junio de 2012 hasta abril de 2015, 3,044 *golden retrievers* estadounidenses de entre 6 meses y 2 años completaron la inscripción inicial en el estudio. Al 31 de mayo de 2021, 2,251 perros permanecen en el estudio, 352 murieron y 441 se perdieron durante el seguimiento. Los propietarios y veterinarios completan cuestionarios anuales extensos donde se reúne información sobre el estilo de vida, las exposiciones a factores ambientales, la actividad física, los antecedentes reproductivos, el comportamiento, la alimentación, el uso de medicamentos y los diagnósticos. Además, a los perros se les hacen exámenes veterinarios anuales y se toman muestras biológicas (sangre, suero, pelo, uñas, heces, orina) para su almacenamiento en biobancos. En caso de neoplasias malignas o muertes, se realiza un informe adicional donde se incluye histología y biobancos de tumores. Cuando un animal muere, se obtiene la historia clínica completa y se solicitan necropsias a discreción del propietario. 218 perros se sometieron a necropsias totales o parciales. Los datos de los cuestionarios están disponibles de forma gratuita para los investigadores con credenciales aprobadas que acepten un acuerdo de uso de datos. Además, los investigadores pueden hacer propuestas para utilizar las muestras biológicas u obtener más información.

## ACCESO ABIERTO

**Citación:** Labadie J, Swafford B, DePena M, Tietje K, Page R, Patterson-Kane J (2022) Perfil de la cohorte: El Golden Retriever Lifetime Study (GRLS). PLoS ONE 17(6): e0269425. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269425>

**Editora:** Silvia Sabattini, Universidad de Bolonia, Italia

**Fecha de recepción:** 17 de diciembre de 2021

**Fecha de aceptación:** 20 de mayo de 2022

**Fecha de publicación:** 9 de junio de 2022

**Derechos de autor:** © 2022 Labadie *et al.* Este es un artículo de acceso abierto distribuido bajo los términos de [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), que permite su uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que el trabajo original se cite de manera adecuada.

**Declaración de disponibilidad de datos:** En los archivos de la sección de [Información complementaria](#), se proporciona un conjunto de datos analíticos.

La información de identificación individual se eliminó del conjunto de datos para proteger la privacidad de los participantes.

**Financiamiento:** Se contó con el respaldo de la Morris Family Foundation, la Blue Buffalo Cancer Research Foundation, la Petco Foundation, Zoetis, Antech Inc., la Golden Retriever Foundation, la Hadley and Marion Stuart Foundation, Mars Veterinary, generosos patrocinadores del sector privado y el Flint Animal Cancer Center de la Universidad Estatal de Colorado.

## ¿Por qué se inició el estudio de cohortes?

De acuerdo con la Asociación Americana de Medicina Veterinaria, la población canina de Estados Unidos en 2016 era de 76.8 millones, con presencia en 48.3 millones de hogares [1]. El cáncer es una causa importante de morbilidad y mortalidad canina y se estima que provoca la muerte de aproximadamente uno de cada cuatro perros. Hay varias razas que tienen un mayor riesgo de padecer uno o más tipos específicos de cáncer [2, 3]. Debido a las similitudes clínicas y morfológicas, los perros se usan cada vez más como modelos naturales de las enfermedades humanas, en especial, de determinados tipos de cáncer [4].

Además, se contó con una subvención de la V Foundation for Cancer Research DC2019-044 y DC2019-045. Los financiadores no intervinieron en el diseño del estudio, la obtención y el análisis de los datos, la decisión de publicar o en la preparación del manuscrito.

**Conflicto de intereses:** Los autores declaran que no hay conflicto de intereses.

Estos son los beneficios de los modelos caninos: 1) disminución en la variación genética de las razas caninas [5–7], lo que mejora la capacidad de detectar los factores de riesgo genéticos de una enfermedad, 2) exposiciones a factores ambientales similares a las de sus propietarios, 3) una esperanza de vida más baja, lo que permite que los investigadores hagan un seguimiento a los perros desde el nacimiento hasta la muerte dentro de <20 años.

Para aprovechar estos beneficios, se inició el Golden Retriever Lifetime Study (GRLS), un estudio de cohortes longitudinal. Se eligió una raza de perro específica para limitar la variación genética, favorecer el estudio de los factores no genéticos y aumentar las probabilidades de obtener estrategias de bienestar pertinentes para la raza. El American Kennel Club clasifica a los perros *golden retriever* entre las cinco razas más populares de los Estados Unidos. Como esta tendencia se mantiene en todos los estados, se espera que los entornos en los que esta raza reside sean relativamente diversos. Por lo general, los *golden retrievers* se caracterizan por su temperamento “alegre” y su facilidad de adiestramiento, es decir, es muy probable que se muestren dóciles cuando se los lleva al veterinario para consultas anuales complejas [8, 9]. Asimismo, esta raza es muy propensa al cáncer. En 1998, en una encuesta a 1,444 *golden retrievers* realizada por el Golden Retriever Club of America, se indicó que el cáncer provocó el 61% de 420 muertes de perros. Los tipos más frecuentes de cáncer eran el hemangiosarcoma, el linfoma, el tumor de mastocitos y el osteosarcoma [9]. En un reciente estudio de necropsia de 652 *golden retrievers* en un hospital veterinario universitario de EE.UU., se documentó una tasa de mortalidad relacionada con el cáncer del 65%. El diagnóstico más frecuente era el hemangiosarcoma, seguido de las neoplasias linfoides [10]. En estudios realizados en el Reino Unido y Escandinavia, se documentaron tasas más bajas de cáncer entre los *golden retrievers* (de 20 a 39%), en poblaciones registradas en clubes caninos o inscritas en compañías de seguros para mascotas [11–13]. Aún no se realizaron comparaciones directas entre cohortes diferentes, pero es probable que sirvan para abordar los problemas que limitan la generabilidad de los estudios de una sola cohorte, incluido el sesgo de selección.

El GRLS cuenta con la gestión y financiación de la Morris Animal Foundation (MAF), una organización sin fines de lucro ubicada en la ciudad de Denver en el estado de Colorado. La fundación invierte internacionalmente en ciencia para mejorar la salud animal. Los responsables de la Fundación reconocieron la importancia de un estudio de cohortes a gran escala para el seguimiento de perros individuales con el fin de identificar los factores de riesgo genéticos, ambientales y del estilo de vida que puedan producir cáncer y otras enfermedades importantes. Además reconocieron su capacidad para desarrollar, financiar y mantener una investigación de este tipo. Históricamente, los estudios de cohortes en animales de compañía han estado muy limitado por los costos y tiempo requeridos, así como por las dificultades para acceder a y comunicarse con los propietarios involucrados.

El objetivo del GRLS es evaluar los factores de riesgo genéticos, nutricionales, ambientales, reproductivos y del estilo de vida que puedan producir cáncer y otras alteraciones frecuentes en la raza [8]. El objetivo principal del estudio es documentar y recopilar los datos de 500 perros diagnosticados con los tipos de cáncer de los criterios principales de valoración: el hemangiosarcoma, el linfoma, el osteosarcoma y los tumores de mastocitos de alto grado. Sin embargo, se reúne información sobre todas las afecciones diagnosticadas para facilitar la evaluación de otros tipos de cáncer y enfermedades documentados con frecuencia en los *golden retrievers*, como el hipotiroidismo, la osteoartritis y las alergias. Los conjuntos de datos y los bancos de muestras biológicas están disponibles para análisis, tanto actuales como futuros.

El objetivo de esta Descripción de la Cohorte es proporcionar una presentación exhaustiva de la cohorte del GRLS junto con una visión general de la población de referencia, la obtención de datos, las características de los participantes, las publicaciones con revisores externos hasta la fecha, y la disponibilidad de conjuntos de datos y muestras biológicas para la comunidad científica.

## Descripción de la cohorte

En esta cohorte observacional de base poblacional, se reclutó a los propietarios de 3,044 perros *golden retriever* de entre seis meses y dos años, residentes en los Estados Unidos, para participar en el estudio desde 2012 hasta 2015. Gestionamos el análisis de los datos y muestras de la cohorte ya sea internamente en la Fundación o a través de propuestas o contratos externos. Los detalles del reclutamiento del estudio y los criterios de inclusión y exclusión se publicaron con anterioridad [8, 14]. En síntesis, se reclutó a los propietarios a través de anuncios en el Golden Retriever Club of America, la Golden Retriever Foundation, en clubes regionales de *golden retrievers*, organizaciones profesionales veterinarias y en las redes sociales.

Para su inscripción en el estudio, los dueños y los perros se seleccionaron a través de un perfil de propietario con información demográfica y de registro. La inscripción se estratificó por cinco regiones geográficas (Pacífico, Montaña, Medio Oeste, Noreste y Sur), así como por el sexo del perro y el estado de esterilización o castración. Se requería que los perros tuvieran un pedigrí de tres generaciones. Una vez que se seleccionó a los canes, los propietarios convocados completaron un consentimiento informado por escrito. Luego, completaron el cuestionario anual de propietario y realizaron la consulta veterinaria y la toma de muestras. Antes de llenar su cuestionario anual, los veterinarios confirmaron que los perros no padecían enfermedades crónicas y completaron un consentimiento informado por escrito para su participación en el estudio. El Consejo de Bienestar Animal de la Morris Animal Foundation aprobó el protocolo del estudio.

## ¿Qué información se recopiló?

### Obtención anual de datos

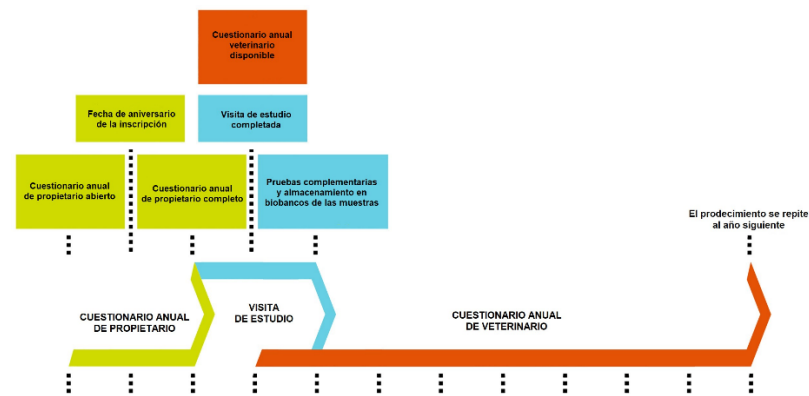
Anualmente se llevan a cabo tres componentes del estudio: el cuestionario de propietario, el examen y cuestionario veterinario y la toma de muestras. El Cuestionario Anual de Propietario está disponible desde un mes antes de la fecha de aniversario de la inscripción hasta 10 meses después de esa fecha (Fig.1), pero la mayoría de los propietarios lo completan dentro de un mes de la fecha de aniversario. En este extenso cuestionario, se solicita información sobre el estilo de vida de cada perro, los antecedentes reproductivos y de viajes, la actividad física, los medicamentos de venta libre y los antiparasitarios contra pulgas, garrapatas y parásitos del corazón que toma, los cuidados dentales en el hogar, el aseo, la alimentación y las prácticas alimentarias, el entorno, las condiciones de vida y las exposiciones a factores ambientales. Además, se solicita un cuestionario de comportamiento (C-BARQ) [15]. Una vez que el propietario completa el cuestionario, se le envía un kit de toma de muestras y se le solicita que programe su consulta anual al veterinario ("Visita de estudio"). En la Visita de Estudio, se realiza un examen físico completo y se toman muestras centrales (sangre entera, suero, orina, heces, pelo y uñas de las patas) para pruebas complementarias y su almacenamiento en biobancos.

Los veterinarios reciben un completo manual de instrucciones para la toma de muestras denominado "The Annual Veterinary Sample Kit: Collection & Shipping Instructions", disponible en <https://www.morrisanimalfoundation.org/sites/default/files/filesync/GRLS-Annual-Kit-Instructions.pdf>. En este manual, se indica cómo tomar y transportar cada una de las muestras centrales. El cuestionario para los veterinarios, el Cuestionario Anual de Veterinario, está disponible en <https://www.morrisanimalfoundation.org/sites/default/files/filesync/GRLS-Annual-Veterinarian-Questionnaire.pdf>.

En el cuestionario, se incluyen datos sobre la historia clínica de cada perro, los resultados del examen físico, como la altura a la cruz, el peso y el puntaje de condición corporal, un mapa de tumores superficiales, y los antecedentes de vacunación y de medicamentos recetados. Todas las preguntas se formulan para consultar sobre los diagnósticos recibidos y medicamentos recetados en los 12 meses previos a la Visita de Estudio. Los propietarios y veterinarios también informan la historia clínica del padre y la madre, si se conoce. Por lo general, transcurre un mes entre la finalización del Cuestionario Anual de Propietario y la Visita de Estudio. El veterinario puede completar el Cuestionario Anual de Veterinario en cualquier momento una vez finalizada la Visita de Estudio. Aunque no hay exigencias respecto a este plazo, se anima a los veterinarios a completarlo tan pronto como puedan, preferentemente antes de la próxima Visita de Estudio.

### Análisis de laboratorio anual y almacenamiento de muestras biológicas

Durante la noche, las muestras centrales se envían a un banco de muestras biológicas donde se congelan y almacenan para análisis posteriores (no se usa el método de congelación rápida). Anteriormente, se describió la información sobre la cantidad recogida y almacenada [8]. Se muestra en la [Tabla 1](#). Al principio, se extrajo el ADN de las muestras de sangre entera y se almacenó para su futuro análisis.



**Fig. 1. Cronograma y componentes del estudio.** Cada año se llevan a cabo tres componentes del estudio cerca de la fecha de aniversario de la inscripción del perro: 1) el Cuestionario Anual de Propietario, 2) la consulta veterinaria anual ("Visita de Estudio"), y 3) el Cuestionario Anual de Veterinario. El Cuestionario Anual de Propietario está disponible desde un mes antes de la fecha de aniversario de la inscripción hasta 10 meses después de esa fecha, pero la mayoría de los propietarios lo completan dentro de un mes de la fecha de aniversario. Una vez que el propietario completa el cuestionario, se le envía un kit de toma de muestras y se le solicita que programe la Visita de Estudio. En la Visita de Estudio, se realiza un examen físico completo y se toman muestras centrales para pruebas complementarias y su almacenamiento en biobancos. Por lo general, transcurre un mes entre la finalización del Cuestionario Anual de Propietario y la Visita de Estudio. El veterinario puede completar el Cuestionario Anual de Veterinario en cualquier momento una vez finalizada la Visita de Estudio. Aunque no hay exigencias respecto a este plazo, se anima a los veterinarios a completarlo tan pronto como puedan, preferentemente antes de la próxima Visita de Estudio.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269425.g001>

Actualmente estamos realizando el genotipado de todos los perros para estudios de asociación de genoma completo. En última instancia, estos datos se pondrán a disposición de los investigadores.

Durante la noche, se envían muestras adicionales de sangre, suero, heces y orina a un laboratorio veterinario de referencia para diagnósticos. Allí se hace un hemograma completo, un perfil bioquímico del suero, un análisis de las heces para detectar huevos y parásitos, un análisis de orina, una prueba de antígenos del parásito del corazón y una prueba de tiroxina total (T4) para medir los niveles de la hormona tiroidea. Los resultados se comunican a los veterinarios del estudio y se añaden a nuestra base de datos. Encontrará información detallada sobre los análisis y la metodología en la [Tabla S1](#).

## Seguimiento adicional de neoplasias malignas y muerte

Además del seguimiento anual, se indica a los propietarios y veterinarios que se pongan en contacto con nosotros en caso de una presunción o confirmación de diagnóstico de neoplasia maligna, o en caso de muerte. Si hay una presunta neoplasia maligna, enviamos a los veterinarios un kit de biopsia

**Tabla 1. Resumen de muestras de biorepositorio al 31 de mayo de 2021.**

Muestra	Temperatura de almacenamiento	Cantidad recogida en la consulta veterinaria anual	Alícuotas almacenadas a disposición de los investigadores	Número total de muestras recogidas
ADN genómico <sup>^</sup>	-80°C	N/C	Alícuotas de ADN ajustadas a una concentración de 100 ng/μl	3,044
Sangre entera <sup>^</sup>	-80°C	10 mL	Alícuotas de 250 μL	18,974
Suero	-80°C	10 mL	Alícuotas de 250 μL	18,954
Orina	-80°C	5 mL	Alícuotas de 1 ml	18,965
Heces	-80°C	~1 gramo	No disponible	18,915
Muestras de pelo	-20°C	Mechón de pelo de 2" de largo y ¼" de diámetro	1 muestra por consulta	18,875
Muestras de uñas	-20°C	Entre 5 y 10 uñas	1 muestra por consulta	18,885

<sup>^</sup>El ADN genómico se extrajo y almacenó solo para la visita de estudio inicial. La sangre entera se almacenó en el resto de las visitas.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269425.t001>

y para alteraciones linfoproliferativas, solicitamos que las muestras se envíen a nuestro laboratorio de análisis clínico para histología, con la opción de citometría de flujo y reacción en cadena de la polimerasa para el reordenamiento del receptor de antígeno (análisis PARR) realizadas en el Laboratorio de Inmunología Clínica de la Universidad Estatal de Colorado (CSU). Los veterinarios reciben un completo manual de instrucciones para la toma de muestras donde se explica cómo tomar y transportar las muestras para histopatología, citometría de flujo, análisis PARR y almacenamiento en biobancos. Con la incorporación del subtipado de linfoma en septiembre de 2019, se logró disponer de un alto porcentaje (79%) de perros con datos de inmunofenotipo. Si es posible, también solicitamos que se envíe a nuestro biobanco una muestra tumoral de 5 mm<sup>3</sup> conservada en RNALater. Una vez confirmada una neoplasia maligna, solicitamos que el veterinario complete un cuestionario adicional para obtener detalles sobre los diagnósticos y las medidas adoptadas.

Aunque no es obligatorio, es recomendable realizar una necropsia cuando muere un perro. Se solicita un cuestionario sobre la muerte y la necropsia al veterinario registrado del estudio, al último veterinario que atendió al perro y al veterinario que realizó la necropsia (si corresponde) para obtener información sobre la causa y el tipo de muerte (es decir, eutanasia o muerte natural), así como los resultados macroscópicos de la necropsia, si se dispone de ellos. Siempre que sea posible, las necropsias se realizan con kits estandarizados y un manual de toma de muestras que se entregan al veterinario. Solicitamos al veterinario que tome muestras de hígado, riñón, glándulas suprarrenales, bazo, ganglios linfáticos, corazón, y glándulas tiroideas y paratiroides, tanto enfermos como sanos, así como muestras de todos los presuntos tumores malignos. Los tejidos se fijan en formol para su histopatología y se conservan en RNALater para su envío a los biobancos. Si la necropsia se realiza en un laboratorio de análisis clínicos o por un veterinario dispuesto a hacerlo, también solicitamos una muestra de piel con pelo y ojos, pulmones, esófago, estómago, duodeno y páncreas, yeyuno, unión ileocecológica, vejiga urinaria, músculo esquelético, huesos, médula ósea, líquido sinovial, y cerebro o médula espinal. Además, solicitamos la toma de muestras centrales y de derrames para un análisis de laboratorio y su almacenamiento en biobancos a discreción del veterinario.

Tras la muerte del perro, nuestro equipo de operaciones recopila las historias clínicas completas junto con los registros del veterinario de cabecera y los de otros especialistas. Esta información sirve para determinar la causa de muerte y cualquier diagnóstico importante según sea necesario.

Nuestro objetivo es que todas las biopsias histológicas y muestras cadavéricas se sometan a un proceso de adjudicación en el que participen dos o tres patólogos independientes. Una vez que el laboratorio de análisis clínicos de referencia completa su revisión, las muestras se trasladan al Laboratorio de Análisis Veterinario de la Universidad Estatal de Colorado (CSU). Un patólogo de la CSU realiza una revisión independiente de las muestras, sin tener en cuenta los diagnósticos previos. Los resultados se informan a la MAF y el equipo de operaciones los revisa. Si los dos patólogos están de acuerdo, el caso se considera adjudicado y se le asigna un nivel de confianza de uno. Si la interpretación secundaria no coincide con el análisis inicial, un tercer patólogo realiza una revisión independiente a ciegas de las muestras. Si dos de los tres diagnósticos coinciden, el caso se considera adjudicado y se anula el diagnóstico contradictorio. Si ninguna de las interpretaciones coincide, los patólogos se reúnen para llegar a un diagnóstico de consenso. Según sea necesario, se realizan tinciones inmunohistoquímicas adicionales. Los bloques de parafina y los portaobjetos histológicos de los casos adjudicados se trasladan a la MAF. Allí se hace un inventario y se los almacena.

Debido a los costos, las preferencias del propietario y los métodos intervencionistas de toma de muestras, no todas las neoplasias malignas se diagnostican mediante histología. Por lo tanto, se han asignado niveles de confianza para todos los diagnósticos de neoplasia maligna ([Tabla S2](#)). El Nivel 1 representa un diagnóstico definitivo confirmado microscópicamente mediante una histología o citología, interpretada por un patólogo certificado. Para las alteraciones linfoproliferativas, también se acepta la citometría de flujo o el análisis PARR. El Nivel 2 representa un diagnóstico provisional basado en la visualización directa o en un diagnóstico por imágenes sin confirmación microscópica (por ejemplo, se le asignaría el hemangiosarcoma de Nivel 2 a un perro con un derrame pericárdico y un tumor en la aurícula derecha). Para que un diagnóstico se considere de Nivel 2, un especialista veterinario certificado debe realizar el diagnóstico por imagen (es decir, radiografías interpretadas por un radiólogo veterinario certificado). La citología interna (es decir, la citología interpretada por el veterinario) también se considera un diagnóstico de Nivel 2. El Nivel 3 representa un diagnóstico provisional basado solo en una sospecha clínica (por ejemplo, si el propietario del perro no acepta los resultados y el veterinario incluye el linfoma como diagnóstico diferencial, al ejemplar se le asigna el linfoma de Nivel 3).

## Cambios en el estudio a lo largo del tiempo

Desde el inicio del estudio se produjeron dos cambios operativos importantes: un cambio en el sistema de gestión de datos del estudio y un cambio en el laboratorio de análisis clínicos primario. En julio de 2020, pasamos de una empresa de gestión de estudios externa a operaciones internas. Este cambio implicó 1) poner en marcha un centro de atención telefónica para todas las comunicaciones con los participantes y veterinarios, 2) preparar y enviar todos los kits para la toma de muestras, y 3) crear una base de datos personalizada para la supervisión del estudio, la finalización de los cuestionarios y el análisis de los datos.

En diciembre de 2020, cambiamos de laboratorio de análisis clínicos. Los detalles comparativos de los instrumentos utilizados y los analitos analizados para cada laboratorio están disponibles en la [Tabla S1](#). Antes del cambio de laboratorios, realizamos un estudio de extrapolación de 1 mes en el que participaron 100 perros con el fin de evaluar si los análisis eran comparables entre ambos laboratorios. En general, los resultados fueron comparables, lo que respalda la decisión de seguir adelante con el cambio.

En su mayoría, no hubo muchas modificaciones de los cuestionarios a lo largo del tiempo. Entre los cambios se incluyen la aclaración de preguntas que los participantes no comprendían, la solicitud de detalles adicionales, el reemplazo del Índice de Grasa Corporal de Hill's (Hill's Pet Nutrition, Topeka, Kansas) por el Puntaje de Condición Corporal de 9 puntos de Purina (Purina Animal Nutrition, San Luis, Misuri) después del cuestionario inicial, y la ampliación de las opciones de diagnóstico de casilla de verificación para los veterinarios. Gracias a la transición a las operaciones internas, se lograron cambios más rápidos y flexibles en los cuestionarios. Por lo tanto, hubo adiciones importantes en el estudio. En primer lugar, reemplazamos los diagnósticos de casilla de verificación por el uso de SNOMED Clinical Terms (<https://www.snomed.org/>) para que haya una gama más amplia de diagnósticos sin dejar de contar con una terminología estandarizada. En segundo lugar, recientemente lanzamos el "Golden Age Study" en colaboración con Elanco Animal Health y el Purina Institute. En esta adición optativa de estudio bianual, se incluyen cuestionarios previamente validados para evaluar la osteoartritis: el cuestionario "Liverpool Osteoarthritis in Dogs" (LOAD) [16] para propietarios, el protocolo "Canine OsteoArthritis Staging Tool" (COAST) [17] para veterinarios y la herramienta DISHAA (Desorientación, Interacciones sociales, Ciclos de sueño/vigilia, Suciedad de la casa, Aprendizaje y memoria, Actividad y ansiedad) [18] para que tanto veterinarios como propietarios evalúen el Síndrome de Disfunción Cognitiva. En tercer lugar, agregamos un cuestionario de muerte y necropsia, lo que permite que los veterinarios añadan los cambios en la historia clínica entre la fecha en que se completó el último cuestionario anual de veterinario y la fecha de la muerte. Además, se recopilan los resultados macroscópicos de la necropsia (si se realizó) y el informe de la presunta causa de muerte. Históricamente, los veterinarios y los auxiliares veterinarios de la MAF reunían esta información mediante las historias clínicas. Por lo tanto, gracias a estos cambios, se disminuyó la carga de trabajo del personal de la MAF y se mejoró la integridad de los datos.

## Participación en el estudio

En general, el GRLS ha tenido una excelente participación y retención (Fig. S1). Al 31 de mayo de 2021, la retención total es del 86% (2,251 perros inscritos y con vida, y 352 inscritos fallecidos), con sólo 441 ejemplares perdidos durante el seguimiento. Se analizaron las razones de la retirada activa de 96 (de 441) canes. Entre las razones más frecuentes se incluyen las dificultades del propietario (n = 28, 29%), la reubicación del perro (n = 20, 21%) y un nivel alto de ansiedad por parte del ejemplar durante la consulta veterinaria (n = 14, 15%).

Durante los primeros 5 años del estudio, la tasa de participación anual, definida como la finalización de los tres componentes del estudio (cuestionario anual de propietario, Visita de Estudio con toma de muestras biológicas y cuestionario anual de veterinario), ha oscilado entre el 74% y el 87%. Dado que la finalización del cuestionario anual por parte de los veterinarios depende de la finalización del cuestionario anual de propietario, se observa una participación general de los veterinarios ligeramente baja (durante los primeros 5 años del estudio, la tasa de participación en el cuestionario anual de propietario osciló entre el 80% y el 93%, y el índice de finalización del cuestionario anual de veterinario osciló entre el 75% y el 89%). Sin embargo, si tomamos como denominador solo a los veterinarios que tuvieron la oportunidad de completar un cuestionario (es decir, el número de participantes con un cuestionario anual de propietario completo), la tasa de finalización del cuestionario anual de veterinario osciló entre el 92% y el 96% durante los primeros 5 años del estudio. En la actualidad, almacenamos casi 19,000 muestras de cada uno de los tipos que tomamos (Tabla 1).

La información demográfica de la cohorte en la fecha del último cuestionario figura en la [Tabla 2](#). A partir de mayo de 2021, los perros que permanecen en la cohorte tienen un promedio de 8.3 años (entre 6.7 y 11.3 años). Aproximadamente el 19% ( $n = 418$ ) no está esterilizado o castrado, con una distribución relativamente uniforme de la edad en el momento de la gonadectomía (14%  $\leq 6$  meses, 27% entre los 6 meses y el año, 20% entre el año y los 2 años, 21%  $>2$  años). La distribución geográfica se mantiene consistente con nuestros participantes iniciales y se divide aproximadamente a partes iguales entre cinco regiones. La mayoría de los perros tienen una puntuación de condición corporal saludable (BCS de Purina de entre 4 y 5), pero el 37% tiene sobrepeso (BCS de entre 6 y 7) u obesidad (BCS de entre 8 y 9). Gran parte de los perros que se perdieron durante el seguimiento abandonaron el estudio al principio, por lo tanto, eran ejemplares más jóvenes y había un mayor porcentaje de perros no castrados o esterilizados.

## Criterios de valoración del estudio

Al 31 de mayo de 2021, hemos obtenido 223 de los 500 criterios principales de valoración (45%). El hemangiosarcoma es el criterio principal de valoración más frecuente ( $n = 120$ ), seguido del linfoma y la leucemia ( $n = 85$ ). Se diagnosticaron menos tumores de mastocitos de alto grado y osteosarcomas de lo esperado, con sólo 10 y 8 casos, respectivamente. La mayoría de estos diagnósticos entran en nuestra categoría de diagnóstico definitivo mediante histología o citología (89 hemangiosarcomas [74%], 77 linfomas y leucemias [90%], 9 tumores de mastocitos [90%], 6 osteosarcomas [75%]) ([Fig. S2](#)). De acuerdo con nuestros datos actuales, estimamos que alcanzaremos los 500 criterios principales de valoración alrededor de enero de 2023 ([Fig. 2](#)).

El 79% de los casos de linfoma y leucemia se subtipificaron ( $n = 68$ ) mediante diversas combinaciones de inmunohistoquímica (IHQ), citometría de flujo y análisis PARR. Se dividieron por igual entre los subtipos de linfocitos B y T ( $n = 30$  y  $32$ , respectivamente). En los subtipos de linfocitos B, se incluían el linfoma difuso de linfocitos B grandes ( $n = 22$ ), el linfoma B no especificado ( $n = 7$ ) y el linfoma de la zona marginal ( $n = 1$ ). En los subtipos de linfocitos T, se incluían el linfoma periférico de linfocitos T ( $n = 14$ ), el linfoma y la leucemia de la zona T ( $n = 7$ ) y el linfoma T no especificado ( $n = 11$ ). Además, hubo 4 casos de leucemia aguda, un caso de linfoma epiteliotrópico y uno de linfoma de linfocitos nulos.

Las incidencias acumuladas se documentaron por edad para cada uno de los criterios principales de valoración ([Fig. 3](#)). El linfoma y la leucemia eran los tipos más frecuentes de cáncer entre los perros menores de 6 años, con una incidencia constante a lo largo del tiempo. Por el contrario, la incidencia de hemangiosarcoma fue inicialmente baja, pero aumentó de forma significativa a partir de los 6 años y se convirtió en el tipo de cáncer más frecuente alrededor de los 8 años. Como se muestra anteriormente, la incidencia de tumores de mastocitos de alto grado y osteosarcomas se ha mantenido baja.

Hasta la fecha, 352 perros murieron. Un 70% de estas muertes ( $n = 248$ ) se atribuye al cáncer. Se les practicó una necropsia a casi dos tercios de esos perros ( $n = 218$ , 62%). Con el tiempo, la proporción de perros a los que se les practica una necropsia ha aumentado debido a una mayor comunicación con los participantes y a la aclaración del protocolo de necropsia (en los últimos dos años, se sometió a este procedimiento a un 65% de los perros fallecidos, en comparación con un 55% en los años anteriores). De acuerdo con la tendencia en la tasa de muerte de nuestros participantes, estimamos que la mayoría habrá muerto alrededor de enero de 2027 ([Fig. 2](#)).



Tabla 2. Información demográfica de los participantes del estudio al 31 de mayo de 2021.

	Actualmente inscritos (n = 2,251)		Fallecidos (n = 352)		Perdidos en el seguimiento (n = 441)	
	n	%	n	%	n	%
Edad en el momento de la inscripción, expresada en años <sup>^</sup>	1.20	(0.47–2.94)	1.46	(0.41–2.98)	1.33	(0.52–3.25)
Edad actual, expresada en años <sup>^</sup>	8.26	(6.69–11.31)	7.28	(0.68–10.70)	2.78	(0.51–7.53)
Edad en el momento de la esterilización/castración, variable cualitativa						
<= 6 meses	313	14%	45	13%	53	12%
Entre 6 meses y 1 año	615	27%	98	28%	105	24%
Entre 1 y 2 años	450	20%	67	19%	43	10%
Entre 2 y 5 años	259	12%	26	7%	17	4%
> 5 años	196	9%	13	4%	1	0%
Sin esterilizar o castrar	418	19%	103	29%	222	50%
Sexo						
Hembra no esterilizada	131	6%	39	11%	106	24%
Hembra esterilizada	994	44%	120	34%	114	26%
Macho no castrado	287	13%	64	18%	116	26%
Macho castrado	839	37%	129	37%	105	24%
Ubicación geográfica						
Pacífico	306	14%	43	12%	76	17%
Montaña	308	14%	51	14%	47	11%
Medio Oeste	545	24%	78	22%	94	21%
Noroeste	472	21%	69	20%	82	19%
Sur	620	28%	111	32%	142	32%
Puntaje de condición corporal <sup>#</sup>						
Bajo peso	16	1%	2	1%	6	1%
Normal	1198	53%	197	56%	283	64%
Sobrepeso	738	33%	122	35%	138	31%
Obeso	82	4%	12	3%	14	3%
Datos faltantes	217	10%	19	5%	0	0%

\*Todos los datos se basan en el último cuestionario completado por el propietario y el veterinario. La edad se calcula a partir del 31/05/2021 para los perros inscritos, en caso contrario, se toma en cuenta la fecha de muerte o retirada del estudio

<sup>^</sup>mediana de edad (intervalo). La edad en el momento de la inscripción se determina según el momento en que se completaron todos los componentes del estudio y, por lo tanto, puede ser superior a 2 años debido a demoras en la finalización del cuestionario veterinario

<sup>#</sup>Faltaba el puntaje de condición corporal de algunos perros debido a un error en el cuestionario durante la transición a la base de datos interna. El error se corrigió para la obtención de datos en curso

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269425.t002>

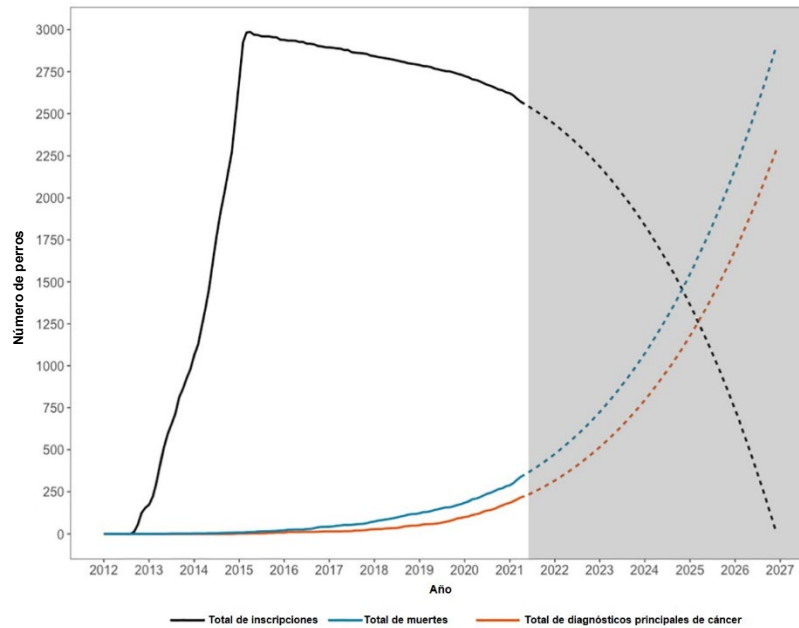
## Principales conclusiones y publicaciones

Hasta la fecha, se han publicado seis artículos con revisores externos que tienen datos del GRLS. Se pueden consultar en <https://datacommons.morrisanimalfoundation.org/publications> [8, 14, 19–22].

A continuación, se detallan algunas conclusiones.

### Variación bioquímica en perros sanos

Los intervalos anuales de cambio de los analitos bioquímicos se calcularon en un subconjunto de 190 participantes que gozaban de buena salud y se validaron en una muestra independiente de 238 participantes sanos del estudio [21]. En este estudio, se destacan la variabilidad biológica en las pruebas de bienestar y la importancia de obtener datos de laboratorio iniciales para evaluar la variación individual.

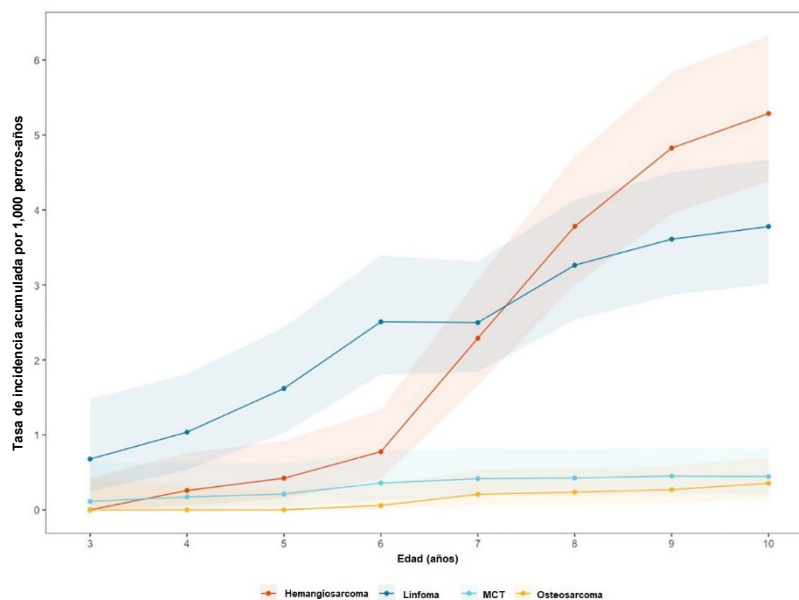


**Fig. 2. Inscripciones, muertes y diagnósticos principales de cáncer observados y estimados.** Los datos proyectados se obtuvieron mediante el ajuste de un modelo cúbico de los meses transcurridos desde la inscripción a los datos observados y a la proyección de valores para los próximos meses. El período de los datos proyectados se indica con sombreado gris.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269425.g002>

### Factores asociados al cumplimiento por parte del propietario

En un estudio realizado para evaluar los factores asociados con el incumplimiento por parte del propietario tras la visita de estudio inicial [20], se descubrió que los propietarios incumplidores eran más propensos a tener perros sin vacunar y durmiendo en la cochera en lugar del dormitorio. Esta información sirve para anticipar el cumplimiento en futuros estudios de cohortes



**Fig. 3. Incidencia acumulada de los cuatro criterios principales de valoración.** La incidencia acumulada se muestra por edad de los perros, expresada en años. Las partes sombreadas representan intervalos de confianza del 95%. Todos los niveles de diagnóstico (del 1 al 3) se incluyen en los cálculos de incidencia.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0269425.g003>

o en el reclutamiento dirigido, y el sobremuestreo de grupos con menos probabilidades de cumplir con el estudio. En futuros análisis, se determinará si son factores pronóstico consistentes de cumplimiento en etapas posteriores.

### Edad en el momento de la gonadectomía

Se descubrió que la gonadectomía antes de los 6 meses se asocia con un mayor riesgo de lesiones ortopédicas [22]. Asimismo, aumenta el riesgo de sobrepeso u obesidad sin importar la edad del ejemplar en el momento de la cirugía. Gracias a este manuscrito y a otras publicaciones que lo respaldan [23–25], se contribuyó a la amplia discusión sobre la necesidad de contar con recomendaciones adecuadas para cada raza en cuanto a la edad ideal de castración.

### Depresión endogámica

En un subconjunto de 100 hembras no esterilizadas, se encontró una correlación negativa estadísticamente significativa entre el coeficiente genómico de endogamia y la fecundidad [19]. Así se concluye que los *golden retrievers* se beneficiarían de las prácticas que limitan la endogamia y se allana el camino para la investigación de otros rasgos afectados.

### Publicaciones

En dos publicaciones adicionales, se ofrece una visión general del estudio. En la primera publicación, se destacan los motivos, los objetivos y el diseño del estudio antes de completar la inscripción [8] y en la segunda, se describen las características poblacionales iniciales de los perros inscritos [14].

### ¿Cuáles son las principales ventajas y desventajas del estudio?

El GRLS es el estudio de cohortes longitudinal más amplio y exhaustivo en los Estados Unidos. Se proporcionan datos novedosos y acceso a muestras para la investigación básica y traslacional. Se dispone de información extensa sobre cada perro, junto con los resultados de los análisis, el uso de medicamentos, los diagnósticos veterinarios y los datos sobre los factores ambientales y el estilo de vida. Gracias al diseño longitudinal y a una combinación de datos de cuestionarios y muestras biológicas, estamos bien equipados para evaluar biomarcadores para la detección temprana de enfermedades.

Nuestros índices generales de participación y retención son notables. Debido al orden de los componentes del estudio, el índice de cumplimiento del Cuestionario Anual de Veterinario es ligeramente inferior al del Cuestionario Anual de Propietario. Afortunadamente, muchos de estos datos pueden recuperarse mediante la obtención de la historia clínica del perro tras su muerte. En futuros estudios, se podría considerar la posibilidad de solicitar historias clínicas regularmente para obtener información sobre los medicamentos y el estado de salud de los perros.

Para participar en el GRLS, se requiere de un gran compromiso por parte de los propietarios. Aunque no recopilamos sus datos demográficos, es probable que se trate de una población selecta no generalizable a todos los dueños de perros. Además, dado que hemos limitado nuestra población a una raza de perro y a una zona geográfica, es posible que algunos resultados no sean generalizables a otras razas o regiones. La etiología de muchas enfermedades no es específica de una raza, por lo tanto, los resultados de este estudio podrían beneficiar a una amplia gama de razas caninas. Sin embargo, puede haber diferencias geográficas en la incidencia y prevalencia del cáncer, como se indica en algunos estudios [11–13]. Pensamos que nuestra cohorte tendrá un alto grado de parentesco, que se evaluará una vez hayamos completado el genotipado de todos los participantes.

Uno de los principales retos del estudio es la adjudicación de los diagnósticos veterinarios. Dado que no se proporciona una formación especializada a los veterinarios participantes, la confianza en el diagnóstico de un veterinario y, por lo tanto, en los informes de nuestros cuestionarios anuales depende de muchos factores: la experiencia clínica, los antecedentes y la formación, la voluntad del propietario de solicitar análisis y las normas de ejercicio profesional. La adjudicación es más sencilla para los diagnósticos de cáncer, ya que se suele incluir histología u otras pruebas adicionales. Sin embargo, puede ser más difícil para algunos de nuestros criterios de valoración secundarios de interés, en particular, el hipotiroidismo y la atopia que requieren pruebas de estimulación para su diagnóstico. Actualmente estamos colaborando con expertos veterinarios para preparar una estrategia de adjudicación para los criterios de valoración secundarios de interés.

En el GRLS, también se tienen en cuenta las limitaciones generales de los estudios de cohortes y los estudios basados en cuestionarios. Como la obtención de datos es anual, los encuestados pueden tener dificultades para recordar información o agobiarse debido a la extensión del cuestionario. Además, dado que este estudio ha estado en curso durante casi una década, se han producido cambios significativos en las empresas de alimentos para perros, en los productos farmacéuticos y en otras variables de interés que pueden dificultar la categorización precisa de los datos. Las técnicas de laboratorio preferidas han cambiado y se han mejorado a lo largo del tiempo, y los métodos de muestreo del estudio y de conservación no son compatibles con todas ellas.

## ¿Puedo acceder a los datos? ¿Dónde puedo encontrar más información?

Hay algunos datos de acceso público disponibles para los investigadores vinculados con una universidad, una organización sin fines de lucro o una agencia gubernamental en el sitio Data Commons de la Morris Animal Foundation (<https://datacommons.morrisanimalfoundation.org/>). Los datos nuevos suelen cargarse en los 12 meses siguientes a la finalización de un año de estudio. Trabajamos de manera continua para aumentar la cantidad de información disponible en Data Commons y al final, planeamos incluir toda la información anónima y los datos de genotipado.

Además, tanto los investigadores académicos como los del sector privado pueden solicitar el acceso a los datos o las muestras biológicas adicionales a través de nuestro procedimiento de solicitud de propuestas. Puede obtener más información en <https://www.morrisanimalfoundation.org/golden-retriever-lifetime-study-rfp>.

## Información complementaria:

**Fig. S1 Cumplimiento y retención de los participantes durante los primeros 6 años del estudio.** Los perros se consideraron totalmente cumplidores si recibíamos el Cuestionario Anual de Propietario completo, las muestras biológicas y el Cuestionario Anual de Veterinario para un año de estudio determinado. Debido a las dificultades para programar consultas con el veterinario durante la pandemia de COVID-19, se produjo un aumento en el número de perros parcialmente cumplidores durante el quinto y sexto año del estudio.

(TIFF)

**Fig. S2 Resumen de los niveles de diagnóstico para los criterios principales de valoración.**

(PDF)

**Tabla S1. Información detallada sobre los análisis anuales realizados en los laboratorios de análisis clínicos.** El cambio de laboratorio se produjo el 1 de diciembre de 2020.

(PDF)

**Tabla S2. Criterios de diagnóstico de los niveles de confianza del cáncer.**

(PDF)

**Datos S1.**

(CSV)

**Agradecimientos:**

Agradecemos a los propietarios participantes, a los veterinarios del estudio y a los perros *golden retriever* por su apoyo y continuas contribuciones. Se contó con el respaldo de la Morris Family Foundation, la Blue Buffalo Cancer Research Foundation, la Petco Foundation, Zoetis, Antech Inc., la Golden Retriever Foundation, la Hadley and Marion Stuart Foundation, Mars Veterinary, generosos patrocinadores del sector privado y el Flint Animal Cancer Center de la Universidad Estatal de Colorado. Además, agradecemos al personal de la Morris Animal Foundation por su apoyo y trabajo arduo. No se contó con fuentes de financiamiento durante el diseño del estudio, el análisis y la interpretación de los datos y la redacción o publicación de este manuscrito.

**Contribuciones****Conceptualización:** Julia Labadie, Rodney Page.**Gestión de los datos:** Julia Labadie, Brenna Swafford, Mara DePena, Kathy Tietje, Rodney Page.**Análisis de los datos:** Julia Labadie.**Obtención del financiamiento:** Rodney Page, Janet Patterson-Kane.**Metodología:** Julia Labadie.**Administración del proyecto:** Mara DePena, Kathy Tietje, Rodney Page.**Supervisión:** Rodney Page, Janet Patterson-Kane.**Visualización:** Brenna Swafford.**Escritura manuscrito inicial:** Julia Labadie.**Mejora y finalización del manuscrito:** Julia Labadie, Brenna Swafford, Mara DePena, Kathy Tietje, Rodney Page, Janet Patterson-Kane.

## Referencias

1. AVMA Pet Ownership and Demographics Sourcebook. 2017–2018 ed. Schaumburg, IL: Veterinary Economics Division, American Veterinary Medical Association; 2018.
2. Davis BW, Ostrander EA. Domestic dogs and cancer research: a breed-based genomics approach. *ILAR J*. 2014; 55(1):59–68. <https://doi.org/10.1093/ilar/iliu017> PMID: 24936030
3. Dobson JM. Breed-predispositions to cancer in pedigree dogs. *ISRN Vet Sci*. 2013; 2013:941275. <https://doi.org/10.1155/2013/941275> PMID: 23738139
4. Khanna C, Lindblad-Toh K, Vail D, London C, Bergman P, Barber L, et al. The dog as a cancer model. *Nat Biotechnol*. 2006; 24(9):1065–6. <https://doi.org/10.1038/nbt0906-1065b> PMID: 16964204
5. Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, Karlsson EK, Jaffe DB, Kamal M, et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 2005; 438(7069):803–19. <https://doi.org/10.1038/nature04338> PMID: 16341006
6. Ostrander EA, Franklin H. Epstein Lecture. Both ends of the leash—the human links to good dogs with bad genes. *N Engl J Med*. 2012; 367(7):636–46. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1204453> PMID: 22894576
7. Karlsson EK, Baranowska I, Wade CM, Salmon Hillbertz NH, Zody MC, Anderson N, et al. Efficient mapping of mendelian traits in dogs through genome-wide association. *Nat Genet*. 2007; 39(11):1321–8. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.10> PMID: 17906626
8. Guy MK, Page RL, Jensen WA, Olson PN, Haworth JD, Searfoss EE, et al. The Golden Retriever Lifetime Study: establishing an observational cohort study with translational relevance for human health. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2015; 370(1673). <https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0230> PMID: 26056371
9. Glickman L, Glickman N, Thorpe R. The Golden Retriever Club of America National Health Survey 1998–1999 <https://www.grca.org/wp-content/uploads/2015/08/healthsurvey.pdf>
10. Kent MS, Burton JH, Dank G, Bannasch DL, Rebhun RB. Association of cancer-related mortality, age and gonadectomy in golden retriever dogs at a veterinary academic center (1989–2016). *PLoS One*. 2018; 13(2):e0192578. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192578> PMID: 29408871
11. Bonnett BN, Egenvall A, Olson P, Hedhammar A. Mortality in insured Swedish dogs: rates and causes of death in various breeds. *Vet Rec*. 1997; 141(2):40–4. <https://doi.org/10.1136/vr.141.2.40> PMID: 9253830
12. Proschowsky HF, Rugbjerg H, Ersbøll AK. Mortality of purebred and mixed-breed dogs in Denmark. *Prev Vet Med*. 2003; 58(1–2):63–74. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(03\)00010-2](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(03)00010-2) PMID: 12628771
13. Proschowsky HF, Rugbjerg H, Ersbøll AK. Morbidity of purebred dogs in Denmark. *Prev Vet Med*. 2003; 58(1–2):53–62. [https://doi.org/10.1016/s0167-5877\(03\)00012-6](https://doi.org/10.1016/s0167-5877(03)00012-6) PMID: 12628770
14. Simpson M, Searfoss E, Albright S, Brown DE, Wolfe B, Clark NK, et al. Population characteristics of golden retriever lifetime study enrollees. *Canine Genet Epidemiol*. 2017; 4:14. <https://doi.org/10.1186/s40575-017-0053-5> PMID: 29177055
15. Hsu Y, Serpell JA. Development and validation of a questionnaire for measuring behavior and temperament traits in pet dogs. *J Am Vet Med Assoc*. 2003; 223(9):1293–300. <https://doi.org/10.2460/javma.2003.223.1293> PMID: 14621216
16. Walton MB, Cowderoy E, Lascelles D, Innes JF. Evaluation of construct and criterion validity for the 'Liverpool Osteoarthritis in Dogs' (LOAD) clinical metrology instrument and comparison to two other instruments. *PLoS One*. 2013; 8(3):e58125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058125> PMID: 23505459
17. Cachon T, Frykman O, Innes JF, Lascelles BDX, Okumura M, Sousa P, et al. Face validity of a proposed tool for staging canine osteoarthritis: Canine OsteoArthritis Staging Tool (COAST). *Vet J*. 2018; 235:1–8. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2018.02.017> PMID: 29704933
18. Landsberg G, Hunthausen W, Ackerman L. The effects of aging on the behavior of senior pets. *Hand-book of Behavior Problems of the Dog and Cat*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Saunders Ltd; 2003. p. 269–304.

19. Chu ET, Simpson MJ, Diehl K, Page RL, Sams AJ, Boyko AR. Inbreeding depression causes reduced fecundity in Golden Retrievers. *Mamm Genome*. 2019; 30(5–6):166–72. <https://doi.org/10.1007/s00335-019-09805-4> PMID: 31115595
20. Ruple A, Jones M, Simpson M, Page R. The Golden Retriever Lifetime Study: Assessing factors associated with owner compliance after the first year of enrollment. *J Vet Intern Med*. 2021; 35(1):142–9. <https://doi.org/10.1111/jvim.15921> PMID: 33191623
21. Jeffery U, Jeffery ND, Creevy KE, Page R, Simpson MJ. Variation in biochemistry test results between annual wellness visits in apparently healthy Golden Retrievers. *J Vet Intern Med*. 2021; 35(2):912–24. <https://doi.org/10.1111/jvim.16021> PMID: 33528843
22. Simpson M, Albright S, Wolfe B, Searfoss E, Street K, Diehl K, et al. Age at gonadectomy and risk of overweight/obesity and orthopedic injury in a cohort of Golden Retrievers. *PLoS One*. 2019; 14(7): e0209131. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209131> PMID: 31314808
23. Torres de la Riva G, Hart BL, Farver TB, Oberbauer AM, Messam LL, Willits N, et al. Neutering dogs: effects on joint disorders and cancers in golden retrievers. *PLoS One*. 2013; 8(2):e55937. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055937> PMID: 23418479
24. Courcier EA, Thomson RM, Mellor DJ, Yam PS. An epidemiological study of environmental factors associated with canine obesity. *J Small Anim Pract*. 2010; 51(7):362–7. <https://doi.org/10.1111/j.1748-5827.2010.00933.x> PMID: 20402841
25. Lefebvre SL, Yang M, Wang M, Elliott DA, Buff PR, Lund EM. Effect of age at gonadectomy on the probability of dogs becoming overweight. *J Am Vet Med Assoc*. 2013; 243(2):236–43. <https://doi.org/10.2460/javma.243.2.236> PMID: 23822081