FAUSTO ASSUMPÇÃO FERNANDES

**Análise Comportamental em Cães com Distrofia Muscular de
Duchenne (GRMD)**

São Paulo
2019

FAUSTO ASSUMPÇÃO FERNANDES

**Análise Comportamental em Cães com Distrofia Muscular de
Duchenne (GRMD)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências.

Departamento:

Cirurgia

Área de concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:

Prof. Dra. Maria Angelica Miglino

São Paulo

2019

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3864
FMVZ

Fernandes, Fausto Assumpção
Análise Comportamental em Cães com Distrofia Muscular de Duchenne (GRMD) /
Fausto Assumpção Fernandes. – 2019.
86 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2019.

Programa de Pós-Graduação: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Angelica Miglino.

1. Cães. 2. Comportamento social. 3. DMD. 4. GRMD. 5. Ontogênese. I. Título.

ERRATA

FERNANDES, F. A. **Análise Comportamental em Cães com Distrofia Muscular de Duchenne (GRMD).** 2019. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Folha	Parágrafo	Onde se lê	Leia-se
12	ºCanto inferior esquerdo	4	12*
86	ºCanto inferior esquerdo	77	86

* Considerar contagem sequencial a partir da folha 12

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Análise comportamental em cães com distrofia muscular de Duchenne", protocolado sob o CEUA nº 5893010216, sob a responsabilidade de **Maria Angélica Miglino e equipe; Fausto Assumpção Fernandes** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 18/05/2016.

We certify that the proposal "Behavior Analysis in Dogs with Duchenne Muscular Dystrophy", utilizing 11 Dogs (males and females), protocol number CEUA 5893010216, under the responsibility of **Maria Angélica Miglino and team; Fausto Assumpção Fernandes** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the University of São Paulo (CEUA/FMVZ) in the meeting of 05/18/2016.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2016** a **12/2020**

Área: **Anatomia dos Animais Domésticos E Silvestres**

Procedência: **Não aplicável biotério**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **6 a 84 meses**

N: **11**

Linhagem: **Golden Retriever**

Peso: **1 a 35 kg**

Resumo: O presente trabalho visa fornecer subsídios à clínica médica no tratamento de cães portadores da Síndrome Muscular de Duchenne (DMD). Esses subsidiados serão fornecidos através da análise comportamental de cães afetados por essa síndrome.

Local do experimento: Canil GRMD/FMVZ-USP

São Paulo, 04 de agosto de 2016

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Roseli da Costa Gomes

Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Autor: FERNANDES, Fausto Assumpção

Título: Análise Comportamental em Cães com Distrofia Muscular de Duchenne (GRMD)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese a minha mãe Maria Inês Assumpção Fernandes e ao meu pai Mauro Ossian Fernandes, pelo esforço e dedicação na condução deste meu caminho

Ao meu irmão Ricardo Assumpção Fernandes pelo suporte dado no cumprimento desta tarefa.

E a todos os meus filhos de quatro patas, pelo arrimo de afeto e por doarem suas vidas à ciência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família por todo apoio dado para que este trabalho fosse concluído.

À minha orientadora Professora Dra. Maria Angelica Miglino pela generosidade em me acolher e por todo aprendizado durante estes anos de doutorado.

Ao Professor Dr. Adroaldo José Zanella pela inestimável ajuda na produção deste trabalho.

À Professora Dra. Concepta Margaret Mcmanus Pimentel, por aceitar fazer parte da banca e pelo valioso auxílio na elaboração do paper resultante deste trabalho.

À Professora Dra. Christina Ferreira, e a Professora Dra. Miriam Garcia Mijares por aceitarem fazer parte da banca de defesa.

Ao Dr. Durval Porto de Araujo por toda ajuda durante o percurso de realização deste trabalho

À professora e amiga Mariana Matera, pelas conversas e apoio de ideias.

À Professora Ana Claudia Oliveira, pelo imenso auxílio na correção dos trabalhos, além de toda ajuda pessoal.

Aos Coordenadores do Programa Professor Dr. José Roberto Kfoury e ao Professor Dr. Antonio Chaves de Assis Neto.

Aos técnicos de laboratório Ronaldo, Rose Eli e Diogo e ao técnico do canil Augusto, por toda assistência prestada.

Às secretárias Daura e Jaqueline, pela assessoria durante estes anos de pós-graduação

Ao Dr. Evander Bueno por toda assistência pessoal e profissional

A Paulinha nossa funcionária da limpeza.

A Fabiana (secretária) pelo apoio contínuo.

Um agradecimento especial à minha aluna de IC e amiga: Caroline Santos

Aos amigos e colegas de laboratório: Ana Clara, Anaelise, Marcos Assunção, Marisol, Adriana, Andressa, Débora. Marcio Pereira, César Prado, Usama, Luana, Maria

Fernanda, Julia, Catia, Carla, Marcílio, Amanda, Vitoria, Marcos Fernandes, Horácio, Anita, Ricardo, Cecília, Anianda, João, Patricia, Edris.

Às minhas amigas de Catalão: Dara e Mônica

Às grandes amigas: Jèssica, Lara, Ana Carolina, Franceliusa Delys (Natal), Ju, Luciana (peruana) Ana Lidia,

Às ICs das minhas amigas que também ficaram minhas amigas: Maiara, Marcel, Ana

Um agradecimento especial aos meus amigos: Antônio, Rafael Hayashi, Eduardo Lebre, Henrique, Rafael Rodrigues, Maurício, Lucas, Gustavo, Luciano, Igor, Tales, Tulio por toda ajuda nessa caminhada

Aos meus amigos Gaúchos: Cristiano (Gordo), Arthur

Aos meus amigos Pós-docs: Thais Sasahara, Rodrigo Barreto

Agradecimento Especial a Paula Fratini, pela imensa ajuda com o trabalho e com o canil

E a todos os meus amigos de fora da Universidade sem os quais eu não conseguiria passar por esta etapa da vida.

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

RESUMO

FERNADES, F.A. Análise Comportamental em Cães com Distrofia Muscular de Duchenne (GRMD). 2019. 86 f. Tese Doutorado em Ciências – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019

O comportamento social de cães pode ser definido como um conjunto de comportamentos realizados durante interações interespecíficas. Este comportamento pode ser dividido em quatro períodos: neonato, o período de transição; socialização e juvenil. O presente trabalho possui o objetivo de analisar a interação social dos cães afetados pela Distrofia Muscular com outros cães não afetados e verificar se há ou não diferença na interação social. O estudo foi dividido em dois experimentos. No primeiro foi analisado um cão macho de 9 anos afetado pela distrofia muscular, e quatro cadelas portadoras do gene da distrofia, porém não afetadas pela distrofia, de idades entre 6 e 7 anos. No segundo foram selecionados 8 filhotes, sendo eles 3 fêmeas não afetadas e 3 machos, onde 2 eram afetados pela distrofia muscular e 1 não, nascidos do cruzamento de uma fêmea portadora e um macho normal. O comportamento dos cães foi filmado e analisado, em três categorias: comportamento de matilha; interação social entre cães e ocupação de território. Os resultados do primeiro experimento foram descritos e comparados entre si. Os do segundo experimento foram analisados com o teste estatístico Mann-Whitney para fatores independentes. Os resultados obtidos, no primeiro experimento indicam que houve diferença entre o comportamento do macho afetado e das demais fêmeas não afetadas. Os resultados obtidos pelo experimento 2 indicam que o surgimento dessa diferença coincide com o aparecimento dos primeiros sintomas da doença e se agravam se os animais afetados ficarem separados dos animais não afetados. Baseados nestes resultados podemos concluir que existem diferenças entre cães afetados pela distrofia muscular e que essa diferença está relacionada com a própria distrofia muscular.

PALAVRA-CHAVE: cães, comportamento social, DMD, GRMD, ontogênese.

Abstract

FERNANDES, F.A. Behavior Analysis of Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) 2019. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Dog social behavior can be defined as a set of behaviors performed during interspecific interactions. This behavior can be divided into four periods: neonatal, the transition period; socialization and juvenile. This work aims to analyze the social interaction between muscular dystrophy affected dogs with other unaffected dogs and to verify whether there is a difference in social interaction. The study was divided into two experiments. In the first one, a 9-year-old male dog affected by muscular dystrophy and four female dogs carrying the dystrophy gene, but not affected by dystrophy, aged between 6 and 7 years were analyzed. In the second were selected 8 puppies, being 3 unaffected females and 3 males, where 2 were affected by muscular dystrophy and 1 not, born from the crossing of a carrier female and a normal male. Dog behavior was filmed and analyzed in three categories: pack behavior; social interaction between dogs and occupation of territory. The results of the first experiment were described and compared with each other. Those in the second experiment were analyzed using the Mann-Whitney statistical test for independent factors. The results obtained in the first experiment indicate that there was a difference between the behavior of the affected male and the other unaffected females. The results obtained by experiment 2 indicate that the appearance of this difference coincides with the onset of the first symptoms of the disease and worsens if the affected animals are separated from the unaffected animals. Based on these results we can conclude that there are differences between dogs affected by muscular dystrophy and that this difference is related to the muscular dystrophy itself.

Keywords: DMD, Dog, GRMD, Ontogenesis, Social Behavior.

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	4
1.1 Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)	4
1.2 Modelo Animal.....	8
1.3 Comportamento	13
2. OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos gerais	16
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 JUSTIFICATIVA.....	17
4 HIPÓTESES	17
5 REFERÊNCIAS	18
6 ARTIGO 1: COMPARAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL DE CÃES DA RAÇA GOLDEN RETRIEVER AFETADOS PELA DISTROFIA MUSCULAR (GRMD) COM CÃES NÃO AFETADOS	24
6.1. Introdução	25
6.2. Material e Método.....	28
6.2.1 Espaço físico.....	29
6.2.2 Método:	30
6.2.3 Categorias de comportamento a serem avaliadas:	30
6.2.4 Cálculo da área ocupada	32
6.2.5 Justificativa das categorias adotadas	32
6.2.6 Etograma	33

6.3. Resultados	34
6.3.1 Comportamento de matilha (Figura 6)	34
6.3.2 Interação social com outros cães (Figura 7)	36
6.3.3 Ocupação de território	40
6.4. Discussão	41
6.5. Referências Bibliográficas	44
7 ARTIGO 2: ONTOGÊNESE DO COMPORTAMENTO DE CÃES GOLDEN RETRIEVER AFETADOS PELA Distrofia Muscular (GRMD)	47
7.1. Introdução	48
7.2. Materiais e Método	51
7.2.1 Método:	51
7.2.2 Etograma	52
7.2.3 Análise estatística	53
7.3. Resultados	54
7.4 Discussão	56
7.5. Referências	58
8 ANEXO 1	60

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Distrofia Muscular de Duchenne (DMD)

As distrofias musculares constituem um grupo de doenças genéticas heterogêneas que podem incluir mais de 50 diferentes tipos (Dai et al., 2015).

A Distrofia Miotônica é uma doença muscular degenerativa multisistêmica que afeta adultos. Ela é resultante da expressão errada de unidades repetidas de microsatélites juntamente com elementos não codificados de m-RNA. Essa expressão errada leva a dois tipos de doenças multisistêmicas. A Distrofia Miotônica tipo 1 (DM1) e a Distrofia Miotônica tipo 2 (DM2), são resultado do ganho da função tóxica do RNA que é gerado em dois *loci* distintos, que codificam a Proteína Miotonia Knase (DMPK) e proteínas de nucleotídeos celulares com ligação ácida (CNBP).

Como consequência da fraqueza dos músculos esqueléticos, da perda da miotonia, e outras características multisistêmicas os portadores dessa síndrome apresentam: defeitos nos condutores cardíacos, problemas com a musculatura lisa, funções endócrinas alteradas e alterações no SNC.

A SMA- que é resultante da perda de neurônios e da atrofia muscular esquelética- é uma das doenças mais comuns e devastadoras causadas por um único gene com incidência de 1 – 6700 indivíduos. Há considerável heterogeneidade nessa doença e pode variar em graus podendo ser do tipo I que leva à morte na infância até o tipo III que pode prosseguir até a idade adulta. A SMA é causada pela perda de função de um gene em um neurônio motor tipo I (*SMN1*). O *SMN1* é essencial para regulação do processamento do RNA, junção pré m-RNA e o transporte do RNA. A gravidade da doença é determinada pelo grau de modificação do *SMN2*. A maioria de *SM2* presentes no m-RNA produzem lacunas no exon 7, o que faz com que os níveis de proteína resultantes fiquem muito baixos.

Embora o mecanismo da SMA seja bem entendido, a dificuldade em marcar os neurônios motores do sistema nervoso central constitui uma grande barreira no avanço de terapias (KOLE, *opus cit.*).

Algumas distrofias musculares são caracterizadas pela ausência, ou presença muito baixa, de uma proteína presente na membrana citoplasmática: a distrofina. A distrofina é uma proteína localizada no sarcolema (membrana plasmática da célula) da célula. Estudos revelam que essa proteína está ligada a uma subunidade, formando o complexo distrofina-glicoproteína. Estudos mostram que a distrofina é a responsável por estabilizar o sarcolema da célula durante a contração muscular (ERVASTI, 2007). Isto porque ela está localizada na junção musculotendínea que fornece o reforço mecânico

para a superfície da membrana durante o alongamento e encurtamento da atividade física (MORAES et al., 2011). A distrofina é responsável por conectar o complexo do sarcolema com os filamentos de actina, o que é essencial para a integridade das células musculares (KOLE et al., 2015).

A ausência dessa proteína pode causar severa degeneração da musculatura esquelética, que pode começar bem cedo na vida de um indivíduo (VALENTINE et al., 1990). Apesar de haver uma degeneração precoce da musculatura esquelética, o coração é relativamente preservado, com suas alterações ocorrendo na terceira ou segunda década de vida do indivíduo, no caso de DMD (BOLAND et al., 1996).

O sarcolema, sem a proteína, sofre pequenos rompimentos que provocam pequenos furos amentando a passagem de cálcio para dentro da célula. Assim sendo a fibra muscular sofre calcificação, perdendo sua capacidade elástica (MORAES, *opus cit.*). Outras consequências da perda da distrofina incluem perda de proteínas essenciais que podem causar um enfraquecimento da interação das lâminas da membrana plasmática (BAKAY et al., 2002).

A ausência dessa proteína faz, também, com que o músculo fique mais suscetível a lesões que ocorrem no dia-a-dia. Embora a regeneração muscular ocorra através das células satélites presentes ao redor dessas células musculares, a constante necessidade de regeneração pode levar a um estresse dessas células, fazendo com que a fibra muscular não mais se regenere. Como consequência pode-se ter fraqueza dessas células ou sua necrose (MARKERT et al., 2009). As fibras necrosadas vão sendo substituídas por outras até que, devido à alta frequência de destruição, o tecido seja substituído por tecido adiposo e conjuntivo, levando esse músculo a ficar fraco (MORAES *opus cit.*, 2011; KORNEGAY, 2017).

A deficiência dessa proteína é a principal causadora das síndromes de Duchenne e Becker em meninos (BERGMAN et al., 2002).

A Distrofia Muscular de Duchene (*DMD*) é a mais comum e mais severa distrofia causada em humanos (ERVASTI, *opus cit.*). Pode afetar um a cada 3500 meninos e reduzir a expectativa de vida para 20 anos (LE RUMEUR et al., 2010). Geralmente pode se passar de 1 a 2 anos entre o aparecimento dos primeiros sintomas e o diagnóstico da doença (STREHLE, 2015).

Porém, ao contrário de outras distrofias musculares, a DMD pode ser detectada através de um simples teste genético (DAI, *opus cit.*). Trata-se de uma enfermidade relacionada à deleção de uma parte do gene responsável pela expressão da proteína, na maioria dos casos (KOLE, *opus cit.*). Em cerca de um terço dos casos uma pequena deleção ou uma mutação pontual pode introduzir um “stop codon”, resultando numa produção deficiente da proteína ou mesmo de uma ausência total de produção (WILLMAN, et al. 2009).

Essa proteína é codificada por um gene muito grande, sendo considerado o maior de todo genoma humano), com 79 exons, 2.4 milhões de pares de base e com um total de 427 KiloDaltons de peso de proteínas (NGHIEM; KORNEGAY, 2019) localizado no cromossomo X. Por isso é frequente que existam mutações nesse gene, especialmente nos éxons 45 e 53, podendo ocorrer também nos éxons 2 e 20 (NGHIEM *opus cit*) e devido ao fato de os machos terem apenas um cromossomo X, essa doença é mais frequente em meninos (BERGMAN, *opus cit*). Na maior parte das meninas afetadas, a causa está relacionada com uma inativação do cromossomo X (BUSHBY et al., 2010). A proteína distrofina também está associada com outras proteínas e açúcares, formando um complexo distrofina-glicoproteína (CAMPBELL & KAHL, 1989).

Essa doença pode apresentar-se de forma variada, ou seja, podem existir indivíduos com apenas alguns sintomas dessa distrofia, assim como indivíduos totalmente comprometidos, mesmo quando a distrofina está afetada da mesma maneira. Isso pode ocorrer porque a mutação primária dos genes pode ter impacto na própria função da proteína, ou seja, em como essa proteína atua. Já a parte de variação nos sintomas clínicos da doença pode ser resultado de mutações secundárias em outros genes que podem aumentar ou reduzir esses sintomas. Esses genes, chamados de modificadores, regulam o contexto patofisiológico da regeneração ou degeneração da distrofina (QUATTROCELLI, et al. 2017). Um dos genes responsável por essa regulação, em cães, é chamado Jagged 1 (VIEIRA et al., 2015). Além desses genes, algumas proteínas da membrana plasmática de células musculares esqueléticas e cardíacas podem afetar o grau de distrofia em camundongos (HACK et al., 1998).

Em humanos foi visto que o gene SPP1 influi de forma considerável no grau de manifestação da doença. Um polimorfismo no locus rs28357094 está relacionado com uma progressão mais rápida da doença, podendo causar perda de movimentos e redução de força em pacientes com essa doença (PEGORARO et al., 2011).

Os estágios iniciais da doença são caracterizados pela presença de grupos locais de miofibrilas, pseudohipertrofia progressiva dos músculos afetados e aumento significativo de tecido conjuntivo e adiposo (MORAES et al., 2011). Outra característica são os altos níveis, logo nos primeiros anos de vida, de creatina knases musculares (CK). (RAFAEL *apud* COLLINS & MORGAN, 2003). Um sintoma encontrado é a diminuição da densidade mineral óssea (DEL ROCÍO CRUZ-GUZMÁN et al., 2019).

Isso acaba acarretando enfraquecimento dos membros inferiores e dos músculos do tronco, seguido pelo enfraquecimento dos membros superiores e músculos distais. Dessa maneira muitos meninos com essa doença nunca poderão pular. Os meninos acabam ganhando alguma força e habilidade muscular até os 6 anos de idade. Após esse período os músculos vão se deteriorando até que os meninos afetados fiquem em uma cadeira de rodas por volta dos 12 anos. As miopatias cardíacas começam a se manifestar por volta dos 10 anos de idade e todos os pacientes as apresentam quando têm 18 anos (YIU et al., 2015).

Também é comum que pacientes com DMD tenham trombo embolismo venoso (VTE, sigla em inglês) (KIMURA, et al. 2015).

O quadro clínico começa a ser notado quando a criança começa a andar. Isso porque a criança vai adquirir a marcha muito tardiamente (por volta dos 18 meses). A marcha adquirida é mantida com dificuldade. Também ocorrem quedas frequentes e um caminhar na ponta dos pés, devido a contraturas nos tendões de Aquiles. Logo após o balanço do corpo é acentuado durante a marcha (Marcha anserina, “pendular”, ou “de balanço”) devido à atrofia dos músculos abdutores do quadril, o que impede a pélvis de se manter nivelada. Ocorre também um aumento no volume das panturrilhas decorrentes do grande esforço a que os gastrocnêmios são submetidos para compensar o déficit dos músculos anterolaterais das pernas (MORAES, *opus cit*). Outra característica é uma compensação de movimentos do tronco para compensar a deficiência de movimentos dos braços e ombros (PEETERS et al., 2019).

A falta de um critério bem estabelecido para se detectar a doença logo nos primeiros estágios da vida de um indivíduo é o que faz com que o teste para DMD ainda não seja usado em exames pré-natais (STREHLE *opus cit*).

Normalmente a partir dos 7 anos a deterioração muscular se sobrepõe ao crescimento muscular, o que acarreta numa perda das funções musculares (KOLE *opus cit*)

Essa enfermidade se não bem acompanhada pode levar a uma falência do sistema respiratório, levando o paciente à morte ainda adolescente (BLAIN et al., 2012).

A dificuldade em se desenvolver um tratamento para essa doença consiste, como já afirmado, no fato do gene ser muito grande e dele se expressar em diferentes tipos musculares, bem como no Sistema Nervoso Central (SNC) (KOLE, *opus cit*).

Vários tratamentos estão sendo testados, tais como: terapia gênica, pesquisa de novas drogas (com corticoide) e terapia celular. Drogas como glucocorticóides, são atualmente a única medicação que reduz a perda de elasticidade muscular em pacientes com DMD (BUSHBY, *opus cit*).

Um dos tratamentos que estão sendo estudados incluem as células tronco e parece ser um tratamento promissor para esse tipo de enfermidade (MARKERT, *opus cit*; SHOJI, 2015). Essas células teriam o potencial de formar novas células musculares sadias. Um dos estudos incluem células mesenquimais (o mesênquima é uma parte específica da mesoderme) (JEONG et al., 2014). Outros tratamentos incluem o entendimento dos mecanismos de ligação entre os genes modificadores e a progressão da própria distrofia, podendo através do entendimento desses mecanismos surgirem tratamentos terapêuticos novos que podem intervir na própria degeneração muscular (QUATTROCELLI, *opus cit*).

Embora esses estudos ainda precisem de mais testes eles parecem ter um potencial promissor no tratamento de pacientes com distrofia muscular.

Vale lembrar também que além dos tratamentos médicos, faz-se necessário um acompanhamento psicossocial dos pacientes, pois a DMD é uma doença multisistêmica que pode afetar também a parte psíquica dos afetados. Isto porque a ausência de distrofina pode acarretar problemas psíquicos como desordens de aprendizado, problemas no desenvolvimento de problemas com memória verbal de curto prazo e lapsos cognitivos (BUSHBY, *opus cit*). Assim sendo uma abordagem multidisciplinar da doença faz-se necessária.

1.2 Modelo Animal

O modelo animal é altamente usado como forma de estudo, devido ao fato de genes homólogos aos humanos estarem presentes em uma série de animais, incluindo alguns invertebrados como a mosca-da-fruta (*Drosophila melanogaster*). Porém muitos desses modelos possuem problemas como, por exemplo, os camundongos mdx (camundongos geneticamente modificados, amplamente usados para experimentos com a DMD), que apresentam uma forma de distrofia mais amena que humanos. Isso nos faz lembrar que devemos sempre ter cuidado ao transportarmos o modelo animal para o ser humano (COLLINS & MORGAN, 2003).

O modelo canino de estudo tem mais vantagens que o modelo com camundongos mdx devido ao fato de os cães terem bastante semelhança no desenvolvimento da DMD (se compararmos com humanos), tanto do ponto de vista genético, quanto do ponto de vista fenotípico (VALENTINE et al., 1988). Além disso, o peso dos cães muitas vezes se assemelha ao de uma criança, o que pode ser vantajoso se considerarmos os estudos com células-tronco ou mesmo a ação de medicamentos (ABREU, 2014). O crescente aumento do número de estudos sobre cognição canina demonstra o quanto esses animais adquiriram importância nos últimos tempos. Estes estudos ajudaram a aprimorar o cão como modelo de estudo (BENSKY; GOSLING; SINN, 2013).

Ao longo dos tempos os seres humanos interferiram de forma direta ou indireta nos processos biofísicos do planeta. Além disso, devido a sua natureza social acabaram interagindo com outras espécies, mudando muitas vezes seus hábitos, dessa forma mudando até mesmo os conceitos sobre o que é um comportamento natural (SRINIVASAN, 2019).

Embora cães de vida livre não possam ser classificados como animais domésticos; também não podem ser classificados como “ferais” porque procuram pela companhia humana (SRINIVASAN, *opus cit*), não se pode ignorar que devido ao processo de domesticação os cães desenvolveram habilidades que não são vistas em nenhum outro grupo animal. Uma delas consiste em seguir dicas visuais para a localização de objetos escondidos. Estudos demonstram que os cães são muito mais eficazes em localizar objetos ocultos, quando um humano dá uma dica visual, que outros grupos, incluindo

primatas não humanos (HARE, *et al.*, 2002). Essas habilidades de interação com humanos fazem dos mesmos excelentes modelos em estudos comportamentais especialmente os sociais (PERSSON, *et al.* 2018). Outros estudos demonstram que o cão não somente se adaptou a um ambiente social humano, como também sofreu mudanças em suas próprias funções cognitivas sociais (MIKLÓSI; TOPÁL, 2013). O ambiente antropogênico, no qual os cães estão inseridos, permite ao cão desenvolver certos tipos de doenças sem a manipulação genética ou neuroquímica (TOPÁL; ROMÁN; TURCSÁN, 2019).

Devido a essas similaridades o cão passou a ganhar importância como modelo de estudo, com investigações inicialmente focadas no tratamento para doenças em humanos e, nos últimos tempos, focadas nos estudos cognitivos. Outra razão pela qual o cão tem sido utilizado é que graças a domesticação, ele tem uma cooperação muito grande com o ser humano, condição esta necessária para alguns estudos. Se comparado com outras espécies, a preparação dos cães para experimentos é similar à preparação de seres humanos, pois os cães se adaptam facilmente às condições ambientais e físicas impostas por alguns experimentos. Esta facilidade de adaptação, junto a *treinabilidade* facilita a utilização de métodos não invasivos, como a ressonância magnética, sem a necessidade de contenção e anestésicos, o que ocorre em outros modelos animais. Devido à sua convivência prolongada com humanos, os cães também possuem uma porção de habilidades cognitivas similares às humanas fazendo dele um excelente modelo experimental para o estudo em neurociências (BUNFORD *et al.*, 2017; THOMPSON *et al.*, 2016).

Outros estudos mostram que os cães além de terem habilidades cognitivas também sofrem de processos neurodegenerativos semelhantes aos humanos, tais como o acúmulo de β -amiloides que podem ser encontrados de forma difusa no córtex pré-frontal. Muitas doenças como Alzheimer vêm associadas a alterações na flora intestinal. O cão pode ser um modelo de estudo para essas doenças, pois também tem uma flora intestinal semelhante ao humano. Além disso o cão também possui *Giroencéfalo* (semelhante ao humano), além de sofrer estresse semelhante ao cérebro humano. Note-se que os cães têm idades proporcionalmente semelhantes à humana, o que faz com que as degenerações cerebrais decorrentes da idade sejam semelhantes nos cães e nos humanos, resultando num bom modelo para estudo de doenças neurodegenerativas humanas. Contudo, mesmo sendo um bom modelo não é um modelo perfeito pois apresenta diferenças de absorção de nutrientes com relação ao ser humano o que pode resultar em diferenças na transposição do modelo para o ser humano (AMBROSINI *et al.*, 2019).

Além das razões acima citadas os cães são afetados naturalmente por diversos tipos de doenças relacionadas à musculatura. Uma delas é a displasia coxofemoral (DCF) ou displasia de quadril (CHD sigla em inglês), que pode chegar a afetar de 53% a 73% dos cães da raça Golden Retriever (PASTER, *et al.* 2005). Parece também haver uma diferença entre machos castrados e não castrados, sendo os últimos muito menos suscetíveis à doença (RIVA, *et al.* 2013).

A MD (sigla em inglês para distrofia muscular) tem sido vista em uma larga quantidade de cães, mas, até a identificação de seus genes e sua manifestação, um diagnóstico preciso não pode ser dado (HOWELL, 1997). Embora mais bem descrita em Goldens Retrievers, essa doença pode afetar outras raças como: Labradores, Samoiedas, Schnauzers miniatura, dentre outros (BERGMAN, et al. 2002; JUBB, et al. 2007). Também foi descrita em Spitz japonês (ATENCIA-FERNANDES, 2014) e em Beagles (MCGREEVY et al., 2015).

O modelo *Golden Retriever Muscular Dystrophy* (GRMD), apesar de possuir alguns problemas como a manifestação de graus diferentes da doença, (BARTHÉLÈMY, et al. 2014) ainda é um bom modelo pois a manifestação da doença nesses animais é similar à DMD humana, tanto na manifestação dos sintomas como no fato dos cães possuírem peso equivalente ao de uma criança, como acima citado (COLLINS & MORGAN, *opus cit*). Os cães afetados são diagnosticados ainda no primeiro dia de vida através de teste genético de reação de cadeia de polimerase (GONÇALVES et al., 2014). Assim como em humanos, os cães são afetados com a progressiva degeneração do músculo esquelético e cardíaco, o que conduz à falência cardíaca e respiratória, levando à morte desses indivíduos (LESSA et al., 2014; KORNEGAY et al., 2003), embora a fraqueza da musculatura esquelética ocorra precocemente, enquanto as cardiopatias ocorrem tardiamente (SHARP et al., 1992). O desenvolvimento das cardiopatias nos GRMD ocorre de maneira similar ao que acontece em humanos (VALENTINE, et al. 1989).

Toda a linhagem dos GRMD veio de uma ninhada inicial que consistia em três machos e uma fêmea nascidos em 21 de julho de 1981 na Universidade da Geórgia. A rigidez e avançamento dos membros pélvicos era notada nos três machos com 9-11 semanas de idade (KORNEGAY, *opus cit*).

Lesões renais decorrentes das intensas lesões musculares são comuns em GRMD (GONÇALVES, *opus cit*). Uma das diferenças desse modelo para com o humano reside no fato de que muitos cães têm morte prematura (por volta de 2 meses), enquanto isso não é visto em humanos (MCGREEVY, *opus cit*). Outra característica, exclusiva dos cães, é o retardo no crescimento (WEST et al., 2013). Alguns genes ligados à inflamação, regulação do citoesqueleto, metabolismo celular, do crescimento e sobrevivência dos canais de sinalização celular, estão muito ativos no músculo gastrocnêmico dos GRMD (MARKHAM et al., 2017).

No caso dos GRMD a distrofia também é causada por uma alteração gênica no cromossomo X (NGUYEN et al., 2002). Essa alteração, assim como em humanos, afeta a produção de distrofina (FERREIRA et al., 2015) e, afeta também maior quantidade de machos que fêmeas. Assim como em humanos, as fêmeas podem ter alterações genéticas apenas em um dos cromossomos X. Nesse caso as fêmeas seriam portadoras da doença, mas não apresentariam nenhum sintoma dela.

No caso de GRMD, diferente do que ocorre com os humanos, a alteração que resulta na doença, é causada por uma mutação simples, no íntron 6. Essa mutação resulta numa ligação alterada dos éxons, produzindo uma proteína truncada e não funcional (SHARP, *opus cit*) enquanto em humanos pode ser causada por diferentes tipos de mutação. Isso facilita, em GRMD, a descoberta de facilitadores genéticos que levam à mutação dos genes, sendo a DMD o resultado dessa mutação. Se os mecanismos dos modificadores genéticos dos GRMD forem entendidos, isso pode resultar em um entendimento da razão de fenótipos diferentes em DMD (BRINKMEYER-LANGFORD et al., 2016).

Além da alteração genética responsável pela produção anormal (ou mesmo a ausência) da distrofina, outros 282 genes podem estar relacionados com a doença. Esses genes dizem respeito a processos inflamatórios, regeneração, organização da matriz extracelular, dentre outros (ROBRIQUET et al., 2015). Os GRMD também apresentam alterações no que diz respeito à homeostase da proteína taurina. A interrupção do metabolismo dessa proteína é específico para cada espécie, por isso ela pode ser estudada em cada espécie portadora da DMD (TERRILL et al., 2016). Uma outra característica das células musculares esqueléticas dos GRMD é a regulação de enzimas de lisossomos. Essa regulação pode servir como forma de recuperar uma fonte de energia alternativa ao caminho glicolítico dado que, nesse caso, o caminho glicolítico e seus caminhos associados também estão modificados (MARKHAM, *opus cit*).

O cruzamento de machos afetados com fêmeas heterozigotas acaba produzindo machos normais, fêmeas heterozigotas, fêmeas afetadas e machos afetados (NGUYEN, *opus cit*).

Cerca de 85% dos GRMD perdem seus movimentos antes dos 6 meses de idade. Isso pode ser definido como a forma severa da doença. GRMD. Aqueles que não perdem os movimentos depois dos 6 meses (ou mesmo nunca perdem os movimentos), são classificados como tendo a forma moderada da doença.

O modo de andar dos GRMD é prejudicado, sendo que as distâncias percorridas no teste de 6 minutos (que mede a distância percorrida durante um período de 6 minutos), declina com o passar da idade nesses cães (ACOSTA et al., 2016). O modo de andar dos GRMD afetados de forma mais grave pela doença é bem mais prejudicado que aqueles que manifestam a forma mais moderada dela. A quantidade de CK também é bem menor em cães que têm menos movimento, ou seja, os que apresentam a forma mais severa da doença (BERTHÉLÉMY, *opus cit*).

O desenvolvimento da doença pode ser detectado antes do nascimento, através de lesões nos músculos da língua. Logo no nascimento é possível visualizar lesões nos membros anteriores, pescoço e tronco. A musculatura de filhotes com dois meses de vida apresenta sinais de recuperação de miofibrilas localizadas aleatoriamente no músculo. As lesões musculares dos recém-nascidos seguem a seguinte sequência: hialinização, hipertrofia, necrose, seguida de regeneração. Nas células musculares também foi encontrado um acúmulo significativo de cálcio em seus citoplasmas. Esse acúmulo indica

que está havendo uma calcificação anormal dessas células (NGUYEN *opus cit*; JUBB *opus cit*).

Essas lesões musculares podem levar o cão a ter dificuldades em engolir (água e comida), ter atrofia muscular pelo corpo, bem como ter intolerância a atividades físicas (BERGMAN, *opus cit*).

As lesões musculares são dependentes da idade. Filhotes de 2 dias apresentam necrose difusa das miofibrilas sem edema ou inflamação. Já filhotes de 4, 5 e 6 dias apresentam necrose muscular. Também é possível ver um início de regeneração celular. Em filhotes de 7 e 8 dias já é possível ver um estágio de regeneração mais avançado.

Em filhotes de dois meses os grupos de músculos mais afetados são: os do tronco, língua e membros. Também são afetados músculos cardíacos, com exceção do miocárdio (NGUYEN, *opus cit*). Os sinais de fraqueza são bem visíveis até 8-12 semanas, quando a doença tende a se estabilizar (JUBB, *opus cit*).

É comum que os GRMD apresentem perda de peso. Também apresentam maior risco de hipoglicemia e hipotermia. O quadro de megaesôfago também é comum, o que leva os GRMD a terem um maior índice de pneumonia pois, ao deglutirem alimentos ou água, eles podem tomar uma falsa via, indo para os pulmões. Além disso, o fato de os GRMD terem problemas nos músculos da língua dificulta sua ingestão de água o que pode acarretar desidratação (AMBROSIO et al., 2009).

Há também relatos de alterações nas musculaturas uterinas em fêmeas afetadas, pois elas chegam a possuir metade da quantidade de distrofina presente se comparadas a indivíduos normais. A musculatura das cadelas afetadas acaba por ter problemas como necroses, por exemplo. Isso porque, também nesses casos, as fibras musculares são substituídas por tecido conjuntivo (BROLIO et al., 2014).

Alguns genes podem afetar o grau de distrofia na musculatura cardíaca e esquelética. Exemplos disso são o fator neurotrópico derivado do cérebro (BDNF- sigla em inglês) e a osteopontina, presente no gene SPP1 (OPN/SPP1 – sigla em inglês), sendo o primeiro mais presente na musculatura cardíaca de filhotes de GRMD, enquanto o último mais presente na musculatura esquelética (GALINDO et al., 2016).

Assim como em humanos alguns marcadores sanguíneos podem ser usados em GRMD para verificar a evolução da doença. Um exemplo desses marcadores é a proteína de membrana CD49d, presente em maiores níveis nas células T em cães GRMD com a forma mais severa da doença, servindo assim, como marcador para esta forma da doença. Esse marcador pode servir como indicador de diagnóstico da doença antes mesmo dos dois meses de vida do cão. A descoberta desses marcadores é muito importante, pois pode detectar cães que vão apresentar falta de mobilidade, embora ainda não a manifestaram.

Com isso pode-se verificar a possibilidade da eficiência de um tratamento para a falta de mobilidade. Como os GRMD são um modelo muito fiel de estudo esses resultados podem ser indicativos para estudos com humanos.

Além disso, com os marcadores sanguíneos é mais fácil separar os grupos que irão apresentar a forma mais severa da doença. Dessa maneira pode-se usar menos cães para estudos pré-clínicos o que pode acelerar a descoberta de novos métodos de tratamento da DMD (BARTHÉLÉMY, *opus cit*).

Outra forma de tratamento para cães GRMD descoberta recentemente foi através de terapia gênica, utilizando um vírus recombinante. Esse vetor, quando expressava a microdistrofina canina (cMD1 – sigla em inglês), foi eficaz em restaurar a produção da distrofina em cães GRMD, estabilizando assim os sintomas clínicos. Importante notar que não foi detectada nenhuma toxicidade decorrente desse tratamento (LE GUINER et al., 2017).

1.3 Comportamento

O lobo foi o único animal domesticado antes da revolução agrícola. Para que essa domesticação ocorresse, o próprio lobo teve que se aproximar do ser humano. Para isso o proto cão teve que romper, ou suprimir, certas *barreiras psicológicas* que inicialmente os mantinham afastados dos seres humanos (FRANCIS, 2015). Os cães, resultantes da domesticação dos lobos, convivem com seres humanos há séculos e sofreram intenso processo de domesticação. Essa domesticação levou, aos cães, assim como outras espécies a desenvolverem a *síndrome da domesticação*, que consiste em alterações morfológicas e comportamentais (HANSEN et al., 2019; DIEDERICH et al., 2006). A primeira característica desse processo foi a redução gradual de tamanho do lobo para o tamanho do cão. Isso faz sentido, pois um lobo reduzido além de consumir menos recursos, é mais simpático ao ser humano, o que facilitou sua integração com os grupos humanos pré agrícolas (FRANCIS, *opus cit*). Uma destas modificações comportamentais está no fato de os cães serem sensíveis aos gestos humanos (UDELL et al., 2010), e ao olhar dos seres humanos (SAVALLI et al., 2016). A influência do ambiente pode ocorrer na forma epigenética. Isto quer dizer que um determinado comportamento pode ser influenciado pelo ambiente no próprio grau de metilação de um determinado gene (CIMARELLI et al., 2017).

A aproximação com os seres humanos fez com que os pesquisadores não tivessem muito interesse em pesquisá-los, pois eram considerados animais “artificiais” (MIKLÓSI et al., 2004).

Contudo, essa perspectiva mudou nas últimas duas décadas (UDELL, *opus cit*) e a própria etologia também mudou sua abordagem em relação ao comportamento, sob o aspecto evolutivo. A etologia aplicada, como ciência ganhou destaque após a segunda guerra, com os estudos de Konrad Lorenz, Nikko Tinbergen e Karl von Frisch, que focaram os estudos dos animais em um ponto de vista evolutivo e não simplesmente

descrevendo os comportamentos. Se falarmos dos pets um dos primeiros trabalhos de etologia aplicada foi realizado por TUBER, et al (1974), no qual eles analisavam o comportamento de pets e usavam técnicas de condicionamento clássico ou instrumental para a solução de eventuais problemas. Dessa maneira a etologia aplicada tem tido seu objetivo cada vez mais centrado em animais domésticos (MILKLÓSI, *opus cit*; ZAWISTOWISKI & REID, 2017).

O fato é que esses animais – os cães - voltaram a ter interesse para a comunidade científica. A definição de etologia, como sendo uma ciência que estuda o comportamento dos animais em seu meio natural, também contribuiu para que os cães fossem animais deixados à margem da pesquisa, pois a domesticação teria acabado com a sua natureza. Porém, nos últimos anos essa visão foi revista e o meio natural dos cães passou a ser considerado o próprio ambiente doméstico, de convívio com seres humanos. Como se trata de um animal social, os cães constituíram laços com os humanos, formando assim um grupo hetero-específico (MIKLÓSI, *opus cit*).

Essa mudança de meio natural (nicho) levou ao cão a formar um repertório comportamental novo, que inclui alguns comportamentos de comunicação com os seres humanos (MIKLÓSI, *opus cit*). Essas mudanças comportamentais podem ser vistas em cães ainda filhotes (com cerca de 6 semanas de vida), o que indica que houve modificações comportamentais no nível genético (RIEDEL et al., 2008).

Embora a literatura sobre comportamento canino seja vasta, ainda existem muitos pontos a serem estudados. Existem vários testes para se verificar um determinado comportamento em cães, porém somente poucos possuem validade científica (BERG et al., 2003).

Estudos de comportamentos específicos, tais como agressividade (BERG *opus cit*, DIEDERICH, 2006; ECHTERLING-SAVAGE, 2015), latidos (MONLÁR et al., 2008), estresse causado em canis (PART et al., 2014), dentre outros, são bem comuns. O estudo da agressão, por exemplo, pode ser importante tanto para o bem-estar humano, quanto para o canino (BERG, *opus cit*).

Com relação ao estudo de estresse provocado por confinamento em canis, PART (*opus cit*) relata que o estresse pode ser muito menor do que os estudos anteriores previam. Isso porque a maior parte desses estudos media os níveis de cortisol (indicadores de creatinina: C/Cr em inglês) como indicadores de estresse severo. Porém o estudo de PART (*opus cit*) demonstrou que esses níveis de cortisol podem estar elevados pelo simples fato de o cão estar excitado com um novo ambiente.

Para se analisar o comportamento de um cão quatro fatores devem ser levados em conta: a fonte (de onde os cães vêm), a ninhada (a raça, porém esse fator pode não ser tão importante quando se quer mostrar noções gerais de comportamento), a idade e o sexo. Neste último destaca-se tanto a diferença sexual quanto o status social (DIEDERICH, *opus cit*). Os cães têm habilidades sociais parecidas com os humanos, o que faz deles bons modelos de estudo para distúrbios sociais humanos. Além disto também foi bem

estudado tanto do ponto de vista de comportamentos sociais como do ponto de vista de origem genética destes comportamentos sociais (PERSSON et al., 2018). Foram localizadas duas regiões no cromossomo 26 de Beagles de laboratório que podem estar associadas a comportamentos relacionados a humanos (PERSSON et al., 2016).

Um comportamento que destaca a habilidade social dos cães diz respeito à comunicação deles com os seres humanos. Essa habilidade é tão forte que os cães são capazes de preferir uma dica social (como o apontar) a uma dica física (odor), na tarefa de escolha de objetos, ou seja, os cães escolhem o objeto que o experimentador está olhando, mesmo que a recompensa esteja em outro (ELGIER et al., 2009). Outro exemplo dessa habilidade diz respeito a quando os cães aprendem a fazer um retorno para ganhar uma recompensa, apenas imitando seu demonstrador (PONGRÁCZ et al., 2003).

Uma das definições de comunicação inclui a capacidade de um indivíduo observar os sinais de comportamento do outro e com isso modificar seu próprio comportamento. Dessa maneira a comunicação pode incluir uma série de comportamentos que os animais usam em suas tarefas diárias, como a procura de comida, brincadeira e cooperação. A comunicação entre cães e humanos pode incluir aspectos como postura corporal, direção do olhar e posturas de apontamento (HARE & TOMASELLO, 2005; ELGIER, *opus cit*). Algumas evidências mostram que os cães são mais hábeis nessa comunicação que outros canídeos (HARE et al., 2002).

O comportamento de comunicação dos cães tem gerado dois debates no que se refere à sua explicação. O primeiro diz respeito a se essas habilidades podem ser consideradas inatas ou adquiridas e o quanto isso influi na aquisição desses comportamentos. O outro, diz respeito a se essas habilidades dependem ou não de processos cognitivos complexos como a teoria da mente propõe: permitir ao cão atribuir um significado à intenção de comunicação do humano (ELGIER, *opus cit*).

A questão que se refere à habilidade de comunicação, se é genético, ou seja, algo inato aos cães, ou se é algo aprendido, isto é dependente do ambiente , o mais provável é que seja um pouco das duas coisas, isto é, embora exista uma predisposição para o aparecimento dessas características, o ambiente é um fator que influi na aquisição dessas habilidades (ELGIER, *opus cit*). Podemos dizer então que, no caso dos cães, esse comportamento tem aspectos filogenéticos (herdados de ancestrais) e ontogenéticos (desenvolvidos ao longo da vida dos animais, ou seja, pelo tempo de experiência) (SAVALLI, 2017).

Não foi encontrado nenhum estudo sobre o comportamento canino relacionado a DMD ou GRMD.

Essa carência de estudos nos mostra que aspectos comportamentais de cães afetados pela distrofia muscular foram negligenciados no decorrer dos anos. Estes estudos poderiam contribuir para um maior conhecimento sobre as manifestações da distrofia muscular podendo, assim, conduzir ao desenvolvimento de novas tecnologias de acesso

ao problema considerado e, eventualmente, gerar saberes voltados à amenização dos sintomas decorrentes da doença.

Conforme já dito anteriormente os cães GRMD são utilizados como modelo para estudos sobre a Distrofia Muscular de Duchenne. Com isso seria possível investigar determinados tipos de tratamento nesses cães com o objetivo de melhorar a qualidade de vida de indivíduos DMD. Ao se considerar que a distrofia muscular em cães tem origens bem semelhantes à DMD humana, uma eventual possibilidade de melhora nos sintomas desses cães pode servir de subsídio para uma pesquisa sobre as condições ambientais e de comportamento voltadas à melhoria de qualidade de vida de pacientes com DMD.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente estudo tem como objetivo verificar se existem alterações de comportamento em cães que apresentam distrofia muscular se comparados ao comportamento de cães não afetados. Para isso serão avaliadas categorias de comportamento seguindo metodologia específica. O primeiro estudo comparou o comportamento social de cães adultos afetados e não afetados. O segundo estudo verificou o desenvolvimento das alterações comportamentais durante o processo de crescimento dos cães afetados.

O estudo visou também fornecer subsídios à clínica, como forma de agregar ao tratamento medicamentoso e fisioterápico, o conhecimento de traços comportamentais. Esses traços foram observados pelo médico veterinário no decorrer da evolução do quadro e do tratamento.

Ao se considerar que existem semelhanças na evolução do quadro clínico da doença em cães e seres humanos, essas observações de comportamento canino podem também servir de auxílio a ações durante o tratamento de pacientes DMD.

2.2 Objetivos específicos

Experimento 1: O experimento 1 teve por objetivo verificar se havia diferenças comportamentais entre cães afetados pela distrofia muscular e cães não afetados.

Experimento 2: O experimento 2 teve por objetivo verificar em que etapa do desenvolvimento dos filhotes as diferenças comportamentais aparecem. Isto significou investigar se a diferença comportamental coincide com o surgimento dos primeiros sintomas da doença.

3 JUSTIFICATIVA

A relevância deste estudo apoia-se na perspectiva investigativa sobre o impacto social que o conhecimento sobre o comportamento (de cães) pode ter no desenvolvimento de novas tecnologias de intervenção clínica.

4 HIPÓTESES

A hipótese inicial seria de que *a doença* influenciaria o comportamento dos cães, haveriam alterações comportamentais em cães afetados pela distrofia muscular? Em caso positivo estariam essas diferenças relacionadas com a distrofia muscular?

5 REFERÊNCIAS

1. ABREU, D K. Imunomodulação *in vitro* de células tronco mesenquimais em cães da raça golden retriever saudáveis e afetados pela distrofia muscular. São Paulo. Tese [Doutorado]. Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres; 2014.
2. ACOSTA, A. R.; VAN WIE, E.; STOUGHTON, W. B.; BETTIS, A. K.; BARNETT, H. H.; LABRIE, N. R.; BALOG-ALVAREZ, C. J.; NGHIEM, P. P.; CUMMINGS, K. J.; KORNEGAY, J. N. Use of the six-minute walk test to characterize golden retriever muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 26, n. 12, p. 865–872, 2016.
3. AMBROSINI, Y. M.; BORCHERDING, D.; KANTHASAMY, A.; KIM, H. J.; WILLETTE, A. A.; JERGENS, A.; ALLENSPACH, K.; MOCHEL, J. P. The Gut-Brain Axis in Neurodegenerative Diseases and Relevance of the Canine Model: A Review. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 11, n. June, p. 1–14, 18 jun. 2019.
4. AMBROSIO, C. E.; FADEL, L.; GAIAD, T. P. P.; MARTINS, D. S. S.; ARAÚJO, K. P. C.; ZUCCONI, E.; BROLIO, M. P. P.; GIGLIO, R. F. F.; MORINI, A. C. C.; JAZEDJE, T.; FROES, T. R. R.; FEITOSA, M. L. T. L. T.; VALADARES, M. C. C.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; MEIRELLES, F. V. V.; MIGLINO, M. A. A.; AMBRÓSIO, C. E.; FADEL, L.; GAIAD, T. P. P.; MARTINS, D. S. S.; ARAÚJO, K. P. C.; ZUCCONI, E.; BROLIO, M. P. P.; GIGLIO, R. F. F.; MORINI, A. C. C.; JAZEDJE, T.; FROES, T. R. R.; FEITOSA, M. L. T. L. T.; VALADARES, M. C. C.; BELTRÃO-BRAGA, P. C. B.; MEIRELLES, F. V. V.; MIGLINO, M. A. A. Identification of three distinguishable phenotypes in golden retriever muscular dystrophy. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n. 2, p. 389–396, 2009.
5. ATENCIA-FERNANDEZ, S.; SHIEL, R. E.; MOONEY, C. T.; NOLAN, C. M. Muscular dystrophy in the Japanese Spitz: An inversion disrupts the DMD and RPGR genes. **Animal Genetics**, v. 46, n. 2, p. 175–184, 2015.
6. BARTHÉLÉMI I, PINTO-MARIZ F, YADA E, DESQUILBET L, SAVINO W, SILVA-BARBOSA S D, FAUSSAT A M, MOULY V, VOIT T, BLOT S, BUTLER-BROWNE G. Predictive markers of clinical outcome in the GRMD dog model of Duchenne muscular dystrophy. **Disease Models & Mechanisms** 7, 1253-1261 2014.
7. BAKAY, M.; ZHAO, P.; CHEN, J.; HOFFMAN, E. P. A web-accessible complete transcriptome of normal human and DMD muscle. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, n. SUPPL., 2002.
8. BENSKY, M. K.; GOSLING, S. D.; SINN, D. L. The world from a dog's point of view: a review and synthesis of dog cognition research. **Advances in the Study of Animal Behavior**, 45, 209-406, 2013.
9. BERGMAN R.L, INZANA K D, MONROE W E, SHELL L G, LIU L A ENGVALL E, SHELTON G D. Dystrophin-Deficient Muscular Dystrophy in a Labrador Retriever. **Journal of the American Animal Hospital Association**, 38, 2002.

10. BLAIN A, GREALLY E, LAVAL S, BLAMIRE A, MACGOWAN G, STRAUB V. Animal Models of Duchenne Muscular Dystrophy, with Special Reference to the mdx Mouse. **Biocybernetics and Biomedical Engineering**, 32, 4, 3–15, 2012
11. BOLAND, B. J.; SILBERT, P. L.; GROOVER, R. V.; WOLLAN, P. C.; SILVERSTEIN, M. D. Skeletal, cardiac, and smooth muscle failure in Duchenne muscular dystrophy. **Pediatric Neurology**, v. 14, n. 1, p. 7–12, jan. 1996.
12. BRINKMEYER-LANGFORD, C.; BALOG-ALVAREZ, C.; CAI, J. J.; DAVIS, B. W.; KORNEGAY, J. N. Genome-wide association study to identify potential genetic modifiers in a canine model for Duchenne muscular dystrophy. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, p. 665, 22 dez. 2016.
13. BROLIO, M. P.; CIMA, D. S.; MIGLINO, M. A.; AMBRÓSIO, C. E. Histological comparison of the smooth uterine muscle of healthy golden retriever bitches, carriers of the progressive muscular dystrophy (GRMD) gene, and GRMD-affected bitches. **Animal Reproduction Science**, v. 150, n. 1–2, p. 56–61, 2014.
14. BUNFORD, N.; ANDICS, A.; KIS, A.; MIKLÓSI, Á.; GÁCSI, M. Canis familiaris As a Model for Non-Invasive Comparative Neuroscience. **Trends in Neurosciences**, v. 40, n. 7, p. 438–452, 2017.
15. BUSHBY K, FINKEL R, BIRNKRANT D, CASE L E, CLEMENS P R, CRIPLE L KAUL A, KINNETT K, MACDONALD C, PANDAYA S, PYSKY J, SHAPRIO, F, TOMEZSKO J, CONSTATIN C. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 2: implementation of multidisciplinary care. **Neurology**, 9, 2010.
16. CAMPBELL, K. P.; KAHL, S. D. Association of dystrophin and an integral membrane glycoprotein. **Nature**, v. 338, n. 6212, p. 259–262, 1989.
17. CIMARELLI, G.; VIRÁNYI, Z.; TURCSÁN, B.; RÓNAI, Z.; SASVÁRI-SZÉKELY, M.; BÁNLAKI, Z. Social Behavior of Pet Dogs Is Associated with Peripheral OXTR Methylation. **Frontiers in Psychology**, v. 8, n. April, p. 549, 2017.
18. COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne’s muscular dystrophy: Animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, n. 4, p. 165–172, 2003.
19. DAI Y, XIAOMING W, YANHUAN Z, HAITAO R, ZHANGZHANG L, YUN Y, CHEN L, LIYING, C. A comprehensive genetic diagnosis of Chinese muscular dystrophy and congenital myopathy patients by targeted next-generation sequencing. **Neuromuscular Disorders** 25 617–624, 2015.
20. DEL ROCÍO CRUZ-GUZMÁN, O.; RODRÍGUEZ-CRUZ, M.; ALMEIDA-BECERRIL, T.; MALDONADO-HERNÁNDEZ, J.; BAEZA, C. W. Muscle function and age are associated with loss of bone mineral density in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle and Nerve*, v. 59, n. 4, p. 417–421, 2019.
21. ELGIER, A. M.; JAKOVCEVIC, A.; BARRERA, G.; MUSTACA, A. E.; BENTOSELA, M. Communication between domestic dogs (Canis familiaris)

- and humans: Dogs are good learners. **Behavioural Processes**, v. 81, n. 3, p. 402–408, 2009.
22. ERVASTI J M. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. **Biochimica et Biophysica Acta** 1772, 108–117, 2007.
 23. FERREIRA, R.; PERECIN, F.; DE NOGUEIRA, P. G.; MIGLINO, M. A.; MARTINS, D. S.; EBERLIN, M. N.; AMBRÓSIO, C. E. Profiles of steroid hormones in canine x-linked muscular dystrophy via stable isotope dilution LC-MS/MS. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–15, 2015.
 24. FRANCIS, R. C. **Domesticated: Evolution in man-made world**. 1st Edition. New York: W.W Norton & Company, 2015.
 25. GONÇALVES, N. J. N.; MIGLINO, M. A.; MORINI, A. C.; MARTINS, D. S.; AMBRÓSIO, C. E. Alterações morfofuncionais renais em cães Golden Retriever Distróficos (GRMD). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 381–384, abr. 2014.
 26. HANSEN WHEAT, C.; FITZPATRICK, J. L.; ROGELL, B.; TEMRIN, H. Behavioural correlations of the domestication syndrome are decoupled in modern dog breeds. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–9, 2019.
 27. HARE, B.; BROWN, M.; WILLIAMSON, C.; TOMASELLO, M. The domestication of social cognition in dogs. **Science (New York, N.Y.)**, v. 298, n. 5598, p. 1634–1636, 2002.
 28. HARE, B.; TOMASELLO, M. Human-like social skills in dogs? **Trends in Cognitive Sciences**, v. 9, n. 9, p. 439–444, 2005.
 29. JACKSON, C. R.; GROOM, R. J.; JORDAN, N. R.; MCNUTT, J. W. The effect of relatedness and pack size on territory overlap in African wild dogs. **Movement Ecology**, v. 5, n. 1, p. 10, 2017.
 30. JEONG J, KYNGSHIN S, SEUNG B L, DONG R L, HEECHUNG K. Patient-tailored application for Duchenne muscular dystrophy on mdx mice based induced mesenchymal stem cells. **Experimental and Molecular Pathology**, 97, 253–258, 2014.
 31. JUBB K.V.F., KENNEDY P.C. & PALMER N. **Pathology of Domestic Animals**, Volume 1. 5th ed. Elsevier, Philadelphia, USA. P. 211, 2007.
 32. KIMURA K, HIROYUKI M, MASAO D, TAKAYUKI K, TOMOKO N, SEITETSU L L, MEGUMI H, EBIHARA A, NAKASHIMA T, OZAWA T, YONEMOCHI Y, AINDA I, MOTOYOSHI Y, MIKATA T, UCHIDA I, KOMORI T, KITAO R, NAGATA T, TAKEDA S, KOMAKI H, SEGAWA K, TAKENAKA K, KOMURO I. Prognostic impact of venous thromboembolism in patients with Duchenne muscular dystrophy: Prospective multicenter 5-year cohort study. **International Journal of Cardiology**, 191, 178–180, 2015.
 33. KOLE R, KRIEG A M. Exon skipping therapy for Duchenne muscular dystrophy. **Advanced Drug Delivery Reviews** 87 104–107, 2015.
 34. KORNEGAY, J. N.; CUNDIFF, D. D.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; OKAMURA, C. S. The cranial sartorius muscle undergoes true hypertrophy in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, n. 6, p. 493–500, 2003.
 35. LE GUINER, C.; SERVAIS, L.; MONTUS, M.; LARCHER, T.; FRAYSSE, B.; MOULLEC, S.; ALLAIS, M.; FRANÇOIS, V.; DUTILLEUL, M.; MALERBA,

- A.; KOO, T.; THIBAUT, J.-L.; MATOT, B.; DEVAUX, M.; LE DUFF, J.; DESCHAMPS, J.-Y.; BARTHELEMY, I.; BLOT, S.; TESTAULT, I.; WAHBI, K.; EDERHY, S.; MARTIN, S.; VERON, P.; GEORGER, C.; ATHANASOPOULOS, T.; MASURIER, C.; MINGOZZI, F.; CARLIER, P.; GJATA, B.; HOGREL, J.-Y.; ADJALI, O.; MAVILIO, F.; VOIT, T.; MOULLIER, P.; DICKSON, G. Long-term microdystrophin gene therapy is effective in a canine model of Duchenne muscular dystrophy. **Nature Communications**, v. 8, n. May, p. 16105, 25 jul. 2017.
36. LE RUMEUR, E.; WINDER, S. J.; HUBERT, J.-F. Dystrophin: More than just the sum of its parts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 9, p. 1713–1722, set. 2010.
 37. LESSA, T.B, ABREU D. K, RODRIGUES M. N, BROLIO M.P, MIGLINO M.A, AMBROSIO C. E. Morphological and Ultrastructural Evaluation of the Golden Retriever Muscular Dystrophy Trachea, Lungs, and Diaphragm Muscle. **Microscopy research and technique** 77:857–861, 2014.
 38. MARKET C D, ATALA A, CANN J K, CHRIST J, FURTH M, AMBROSIO F, CHILDERS M K. Mesenchymal Stem Cells: Emerging Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy. **American Academy of Physical Medicine and Rehabilitation** Vol. 1, 547-559, 2009.
 39. MARKHAM, L. W.; BRINKMEYER-LANGFORD, C. L.; SOSLOW, J. H.; GUPTE, M.; SAWYER, D. B.; KORNEGAY, J. N.; GALINDO, C. L. GRMD cardiac and skeletal muscle metabolism gene profiles are distinct. **BMC medical genomics**, v. 10, n. 1, p. 21, 2017.
 40. MCGREEVY, J. W.; HAKIM, C. H.; MCINTOSH, M. A.; DUAN, D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. **Dis Model Mech**, v. 8, n. 3, p. 195–213, 2015.
 41. MIKLÓSI, Á.; TOPÁL, J. What does it take to become ‘best friends’? Evolutionary changes in canine social competence. **Trends in Cognitive Sciences**, v. 17, n. 6, p. 287–294, 2013.
 42. MIKLÓSI, Á.; TOPÁL, J.; CSÁNYI, V. Comparative social cognition: what can dogs teach us? **Animal Behaviour**, v. 67, n. 6, p. 995–1004, 2004.
 43. MONLÁR C, FRÉDÉRIC K, ROY P, PACHET F, PONGRÁCZ P, DÓKA A, MIKLÓSI A. Classification of dog barks: a machine learning approach. **Animal Cognition** 11, 389–400, 2008.
 44. MORAES F M, FERNANDES R C S C, MEDINA-ACOSTA E. Distrofia Muscular de Duchenne: relato de caso. **Revista Científica da FMC**, V. 6 n.2, 2011.
 45. NGUYEN, F.; CHEREL, Y.; GUIGAND, L.; GOUBAULT-LEROUX, I.; WYERS, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. **Journal of Comparative Pathology**, v. 126, n. 2–3, p. 100–108, 2002.
 46. NGHIEM, P. P.; KORNEGAY, J. N. Gene therapies in canine models for Duchenne muscular dystrophy. **Human Genetics**, v. 138, n. 5, p. 483–489, 2019.

47. PART C E, KIDDIE J L, HAYES W A, MILLS D S, NEVILLE R F, MORTON D B, COLLINS L M. Physiological, physical and behavioural changes in dogs (*Canis familiaris*) when kennelled: Testing the validity of stress parameters. **Physiology & Behavior**, 133, 260–271, 2014.
48. PASTER, E. R.; LAFOND, E.; BIERY, D. N.; IRIYE, A.; GREGOR, T. P.; SHOFER, F. S.; SMITH, G. K. Estimates of prevalence of hip dysplasia in Golden Retrievers and Rottweilers and the influence of bias on published prevalence figures. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 226, n. 3, p. 387–392, 2005.
49. PEETERS, L. H. C.; KINGMA, I.; VAN DIEËN, J. H.; DE GROOT, I. J. M. Don't forget the trunk in Duchenne muscular dystrophy patients: more muscle weakness and compensation than expected. **Journal of NeuroEngineering and Rehabilitation**, v. 16, n. 1, p. 44, 27, 2019.
50. PERSSON, M. E.; WRIGHT, D.; ROTH, L. S. V.; BATAKIS, P.; JENSEN, P. Genomic Regions Associated with Interspecies Communication in Dogs Contain Genes Related to Human Social Disorders. **Scientific Reports**, v. 6, n. April, p. 33439, 2016
51. PERSSON, M. E.; SUNDMAN, A.-S.; HALLDÉN, L.; TROTTIER, A. J.; JENSEN, P. Sociality genes are associated with human-directed social behaviour in golden and Labrador retriever dogs. **PeerJ**, v. 6, p. e5889, 6 nov. 2018.
52. QUATTROCELLI, M.; SPENCER, M. J.; MCNALLY, E. M. Outside in: The matrix as a modifier of muscular dystrophy. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 3, p. 572–579, mar. 2017
53. RAFAEL J., GOROSOPE M., NISHIKAWA B.K. & HOFFMAN E.P. Pathophysiology of dystrophin deficiency: a clinical and biological enigma, 1997 In: *Dystrophin: Gene, Protein and Cell Biology*. Eds S.C. BROWN & J.A. LUCY. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 201–232 *apud* COLLINS C A, MORGAN J E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, 84, 165–172, 2003.
54. ROBRIQUET, F.; LARDENOIS, A.; BABARIT, C.; LARCHER, T.; DUBREIL, L.; LEROUX, I.; ZUBER, C.; LEDEVIN, M.; DESCHAMPS, J. Y.; FROMES, Y.; CHEREL, Y.; GUEVEL, L.; ROUGER, K. Differential gene expression profiling of dystrophic dog muscle after MuStem cell transplantation. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–24, 2015.
55. RIEDEL, J.; SCHUMANN, K.; KAMINSKI, J.; CALL, J.; TOMASELLO, M. The early ontogeny of human-dog communication. **Animal Behaviour**, v. 75, n. 3, p. 1003–1014, 2008.
56. SAVALLI, C.; RESENDE, B.; GAUNET, F. Eye contact is crucial for referential communication in pet dogs. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–18, 2016.

57. SAVALLI, C: Comunicação entre o cão e o ser Humano. *In*: SAVALLI, C & ALBUQUERQUE, N. S (orgs). **Cognição e comportamento de cães: a ciência do nosso melhor amigo**. São Paulo: Edicon, 2017. Cap. 2. 43-73.
58. SRINIVASAN, K. Remaking more-than-human society: Thought experiments on street dogs as “nature”. **Transactions of the Institute of British Geographers**, v. 44, n. 2, p. 376–391, 21 jun. 2019.
59. STREHLE E M, VOLKER S. Recent advances in the management of Duchenne muscular dystrophy. **Archive of Disease in Childhood**, 0, p. 1–5, 2015.
60. TERRILL, J. R.; DUONG, M. N.; TURNER, R.; LE GUINER, C.; BOYATZIS, A.; KETTLE, A. J.; GROUNDS, M. D.; ARTHUR, P. G. Levels of inflammation and oxidative stress, and a role for taurine in dystropathology of the Golden Retriever Muscular Dystrophy dog model for Duchenne Muscular Dystrophy. **Redox Biology**, v. 9, p. 276–286, 2016.
61. THOMPSON, A. M.; DESHPANDE, G.; WAGGONER, P.; KATZ, J. S. Functional Magnetic Resonance Imaging of the Domestic Dog: Research, Methodology, and Conceptual Issues. **Comparative Cognition & Behavior Reviews**, v. 11, p. 63–82, 2016.
62. TOPÁL, J.; ROMÁN, V.; TURCSÁN, B. The dog (*Canis familiaris*) as a translational model of autism: It is high time we move from promise to reality. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Cognitive Science**, v. 10, n. 4, p. e1495, jul. 2019.
63. TUBER, D. S.; HOTHERSALL, D.; VOITH, V. L. Animal clinical psychology: A modest proposal. **American Psychologist**, v. 29, n. 10, p. 762–766, 1974.
64. UDELL, M. A. R.; BRUBAKER, L. Are Dogs Social Generalists? Canine Social Cognition, Attachment, and the Dog-Human Bond. **Current Directions in Psychological Science**, v. 25, n. 5, p. 327–333, 2016.
65. VALENTINE, B. A; CUMMINGS, J. F.; COOPER, B. J. Development of Duchenne-type cardiomyopathy. Morphologic studies in a canine model. **The American journal of pathology**, v. 135, n. 4, p. 671–678, 1989.
66. VALENTINE, B. A; COOPER, B. J; DE LAHUNTA; O’QUINN, R; BLUE, J.T. Canine X-linked muscular dystrophy an animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. **Journal of Neurological Sciences**, v. 88, n. 3, 69-81, 1988.
67. WEST, N. A.; YANG, M. L.; WEITZENKAMP, D. A.; ANDREWS, J.; MEANEY, F. J.; OLESZEK, J.; MILLER, L. A.; MATTHEWS, D.; DIGUISEPPI, C. Patterns of growth in ambulatory males with duchenne muscular dystrophy. **Journal of Pediatrics**, v. 163, n. 6, p. 1759–1763.e1, 2013.
68. YIU E M, KORNBERG A J. Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Pediatrics and Child Health**, 51, 759–764, 2015.
69. ZAWISTOWSKI, S; REID, P. in: SERPELL, J. **The Domestic Dog: it's evolution, behavior and interactions with people**. 2nd edition. New York: Cabridge University Press, 2017.

6 ARTIGO 1: COMPARAÇÃO DO COMPORTAMENTO SOCIAL DE CÃES DA RAÇA GOLDEN RETRIEVER AFETADOS PELA DISTROFIA MUSCULAR (GRMD) COM CÃES NÃO AFETADOS

Fausto Assumpção Fernandes ¹+ Caroline Macedo dos Santos² +Concepta Margaret Mcmanus Pimentel³+ Maria Angélica Miglino^{1*}+

¹Sector of Wild and Domestic Animals Anatomy, College of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of Sao Paulo FMVZ/USP

²University São Judas Tadeu, São Paulo, Brasil

³ Sector of Physiologic Sciences, Institute of Biologic Sciences of the University of Brasilia .

Resumo: O comportamento social de cães pode ser definido como sendo um conjunto de comportamentos apresentados durante uma interação interespecífica. O mesmo pode ser dividido em quatro períodos: neonatal, período de transição, socialização e juvenil. O presente trabalho teve, por objetivo, verificar a interação social entre um cão portador da Distrofia Muscular (GRMD) com outros cães não afetados. Para isso foi analisado um cão (com idade de 9 anos) afetado, e quatro cadelas (com idades entre 6 e 7 anos) portadoras do gene para a distrofia. O comportamento dos cães foi filmado e analisado, em três categorias: comportamento de matilha; interação social entre cães; ocupação de território. Os resultados foram analisados e descritos. Os resultados indicam que houve diferença entre o comportamento do indivíduo afetado e as demais fêmeas portadoras, sendo que o macho afetado interagiu menos com os indivíduos portadores e ocupou um percentual menor do território. Essas diferenças comportamentais podem ser explicadas pela idade do cão, que já estava em idade avançada; pelo fato do mesmo ser castrado ou pela própria distrofia muscular, que pode gerar consequências desde os primeiros estágios de desenvolvimento.

Palavras-chave: GRMD, DMD, cães, comportamento social

6.1. Introdução

Canídeos em geral, são conhecidos por terem os mais diversos tipos de comportamento social, podendo até mesmo ter diversos tipos de organização social, no caso de cães (MAJUMDER et al., 2014 & MIKLÓSI et al., 2004). Estudos demonstram que vários canídeos são capazes inclusive de seguir gestos humanos como apontar, encarar, dentre outras ações de comunicação (UDELL; BRUBAKER, 2016).

Como resultado de milhões de anos de convivência, e por serem animais altamente sociáveis, os cães tiveram papel importante em diversas sociedades e culturas humanas (DENDONCKER et al., 2019). Porém em países desenvolvidos os cães não têm mais funções, sendo usados principalmente para companhia (ZAWISTOWSKI & REID, 2017).

O comportamento social pode ser definido como sendo um conjunto de comportamentos apresentados durante uma interação intraespecífica (ABRANTES, 1997). Esse comportamento, em cães, sofre influência de diversos fatores externos, especialmente durante o período crítico. O período crítico pode ser definido como o período em que o cão deve ser exposto a um determinado estímulo até determinada idade, caso contrário a oportunidade de aprendizado será perdida (BEAVER, 2001).

O comportamento social de cães pode ser dividido em quatro períodos: neonatal (2 primeiras semanas de vida), período de transição, socialização e juvenil. Durante o período neonatal o cão se restringe a mamar e dormir, pois seu estado físico e neurológico ainda é imaturo. Nesta fase os filhotes ficam restritos a rastejar e somente se tornam ativos quando se afastam da mãe.

O período de transição é um período curto quando os olhos e orelhas começam a se abrir. Geralmente é nesse período que o cão passa do rastejar para a marcha. É também nesta fase quando os cães começam a sair de sua caixa-ninho e interagir com alimentos sólidos (BEAVER, *opus cit*).

O período de socialização, considerado um período crítico, é o período mais importante em relação às interações sociais. O período se estende da 3ª até a 12ª semana de vida dos filhotes. Esse período é extremamente sensível para o desenvolvimento dos cães (PAL, 2010), pois as características físicas e neurológicas amadurecem, bem como as habilidades motoras, permitindo que o cão tenha interação e reação mais ativas. Existem alguns indícios de que este período também possa ser crítico para a fixação de locais particulares, formação de hábitos alimentares básicos, desenvolvimento de habilidades motoras ágeis e reação ao isolamento (BEAVER, *opus cit*). Este período se divide em socialização primária (de 3 a 5 semanas) e socialização secundária (de 6 a 12 semanas). Na socialização primária o filhote começa se interessar pelas interações sociais (dado que antes das 3 semanas o filhote ainda não desenvolveu por completo as habilidades sensoriais e motoras). Nessa fase os filhotes começam a exibir alguns comportamentos como a vocalização. Também é na socialização primária onde as atividades sociais de brincadeira começam. Ocorre também, neste período, o aprendizado

dos filhotes a inibir as mordidas (boca macia). O agitação de cauda também aparece nessa fase (LINDSAY, 2000).

A socialização secundária é marcada pela socialização dos cães no contexto humano. Ao contrário de outras espécies, os cães precisam da socialização com os seres humanos, devido ao processo de domesticação. Isso quer dizer que a socialização secundária é o período no qual os filhotes deixam o contato com a mãe e passam a ter contato com a família humana. Este período deve ocorrer preferencialmente na 7ª semana (podendo ocorrer na 6ª ou na 8ª semana). A 7ª semana é marcada pelo aumento da irritabilidade da mãe para com os filhotes, bem como da diminuição da lactação. Nessa fase o trabalho da mãe está feito, tanto do ponto de vista nutricional, quanto do ponto de vista psicológico; isso faz esse período ser crítico, pois é o final do desmame e o início da busca dos filhotes por outro grupo. Nesse período também se inicia a interação agonística entre filhotes a qual, irá resultar no desenvolvimento de algumas habilidades e atitudes nesses mesmos filhotes. Será neste período (entre a 6ª e 8ª semana) que ocorre a fase ideal de socialização dos filhotes com outra espécie, pois o medo social ainda não está alto e a atração social ainda não está baixa. Isso faz deste o período o momento certo para a adoção de um filhote por parte de uma família humana (LINDSAY, *opus cit.*).

O quarto período, o juvenil, se estende de 12 semanas até a maturidade sexual. Nesse período lições de socialização precisarão ser reforçadas, caso contrário, as características sociais já adquiridas serão perdidas até os 6 meses. Aqui a velocidade de aprendizado condicional começa a diminuir, talvez por interferência do aprendizado anterior (BEAVER, *opus cit.*).

Embora a estimulação e socialização (tanto intra quanto interespecífica) em filhotes seja necessária para um desenvolvimento saudável, estudos ainda divergem sobre a quantidade ideal de estímulos e socialização, uma vez que processos como super estimulação e super socialização podem ocorrer (DENDONCKER et al., 2019)

Um comportamento sofre influência não somente dos genes, mas também do ambiente (LINDSAY, *opus cit.*). Porém a influência do ambiente pode atingir diretamente os genes que regulam esse comportamento, como por exemplo o gene OXTR, responsável pela sinalização da oxitocina. A oxitocina é uma proteína moduladora de processos sociais, presente tanto em humanos (DONALDSON; YOUNG, 2008) quanto em cães (KIS et al., 2014). O nível de oxitocina presente no indivíduo afeta diretamente seu grau de sociabilidade, especialmente nos quesitos aproximação de pessoas não familiares e de relação com pessoas estranhas (KIS, *opus cit.* & CIMARELLI, 2017). Por exemplo se o grau de metilação do gene OXTR, no local 1383, for alto as fêmeas tendem a se aproximar do experimentador de uma maneira mais calma; já se for baixo as fêmeas ficam mais tensas. Com os machos a relação é oposta, ou seja, quanto menor o grau de metilação do gene, maior a capacidade dele se aproximar do experimentador de maneira calma. Isso mostra também que a oxitocina está relacionada com o sexo do indivíduo. Os mecanismos pelos quais o ambiente influencia na expressão desse gene ainda não estão claros (CIMARELLI, *opus cit.*).

Outra influência do ambiente no comportamento social de cães pode ser vista no estudo de DURANTON, BEDOSSA & GAUNET (2017) os quais verificaram que cães em abrigos reagem de maneira diferente, quando na presença dos tratadores, a pessoas estranhas ou objetos estranhos quando comparados a cães comuns na presença de seus donos. Por exemplo, se um tratador reage de forma a se afastar de uma pessoa estranha, os cães de abrigo, apesar de olharem para os tratadores, não reagem de forma a evitar essa pessoa. Já os cães que vivem em casa evitam o contato com pessoas estranhas das quais seus donos se afastam. Existem evidências demonstrando que o ambiente no qual o cão é criado, influencia diretamente o desenvolvimento comportamental, ou seja, as experiências que um cão tem nos primeiros dias de vida, podem influenciar na maneira pela qual ele se adapta em seu meio (HARVEY et al., 2016).

Uma diminuição no comportamento social, ou em outros comportamentos como o sexual, pode ser um indicativo de que a saúde do animal pode estar comprometida (WEARY et al, 2009).

Este estudo teve por objetivo investigar se existem diferenças no comportamento social de cães afetados pela distrofia muscular comparando-os com cães não afetados. Para isso foram observados a interação de um cão macho adulto e castrado, com fêmeas portadoras do gene da doença, porém com fenótipos normais, mantidos no ambiente e no mesmo regime de água e comida. A hipótese inicial seria de que a doença influenciaria o comportamento dos cães, dado que ela impõe certas limitações físicas a seus portadores, obrigando os mesmos a se adaptarem. Da bibliografia pesquisada este foi o primeiro estudo realizado com foco em comportamento.

6.2. Material e Método

O material do presente estudo foi constituído de cinco cães da raça Golden Retriever provenientes do canil Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) Brasil. Os cães presentes no canil consistiam em fêmeas portadoras do gene para distrofia muscular e em um macho afetado pela distrofia muscular. Dessa maneira esses cães foram separados em dois grupos:

- 1) 4 Indivíduos fêmeas portadoras do gene da doença, porém não afetadas, de idades entre 6 e 7 anos, não castradas (Figura 1).
- 2) 1 indivíduo macho com distrofia muscular, de 9 anos, castrado (Figura 2).

Figura 1: Fêmeas portadoras do gene da Distrofia Muscular

Figura 2: Macho afetado pela distrofia muscular

6.2.1 Espaço físico

O canil Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) Brasil, está situado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e compreende uma área total de aproximadamente 120 m² distribuídos da seguinte forma:

- Sala de armazenamento de ração (6 m²);
- Sala para pequenos procedimentos cirúrgicos: esta sala conta com outras três salas a saber: sala de preparo de materiais (5,94 m²), sala de preparo e recuperação de animais (4,49 m²) e sala de preparo de materiais (5,94 m²);
- Escritório (16,71 m²)
- 15 Baías com a seguinte metragem:
 - Baías 1 a 11: área coberta (2,04 m²) e Solário (1,90 m²)
 - Baia 12: área coberta (2,12 m²) e Solário (2,12 m²)
- Copa (6,64 m²)
- Pátio (36,65 m²)
- Gramado (38,89 m²)

Os cães permanecem durante o dia na área designada como pátio, sendo essa a área total do território. Durante a noite os cães são recolhidos nas baías de 3 a 8.

6.2.2 Método:

A metodologia utilizada neste estudo contou com:

- 1- Análise descritiva do comportamento dos cães normais e GRMD em canil GRMD, situado na faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, através do método de varredura, quando foram avaliadas as interações com mais de um indivíduo; e, animal focal quando as interações do indivíduo afetado com outros membros do grupo foram registradas (ALTMANN, 1974).
- 2- Os comportamentos observados foram gravados em vídeo, através das câmeras de segurança situadas no canil, para posterior análise. Esses vídeos foram gravados sempre no período da manhã (das 8:00 Hs até as 12:00 Hs). Esse período foi escolhido devido ao fato de os cães estarem mais ativos nesse período.
- 3- Num período de gravação de 40 dias foram selecionados os 10 primeiros dias, segundo a metodologia adotada por HIBY; ROONEY; BRADSHAW(2006) em cães normais. Os comportamentos dos cães não afetados e do cão afetado foram descritos e comparados entre si.

6.2.3 Categorias de comportamento a serem avaliadas:

- 1) Comportamento de matilha: Comportamento de grupo, no qual os cães se movem em grupo. São incluídos nessa categoria comportamentos de dois ou mais indivíduos que apresentem comportamentos sincronizados (figura 3);
- 2) Interação social entre cães: comportamento de interação entre dois ou mais indivíduos pertencentes à mesma matilha ou não. Aqui será registrado tanto o comportamento do indivíduo afetado com as portadoras, quanto com as portadoras entre si (figura 4).
- 3) Ocupação do território: comportamento no qual os animais portadores e os afetados, ocupam o território (figura 5).

Figura 3: Comportamento de matilha dos cães não afetados pela doença: a) andar; B) Beber água; C) comer

Figura 4: Interação social entre cães: A) Agachamento; B) Mordidas leves; C) comportamento de monta

Figura 5: Ocupação de território por parte dos cães não afetados: A) Cães não afetados perto do portão e cão afetado a direita; B) Cão afetado na mesma posição da figura anterior e cães não afetados distribuídos pelo território

6.2.4 Cálculo da área ocupada

Na categoria ocupação de território a área é calculada baseada na localização dos cães no espaço: a movimentação de cada grupo (portador e afetado) é registrada, os pontos marcados e a área total de ocupação de cada grupo são calculadas. Após esse dado obtido, essa área de ocupação é dividida pela área total do território e o percentual calculado.

6.2.5 Justificativa das categorias adotadas

O comportamento de matilha foi adotado como categoria pois durante a observação dos vídeos, foi constatado que os cães procuravam ficar juntos em parte do tempo registrado. Esse comportamento está de acordo com o que foi encontrado em pesquisas sobre comportamento animal com cães *normais*, tanto os que vivem dentro de casa como os que andam de forma livre (MAJUMDER, 2014 ; BONANNI, 2010); assim, vai ao encontro de resultados de pesquisas sobre comportamento, analisadas do ponto de vista filogenético (BRÄUER et al., 2013). O comportamento de matilha segundo (PAL; GHOSH; ROY, 1998a) também é considerado importante na comunicação entre indivíduos.

A interação social entre cães pode ser definida como a interação entre dois ou mais indivíduos, sendo eles da mesma matilha ou não. Cães podem interagir com membros fora de sua matilha, mesmo sendo de outras espécies, razão pela qual são excelentes *mediadores* entre espécies diferentes (GUÉGUEN; CICCOTTI, 2008; ODENDAAL & MEINTJES, 2003)

A ocupação de território também é uma característica marcante no comportamento de cães. Observa-se claramente a definição e organização no espaço pelos grupos estudados. Essa característica é destacada nas filmagens e foi baseada no observado por KLUEVER & GESE (2016) em coiotes e por JACKSON et al. (2017) em cães selvagens africanos.

6.2.6 Etograma

Para classificar os comportamentos dentro das categorias acima descritas foi utilizado o etograma abaixo (adaptado de PAL, 2010):

Categorias de comportamento	Descrição
Comportamento de matilha	
Andar	Ato de dois ou mais indivíduos se locomoverem em qualquer direção, de forma sincronizada
Deitar	Ato de dois ou mais indivíduos permanecerem deitados ou sentados perto um do outro
Alimentar	Ato de dois ou mais indivíduos se alimentarem usando o mesmo recipiente
Tomar água	Ato de dois ou mais indivíduos tomarem água no mesmo recipiente, ao mesmo tempo
Latir	Ato de um ou mais indivíduos latirem ao mesmo tempo
Interação social entre cães	
Lamber	Ato de um indivíduo lamber o outro
Monta de brincadeira	Ato de um indivíduo simular o comportamento de monta um no outro, porém sem encaixe pélvico
Mordidas leves	Ato de um indivíduo dar pequenas mordidas uns nos outros
Latir	Ato de um indivíduo dar pequenos latidos para outro
Agachamento	Ato de um indivíduo se agachar na frente do outro e realizar movimentos rápidos com a cauda
Ocupação do território	
Deitar	Ato de um indivíduo ficar deitado ou sentado em um local específico do território
Andar	Ato de um indivíduo se locomover em um local específico do território

6.3. Resultados

Os resultados mostram que houve diferença no comportamento do animal afetado, quando comparado com os animais não afetados, tanto no comportamento de matilha, quanto na interação com outros cães. As diferenças descritivas serão expostas nos próximos itens. Foram feitas descrições das subcategorias enquadradas nas categorias comportamento de matilha e interação social com outros indivíduos.

6.3.1 Comportamento de matilha (Figura 6)

Deitar

Um cão não afetado realiza o comportamento de deitar, inicialmente se posicionando de forma quadrupede onde os membros pélvicos são conduzidos vagarosamente para trás e se posicionam embaixo do corpo do animal ocorrendo, assim, a flexão da região patelar. Isto promove o posicionamento de sentar-se, mantendo região de membros torácicos e cervical posicionados para frente. Após este posicionamento, os membros torácicos se direcionam vagarosamente para frente abaixando a região dorsal e ocorrendo o contato de região caudal dos membros torácicos ao solo, assim animal permanecendo em uma posição dorso ventral com cabeça para frente ou encostada ao solo.

No cão afetado os movimentos descritos acima são realizados de forma mais brusca. Os membros pélvicos ficam tensos no momento da flexão da região patelar, fazendo com que o movimento de se sentar fique brusco. Após esse movimento os membros torácicos também se deslocam para frente de forma brusca, fazendo com que o movimento final fique brusco.

Tomar Água

Um cão não afetado ao beber água se posiciona de forma quadrupede para assim permanecer acima do nível do pote ou poça de água em questão. Para realizar a ação de tomar água o cão projeta sua língua para fora da cavidade oral. Quando a língua entra em contato com a água ocorre a sua curvatura. Logo após a língua curvada para trás assim a flexionando e recolhendo novamente para dentro da cavidade oral de forma veloz. Com este movimento ocorre uma coluna de água e desta forma o cão consegue fechar a cavidade oral antes que a água caia conseguindo assim engolir a água. Este movimento é feito repetidas vezes até que o animal se sinta satisfeito.

O cão afetado procura se adaptar para o comportamento de tomar água a qual consiste em flexionar a língua para trás e fechar a cavidade oral. De forma concomitante o animal flexiona rapidamente a cervical para trás assim empurrando a coluna de água que é formada pela flexão da língua para trás dando um maior tempo para que o animal engula a água e repita o processo.

Andar

A marcha do animal é definida pelo movimento de apoio do corpo do animal de um pé para o outro a partir de um deslocamento que é realizado para frente, para trás ou para os lados assim sendo dividido em dois ciclos chamados de apoio e balanço (Adams et al., 1998; Vaughan et al 1992).

A marcha normal, do um cão não afetado, é realizada quando um dos membros torácicos faz o mesmo movimento que seu membro pélvico oposto. Ao se observar o cão não afetado de forma diagonal pode-se observar que o movimento é realizado quando a pata do membro torácico realiza o mesmo movimento que a pata homóloga do membro pélvico ocorrendo assim um equilíbrio do balanço do movimento exercido pelo corpo do animal. Isto quer dizer que o peso exercido pelo impacto é distribuído pelos coxins plantares e digitais.

O cão afetado tinha dificuldade de apoio. Com isto o balanço do corpo do cão ao decorrer do movimento, fica comprometido, promovendo assim uma marcha pendular onde não ocorre um equilíbrio de ambos os lados assim o peso sendo distribuído de forma irregular para os coxins, levando o animal a levar um maior tempo para locomover-se.

Alimentação

Uma cão não afetado ao iniciar sua alimentação se posiciona de forma quadrupede onde pelo posicionamento de cervical, membros torácicos e membros pélvicos facilitam na deglutição do alimento assim utilizam seus incisivos para capturar o alimento e seus molares para quebrar em porções menores o alimento e juntamente com a língua que auxilia a movimentação dos pedaços de alimento de um lado para o outro na cavidade oral com o intuito de causar a fricção das partículas solido nos dentes assim permitindo uma limpeza superficial na camada de placa bacteriana.

O cão afetado possui uma maior dificuldade ao se alimentar por possuir os músculos da cavidade oral mais fragilizados pelo seu ciclo de lesão mais recorrente causados pela alimentação diária. Foi observado que além da dificuldade na deglutição o animal se deita no chão do recinto permanecendo em decúbito ventral e ao deglutir o alimento estende ligeiramente os membros torácicos e mantem a região cervical flexionada assim ocorrendo um maior auxílio na deglutição do alimento. Após a alimentação o animal permanece em posicionamento de decúbito ventral a fim de recuperar o folego perdido na alimentação. Mesmo ocorrendo esta adaptação na forma de ingerir o alimento devido à dificuldade em fechar a cavidade oral e a atrofia na musculatura animal afetado constantemente apresenta uma quantidade excessiva de baba e engasgos durante a alimentação por não apresentar uma total função da musculatura.

Latir

Um cão não afetado inicia o comportamento de vocalização (latir) perto de outro cão também não afetado. Essa vocalização faz com que o segundo cão também comece a vocalizar. A vocalização pode começar com dois cães e afetar toda a matilha. A vocalização consiste basicamente em latidos curtos e constantes, podendo durar vários minutos.

O cão afetado raramente vocalizava neste contexto. Quando o fazia sua vocalização era com latidos mais longos. Porém sua vocalização não durava muito tempo.

6.3.2 Interação social com outros cães (Figura 7)

Agachamento

Durante o agachamento um animal não afetado coloca seus membros torácicos para frente e desloca seu corpo para trás. A região pélvica fica em posição ereta, fazendo com que o animal fique inclinado para frente. Ao mesmo tempo o animal sacode a cauda de forma relaxada, informando ao outro cão que deseja brincar. Esse movimento pode ser seguido de latidos curtos.

O animal afetado colocava seus membros torácicos também à frente do corpo. Porém esse movimento não era realizado por completo. Como consequência o agachamento não era completo. O movimento de cauda ocorria de maneira semelhante ao animal não afetado, ou seja, de forma relaxada, o que informava a intenção de brincadeira ao outro cão.

Monta de brincadeira

A monta de brincadeira ocorria quando um cão não afetado se coloca sobre outro cão e realiza movimentos pélvicos simulando uma monta de cruza. Essa monta se diferencia da monta de cruza efetiva, pois não há encaixe pélvico (a pelve dos cães se encaixa e com isso há a penetração). Além disso o cão que está sob o outro fica em posição relaxada (boca aberta, em movimento de arfar, posição ereta, e pelos não eriçados), abanando a cauda também.

O macho distrófico realizou este movimento raras vezes. Quando o realizou, não conseguia fazer o movimento de monta por muito tempo, além de manter os membros torácicos tensos.

Mordidas Leves

Um cão não afetado começa a dar pequenas mordidas em um outro cão também não afetado. Um dos cães fica em posição ereta enquanto o outro fica em decúbito dorsal. A posição de decúbito (deitar) é uma sinalização de que o cão quer brincar com o outro. Por essa razão o cão que fica em posição ereta começa a abanar a cauda de forma relaxada. Logo após ambos os cães começam a trocar mordidas curtas que consistem em pequenas mordidas sem a fixação de mandíbulas um no outro.

Um cão afetado pode realizar mordidas curtas em outro cão. De forma geral o animal também consegue se inclinar e colocar a boca no outro cão, porém quase nunca fica em posição de decúbito para estimular a brincadeira. Também, o animal afetado mantém sua cauda mais ereta que animais não afetados.

Lamber

Um cão não afetado inicia este comportamento colocando a língua para fora da cavidade oral. Logo após ele coloca a língua em contato com o corpo do outro cão e realiza movimentos verticais repetidas vezes.

O cão afetado tinha a musculatura da língua atrofiada. Por esta razão ele não conseguia realizar o comportamento de lamber. Alguns cães afetados pela distrofia podem também ter macroglossia, o que dificulta os realizarem o comportamento descrito.

Latidos

Um cão não afetado se aproximava de outro não afetado. Após isso o primeiro cão (o que se aproximou) iniciava latidos curtos, que poderiam ou não serem seguidos pelo comportamento de agachamento. A cauda do cão estava sempre em posição relaxada demonstrando ao outro que desejava interagir de forma pacífica.

O cão afetado também costumava se aproximar de outro cão não afetado. Quando o fazia iniciava latidos longos que, de forma geral, não eram acompanhados pelo comportamento de agachamento. Ao se aproximar iniciava latidos longos, sempre abanando a cauda de forma relaxada.

Figura 6: Cães apresentando comportamentos enquadrados na categoria comportamento de matilha: A) Cães não afetados com afetado apresentando o comportamento de andar; B) Cães não portadores apresentando o comportamento de andar; C) Cão não afetado junto com cão afetado apresentando comportamento de deitar; D) Cães não portadores apresentando o comportamento de deitar

Figura 7: Cães realizando comportamento enquadrados na categoria interação social com outros cães: A) fêmeas não afetadas realizando o comportamento de lambar com o cão afetado; B) fêmeas não afetadas realizando o comportamento de lambar entre si; C) cão afetado realizando uma mordida leve em uma fêmea não afetada; D) fêmeas não afetadas realizando uma mordida leve em outra não afetada.

6.3.3 Ocupação de território

O dado ocupação de território mostrou que um cão afetado ocupava em média menor área de território que as fêmeas não afetadas (mediana de ocupação: portadores = 25,66 m² ou 70%; afetado= 4,58 m² ou 12,5%; $p < 0,05$) (figura 8). Além disto foi percebido que o animal afetado não circula pelo território todo, tendo preferência por algumas áreas. Por outro lado, os cães não afetados circulam por todo território de maneira homogenia, sem preferência por determinadas áreas.

Figura 8: Cães ocupando território; A) Cães não afetados junto com cão afetado (o primeiro cão no canto superior direito, mais escuro); B) Cão afetado na parte superior direita da imagem e cães não afetados distribuídos pelo território.

6.4. Discussão

O experimento teve por objetivo mostrar se o cão afetado se comportava de maneira diferente do que as fêmeas não afetadas. A hipótese inicial era a de que existia essa diferença. Os resultados confirmaram essa hipótese, pois o cão afetado manifestou as categorias comportamentais de forma diferente que os cães não afetados. Algumas explicações podem ser propostas para os resultados acima.

Uma possível explicação para as variações de comportamento encontradas podem ser decorridas da idade do cão afetado (9 anos), dado que o comportamento social de cães pode mudar conforme a idade avança, graças ao processo de disfunção cognitiva (NEILSON et al., 2001). A disfunção cognitiva é uma característica tão marcante em cães, que os mesmos podem ser usados como modelos para estudo em humanos (SNIGDHA et al., 2017). Outro fator que sofre influência da idade é o efeito coragem (capacidade de o indivíduo tomar a iniciativa, seja na exploração do território, seja em uma briga). Esse efeito diminui com o passar da idade, levando cães mais velhos a não explorarem o território com tanto afincamento como cães mais jovens. Também é possível que essa diminuição de atividade não ocorra devido ao avanço da idade, mas sim em decorrência da experiência adquirida, ou seja, o cão não precisa mais explorar o território, pois ele já conhece o mesmo (STARLING et al., 2013). Outro fato que sofre influência da idade é o comportamento social, sendo que machos mais velhos têm posição hierárquica superior a cães mais novos, no caso de cães de vida livre (BONANNI et al., 2017).

Porém é possível que essa alteração de comportamento tenha sua origem nas primeiras semanas de vida do cão e não seja decorrente da idade avançada dele. Isso se deve ao fato da distrofia muscular poder afetar o desenvolvimento da musculatura esquelética de forma precoce (SHARP, 1992), podendo levar o cão a ter limitações físicas em períodos críticos de desenvolvimento cognitivo e motor (períodos de transição e socialização). O período de socialização, ocorrendo entre a 3ª e a 12ª semana de vida, coincide com um dos períodos críticos da doença, que ocorre entre a 1ª e a 4ª semana de vida. Nesse período é onde aparecem sintomas como a fibrose muscular, acarretando um atraso na maturação dos músculos, que irá ocorrer após a 8ª semana de vida (COLLINS, *opus cit*). Um cão com limitações físicas pode, por exemplo, demonstrar menor interesse na interação com outros cães, ou mesmo com pessoas (socialização primária e secundária, respectivamente), fazendo com que certas habilidades decorrentes dessas interações fiquem comprometidas. Assim sendo, um cão com desenvolvimento comprometido tenderá a apresentar diferenças significativas de comportamento quando comparado a cães com desenvolvimento normal (como foi o caso dos cães não afetados). Além disso é comum que cães GRMD passem por um período de intensa fibrose muscular (ao redor da 24ª semana; COLLINS *opus cit*), o que pode influenciar seu comportamento social.

Além de influenciar o comportamento de filhotes a distrofia muscular também pode comprometer o comportamento adulto do cão, pois esta doença limita muito os movimentos, além de poder causar fadiga muscular. Em cães afetados devido ao ciclo de

regenerações da musculatura há a substituição de tecido fibroso por gordura. Como esta substituição tecidual normalmente não é feita de forma igual entre os membros um membro pode acabar ficando mais curto que o outro. Este fato pode dificultar o movimento de andar de um cão afetado, o que pode explicar o fato da marcha dele ser diferente da dos cães não afetados.

O fato do macho afetado ser castrado pode também ter influído em seu comportamento, dado que a castração pode influenciar diretamente em alguns comportamentos como, por exemplo, a *treinabilidade* (capacidade ou motivação para responder de maneira positiva aos sinais humanos), que pode ficar mais eficaz, em machos castrados de algumas raças (SERPELL & HSU 2005). Outro comportamento afetado pela castração é a coragem, sendo que machos não castrados têm mais coragem que os machos castrados (STARLING *opus cit*).

Outro fator que pode explicar as diferenças comportamentais encontradas pode estar relacionado ao sexo dos cães, dado que o cão afetado era macho, enquanto as não afetadas eram fêmeas. A diferença sexual é marcada no comportamento de dispersão (PAL; GHOSH; ROY, 1998a) e no comportamento agonístico, sendo as fêmeas menos dispersas que os machos, e também mais agressivas (PAL; GHOSH; ROY, 1998b).

Outra diferença entre machos e fêmeas pode ser notada na tarefa de permanência de um objeto em um determinado ambiente. Em um experimento conduzido por MULLER et al (2011), cães adultos foram submetidos a quatro situações: 1. uma pequena bola desaparecia e outra pequena bola aparecia (evento esperado); 2. uma pequena bola desaparecia e uma bola grande aparecia (evento inesperado); 3. uma bola grande desaparecia e outra bola grande aparecia (evento esperado); 4. uma bola grande desaparecia e uma bola pequena aparecia (evento inesperado). Nesse caso as fêmeas tendem a olhar por mais tempo quando um evento inesperado ocorre. Já os machos não apresentam resposta com diferença significativa entre os eventos esperados e não esperados. Isso levou os autores a concluir que as fêmeas prestam mais atenção a eventos inesperados que machos (MULLER, *opus cit*). Outra característica que difere machos e fêmeas diz respeito ao comportamento de brincadeira em filhotes, com machos filhotes brincando com muito mais frequência que as fêmeas. Isso pode ser explicado pelo fato dos machos se prepararem para conflitos com outros machos na fase adulta (PAL, *opus cit*).

Outro fator que pode ter influenciado nos resultados é o fato de apenas um indivíduo distrófico ter sido analisado. Embora muitos estudos com cães tenham sido desenvolvidos com apenas um indivíduo, especialmente aqueles envolvendo cães que necessitavam ser treinados por um longo período, diferenças no histórico desse cão individual podem influir nos resultados da pesquisa (MIKLÓSI, 2015). Isto quer dizer que os comportamentos descritos para este cão podem não ser os padrões relatados para outros cães distróficos.

Como já dito os cães GRMD têm evolução da doença de maneira semelhante a indivíduos com DMD. Essa semelhança pode ocorrer desde o início, pois assim como os

GRMD os DMD também apresentam lesões musculares logo nos primeiros anos de vida (3º ano de vida de um ser-humano equivale ao 2º mês de vida do cão (VALENTINE et al, 1988)). Além disso as pessoas afetadas pela DMD possuem índices de QI abaixo da média (HINTON et al., 2006) o que compromete todo seu desenvolvimento social. Mesmo essa limitação cognitiva ainda não ter sido comprovada em cães GRMD, o fato desses cães possuírem limitações físicas semelhantes aos DMD pode nos servir de base para compreendermos melhor a doença e com isso buscarmos meios de diminuir os efeitos dessa distrofia tanto em cães como em seres humanos.

Devido ao fato de GRMD ser um modelo experimental para o tratamento de DMD diversas terapias gênicas estão sendo aplicadas nos cães (COLLINS *opus cit*; MCGREEVY, 2015). Essas terapias têm por objetivo estimular a produção (ou o aumento de produção) da distrofina, diminuindo assim os efeitos da distrofia muscular. Embora muitos estudos estejam sendo feitos o efeito dessas terapias ainda precisa ser estudado. Caso haja diminuição dos efeitos da doença em cães, o desenvolvimento do comportamento social nos mesmos pode ser melhorado, aumentando assim a capacidade de socialização.

Esse foi o primeiro estudo comportamental de cães afetados pela distrofia muscular. As diferenças significativas encontradas, do ponto de vista estatístico, podem estar atreladas a fatores ainda não investigados. Outros estudos devem dar continuidade a esse, ampliando o número de indivíduos afetados.

6.5. Referências Bibliográficas

1. ABRANTES, R. **Dog Language: Encyclopedia of Canine Behaviour**. USA, Wakan Tanka Publisher: 1997.
2. ALTMANN, J. Observational Study of Behavior: Sampling Methods. **Behaviour**, v. 49, n. 3, p. 227–266, 1974.
3. BEAVER B V. **Comportamento canino: Um guia para veterinários**. 1. Ed., São Paulo: E. Rocca, 2001.
4. BONANNI, R.; CAFAZZO, S.; ABIS, A.; BARILLARI, E.; VALSECCHI, P.; NATOLI, E. Age-graded dominance hierarchies and social tolerance in packs of free-ranging dogs. **Behavioral Ecology**, v. 0, p. 1–17, 2017.
5. BONANNI, R.; CAFAZZO, S.; VALSECCHI, P.; NATOLI, E. Effect of affiliative and agonistic relationships on leadership behaviour in free-ranging dogs. **Animal Behaviour**, v. 79, n. 5, p. 981–991, 2010.
6. BRÄUER, J.; BÖS, M.; CALL, J.; TOMASELLO, M. Domestic dogs (*Canis familiaris*) coordinate their actions in a problem-solving task. **Animal Cognition**, v. 16, n. 2, p. 273–285, 23 mar. 2013.
7. CIMARELLI, G.; VIRÁNYI, Z.; TURCSÁN, B.; RÓNAI, Z.; SASVÁRI-SZÉKELY, M.; BÁNLAKI, Z. Social Behavior of Pet Dogs Is Associated with Peripheral OXTR Methylation. **Frontiers in Psychology**, v. 8, n. April, p. 549, 2017
8. COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: Animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, n. 4, p. 165–172, 2003.
9. DENDONCKER, P. A.; DE KEUSTER, T.; DIEDERICH, C.; DEWULF, J.; MOONS, C. P. H. On the origin of puppies: Breeding and selling procedures relevant for canine behavioural development. **Veterinary Record**, v. 184, n. 23, p. 710, 2019.
10. DONALDSON, Z. R.; YOUNG, L. J. Oxytocin, vasopressin, and the neurogenetics of sociality. **Science (New York, N.Y.)**, v. 322, n. 5903, p. 900–904, 2008.
11. DURANTON, C.; BEDOSSA, T.; GAUNET, F. Do shelter dogs engage in social referencing with their caregiver in an approach paradigm? An exploratory study. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 189, p. 57–65, 2017
12. GUÉGUEN, N.; CICCOTTI, S. Domestic dogs as facilitators in social interaction: An evaluation of helping and courtship behaviors. **Anthrozoos**, v. 21, n. 4, p. 339–349, 2008.
13. HARVEY, N. D.; CRAIGON, P. J.; BLYTHE, S. A.; ENGLAND, G. C. W.; ASHER, L. Social rearing environment influences dog behavioral development. **Journal of Veterinary Behavior: Clinical Applications and Research**, v. 16, p. 13–21, 2016.
14. HIBY, E. F.; ROONEY, N. J.; BRADSHAW, J. W. S. Behavioural and physiological responses of dogs entering re-homing kennels. **Physiology and Behavior**, v. 89, n. 3, p. 385–391, 2006.
15. HINTON, V. J.; NEREO, N. E.; FEE, R. J.; CYRULNIK, S. E. Social behavior problems in boys with Duchenne muscular dystrophy. **Journal of**

- developmental and behavioral pediatrics : JDBP**, v. 27, n. 6, p. 470–6, 2006.
16. JACKSON, C. R.; GROOM, R. J.; JORDAN, N. R.; MCNUTT, J. W. The effect of relatedness and pack size on territory overlap in African wild dogs. **Movement Ecology**, v. 5, n. 1, p. 10, 2017
 17. KIS, A.; BENCE, M.; LAKATOS, G.; PERGEL, E.; TURCSÁN, B.; PLUIJMAKERS, J.; VAS, J.; ELEK, Z.; BRÚDER, I.; FÖLDI, L.; SASVÁRI-SZÉKELY, M.; MIKLÓSI, Á.; RÓNAI, Z.; KUBINYI, E. Oxytocin receptor gene polymorphisms are associated with human directed social behavior in dogs (*Canis familiaris*). **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2014.
 18. KLUEVER, B. M.; GESE, E. M. Spatial response of coyotes to removal of water availability at anthropogenic water sites. **Journal of Arid Environments**, v. 130, p. 68–75, 2016
 19. LINDSAY S.R. **Handbook of Applied Dog Behavior and Training** .Volume One. 1st Edition. Iwoa USA: Blackwell Publishing, 2000.
 20. MAJUMDER, S. S.; BHADRA, A.; GHOSH, A.; MITRA, S.; BHATTACHARJEE, D.; CHATTERJEE, J.; NANDI, A. K.; BHADRA, A. To be or not to be social: Foraging associations of free-ranging dogs in an urban ecosystem. **Acta Ethologica**, v. 17, n. 1, p. 1–8, 2014.
 21. MCGREEVY, J. W.; HAKIM, C. H.; MCINTOSH, M. A.; DUAN, D. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. **Dis Model Mech**, v. 8, n. 3, p. 195–213, 2015.
 22. MIKLÓSI, Á.; TOPÁL, J.; CSÁNYI, V. Comparative social cognition: what can dogs teach us? **Animal Behaviour**, v. 67, n. 6, p. 995–1004, jun. 2004.
 23. MIKLÓSI, A. **Dog behavior, evolution, and cognition**. 2nd Edition. Oxford United Kingdom: Oxford University Press, 2015.
 24. MULLER, C. A.; MAYER, C.; DORRENBURG, S.; HUBER, L.; RANGE, F. Female but not male dogs respond to a size constancy violation. **Biology Letters**, v. 7, n. 5, p. 689–691, 2011.
 25. NEILSON, J. C.; HART, B. L.; CLIFF, K. D.; RUEHL, W. W.; WRIGHT, J. C.; NESSELROTE, M. S. Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 218, n. 11, p. 1787–1791, 2001
 26. ODENDAAL, J. S. J.; MEINTJES, R. A. Neurophysiological correlates of affiliative behaviour between humans and dogs. **Veterinary Journal**, v. 165, n. 3, p. 296–301, 2003.
 27. PAL, S. K. Play behaviour during early ontogeny in free-ranging dogs (*Canis familiaris*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 126, n. 3–4, p. 140–153, 2010.
 28. PAL, S. K.; GHOSH, B.; ROY, S. Dispersal behaviour of free-ranging dogs (*Canis familiaris*) in relation to age, sex, season and dispersal distance. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 61, n. 2, p. 123–132, 1998a.
 29. PAL, S. K.; GHOSH, B.; ROY, S. Agonistic behaviour of free-ranging dogs (*Canis familiaris*) in relation to season, sex and age. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 59, n. 4, p. 331–348, 1998b.

30. PAL, S. K.; GHOSH, B.; ROY, S. Agonistic behaviour of free-ranging dogs (*Canis familiaris*) in relation to season, sex and age. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 59, n. 4, p. 331–348, 1998
31. SERPELL, J. A.; HSU, Y. Effects of breed, sex, and neuter status on trainability in dogs. **Anthrozoos**, v. 18, n. 3, p. 196–207, 2005.
32. SHARP, N. J. H.; KORNEGAY, J. N.; VAN CAMP, S. D.; HERBSTREITH, M. H.; SECORE, S. L.; KETTLE, S.; HUNG, W. Y.; CONSTANTINOU, C. D.; DYKSTRA, M. J.; ROSES, A. D.; BARTLETT, R. J. An error in dystrophin mRNA processing in golden retriever muscular dystrophy, an animal homologue of Duchenne muscular dystrophy. **Genomics**, v. 13, n. 1, p. 115–121, 1992.
33. SNIGDHA, S.; YASSA, M. A.; DERIVERA, C.; MILGRAM, N. W.; COTMAN, C. W. Pattern separation and goal-directed behavior in the aged canine. **Learning & Memory**, v. 24, n. 3, p. 123–131, 15 mar. 2017.
34. STARLING, M. J.; BRANSON, N.; THOMSON, P. C.; MCGREEVY, P. D. Age, sex and reproductive status affect boldness in dogs. **Veterinary Journal**, v. 197, n. 3, p. 868–872, 2013.
35. UDELL, M. A. R.; BRUBAKER, L. Are Dogs Social Generalists? Canine Social Cognition, Attachment, and the Dog-Human Bond. **Current Directions in Psychological Science**, v. 25, n. 5, p. 327–333, 2016.
36. VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; DE LAHUNTA; O'QUINN, R.; BLUE, J.T. Canine X-linked muscular dystrophy an animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. **Journal of Neurological Sciences**, v. 88, n. 3, 69-81, 1988.
37. WEARY, D. M.; HUZZEY, J. M.; VON KEYSERLINGK, M. A. G. Board-invited Review: Using behavior to predict and identify ill health in animals. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 2, p. 770–777, 2009.
38. ZAWISTOWSKI, S.; REID, P. in: SERPELL, J. **The Domestic Dog: it's evolution, behavior and interactions wwith people**. 2nd edition. New York: Cabridge University Press, 2017.

7 ARTIGO 2: ONTOGÊNESE DO COMPORTAMENTO DE CÃES GOLDEN RETRIEVER AFETADOS PELA DISTROFIA MUSCULAR (GRMD)

Fausto Assumpção Fernandes ¹+ Caroline Macedo dos Santos² +Concepta Margaret Mcmanus Pimentel³+ Maria Angélica Miglino^{1*}+

¹Sector of Wild and Domestic Animals Anatomy, College of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of Sao Paulo FMVZ/USP

²University São Judas Tadeu, São Paulo, Brasil

³ Sector of Physiologic Sciences, Institute of Biologic Sciences of the University of Brasilia .

Resumo: A ontogênese do comportamento pode estar ligada a um reforço de estímulos condicionais que dependem tanto de fatores genéticos como do próprio ambiente. O presente trabalho teve por objetivo verificar se as mudanças de comportamento entre cães normais e cães distróficos coincidem com o aparecimento dos primeiros sinais da doença e visa verificar se existem diferenças no próprio desenvolvimento do comportamento dos cães distróficos e dos cães normais. Para isso foi selecionada uma ninhada de 8 filhotes (sendo 5 machos e três fêmeas) e observado seu comportamento social. Dos 5 machos 2 eram distróficos e três normais. Foi observado o comportamento social desses cães e verificado se existiam diferenças. Além disso também foi avaliado o cuidado parental, com o objetivo de verificar se a mãe investia mais tempo de cuidado com os filhotes que não eram doentes. Os primeiros resultados mostram diferenças significativas no cuidado parental, ou seja, a mãe investiu menos tempo no cuidado dos filhotes afetados que nos filhotes não afetados (mediana 240 minutos para os filhotes não afetados e 212 minutos para os filhotes afetado, $p < 0,05$). Foram encontradas diferenças significativas entre a interação dos indivíduos afetos e dos não afetados e no comportamento de matilha, que se acentuaram a partir do mês 5. Os primeiros resultados indicam que esta diferença encontrada tem relação direta com a evolução da distrofia, pois esta diferença foi se acentuando com o passar dos meses.

Palavras chave: Ontogênese, comportamento parental, comportamento social, distrofia

7.1. Introdução

A ontogênese ou desenvolvimento pode ser descrita como sendo a evolução de eventos em um organismo, que irá culminar com uma forma fenotípica mais complexa (MIKLÓSI, 2015). Alguns eventos podem servir de reforço para determinados tipos de comportamento. Dessa maneira quanto mais esses reforços são estimulados, maior a tendência em se ocorrer aquele comportamento. Isso pode ser chamado de condicionamento operante. Através da manipulação das formas pelas quais as consequências de determinado reforço estão ligadas a determinado comportamento podemos gerar complexas formas de resposta e verificarmos até mesmo a influência do ambiente. Dessa maneira a ontogenia do comportamento pode estar ligada aos estímulos de reforço (SKINNER, 1966).

Os fatores ontogenéticos podem ser obtidos, de forma pura, se conseguirmos controlar os fatores genéticos, como no caso de gêmeos univitelinos. Da mesma maneira a melhor forma de se avaliar todas as variações genéticas é se conseguirmos controlar as condições ambientais. No caso de filhotes (nos quais o ambiente possui ainda pouca influência em seu comportamento) as características inatas do comportamento ficam mais evidentes que em adultos. Alguns comportamentos têm um forte componente inato, pois é natural supor que os animais não são “tabula rasa”, ou seja, que não nasçam sem nenhum tipo de comportamento herdado (SKINNER, *opus cit*).

A origem e desenvolvimento do comportamento dos cães deve levar em consideração tanto componentes inatos quanto componentes aprendidos por experiência. Um exemplo de comportamento herdado que pode ser citado é a habilidade dos cães em seguir dicas sociais humanas. Isto porque cães muito filhotes (que não foram expostos por longos períodos ao contato humano, isto é o ambiente ainda não teve tempo de influir no comportamento) já possuem essa capacidade, o que demonstra que esse comportamento tem um forte componente inato (WYNNE; UDELL; LORD, 2008).

A ontogenia de alguns comportamentos em cães já é um aspecto bem estudado e pode ser marcada por alguns períodos críticos do desenvolvimento de várias características psicossociais. A entrada e saída desses períodos é marcada por estágios do desenvolvimento biologicamente definidos fazendo o animal, nesse período, suscetível a experiências cruciais, ou mesmo suscetível a ausência de experiências por um tempo limitado. Durante os períodos críticos tem-se um período ótimo, no qual um estímulo apropriado tem seu potencial maximizado (LINDSAY, *opus cit*). Por exemplo, MADSEN et al. (2013) verificou, através do comportamento de contágio por bocejo, que cães possuem apego emocional a partir da 7ª semana de vida, sendo esse, portanto, o período crítico para esse comportamento.

Quanto ao comportamento social, pode-se dizer que o filhote aprende mais entre a 3ª e a 16ª semana que aprenderá durante todo o resto de sua vida, pois os períodos críticos desse comportamento ocorrem nessa idade. Os estímulos oferecidos nessa fase acabam formando, no filhote, um arcabouço emocional e cognitivo do ambiente físico e social. Dessa maneira a experiência adquirida nessa fase formará a maneira pela qual um

cão lidará com o aprendizado no futuro, como, por exemplo quando exposto a estímulos estressantes (LINDSAY, 2000; FOYER et al., 2013).

Filhotes criados em isolamento tendem a ter, quando adultos, comportamentos mais medrosos e podem apresentar déficit cognitivo (LINDSAY, *opus cit*). Filhotes manipulados desde cedo tendem a ter um desenvolvimento emocional melhor (GAZZANO et al., 2008). O mesmo estudo também mostrou que o ambiente tem influência na estabilidade emocional dos filhotes, pois filhotes crescidos em famílias (mesmo sem manipulação) eram mais estáveis que filhotes criados em canil. Outras características tais como relacionamento físico e social e confiança podem ser afetados por características desenvolvidas quando filhotes. Esses comportamentos podem influir na seleção desses filhotes para serem cães de serviço (FOYER, *opus cit*).

A época do ano em que os filhotes nascem podem também influir no comportamento futuro deles. WAAIJ; WILSSON; STRANDBERG (2014) demonstraram que comportamentos como perseguição da presa e cooperação, em pastores-alemães, sofrem influência desse fator, enquanto em labradores retrievers os comportamentos defensivos são influenciados pelas estações do ano. No outono do hemisfério norte (de setembro a novembro) o comportamento de perseguição de presa, por exemplo, teve menor incidência que nos meses de verão. Os mesmos autores discutem também se a variação dos números de horas da luz do dia não pode ser o fator que causa essa diferença, pois no local onde foi feito o estudo, os meses de inverno têm menor incidência de luz solar que nos meses de verão. Outra explicação pode estar relacionada com o ciclo reprodutivo dos cães, pois os cães domésticos, apresentam variações fisiológicas dependendo do estágio do ciclo reprodutivo, e essas alterações podem influir em seus comportamentos.

O sexo dos filhotes também é outro fator que influencia o comportamento deles, principalmente no comportamento de agressão (FOYER *opus cit*).

A influência da mãe no desenvolvimento dos comportamentos dos filhotes é muito importante. Essa importância começa antes mesmo do nascimento dos filhotes, pois mães que passam por estresse podem gerar proles com problemas comportamentais (FOYER, *opus cit* & BRAASTAD, 1998). Porém não é somente a mãe que influi no comportamento dos filhotes, dado que a falta de um “bom” abastecimento dos filhotes por parte de um macho, pode resultar em uma diminuição do comportamento paternal em cães (MIKLÓSI, *opus cit*).

Em cães, durante o período neonatal e transicional, a mãe ainda tem forte influência no desenvolvimento do comportamento dos filhotes. Durante esses períodos, o sistema nervoso dos filhotes ainda não está totalmente desenvolvido, isso quer dizer que eles dependem da mãe para realizar suas funções fisiológicas (especialmente no período neonatal). O cuidado parental e o contato de conforto, por exemplo, são dois comportamentos, ocorridos no período neonatal, dependentes da mãe e muito importantes para o apego emocional e a digestão. No período transicional essa dependência materna vai diminuindo até os filhotes ficarem independentes (isso ocorre na 2ª socialização, da

6^a a 12^a semana de vida) (LINDSAY, *opus cit*). O cuidado parental também influi na capacidade de exploração de um novo ambiente, sendo que filhotes com maior cuidado parental tendem a explorar mais um novo ambiente que filhotes com menos cuidado parental (GUARDINI et al., 2016).

O presente estudo teve por objetivo verificar o desenvolvimento do comportamento de cães normais e afetados e verificar se existem diferenças. Também visa verificar se essa diferença comportamental, caso presente, coincide com o surgimento dos sintomas da doença. Para isso serão avaliados os comportamentos sociais dos filhotes e o cuidado parental.

7.2. Materiais e Método

Durante os dois primeiros meses foram analisados 8 filhotes provenientes do cruzamento de uma fêmea afetada com um macho normal, sendo eles 5 machos e 3 fêmeas. Dos machos 2 deles eram afetados e 3 normais. Após o segundo mês os 3 machos normais deixaram o canil GRMD reduzindo a amostra para 5 indivíduos (3 fêmeas não afetadas e 2 machos afetados). Todos os filhotes permaneceram no canil durante a coleta de dados, sob o mesmo regime de água e comida.

7.2.1 Método:

Foram analisados os comportamentos sociais e o cuidado parental, quando presente, de uma ninhada de cães da raça Golden Retriever oriundos do cruzamento de uma fêmea portadora do gene para distrofia muscular e um macho normal. A metodologia utilizada para análise de dados foi a de grupo - focal (ALTMANN, 1974), sendo um grupo composto por membros não afetados e outro pelo indivíduos afetados. As interações dos membros afetados eram contadas quando pelo menos um indivíduo afetado interagia com um ou mais indivíduos, sendo esses outros indivíduos afetados ou não. Os cães foram mantidos juntos até o mês 5. A partir desse momento os cães afetados ficavam separados dos não afetados.

Os comportamentos observados foram gravados em vídeo, para posterior análise. Esses vídeos foram gravados sempre no período da manhã (das 8:00 Hs até as 12:00 Hs). Esse período foi escolhido devido ao fato de os cães estarem mais ativos nesse período.

Foram selecionados os 10 primeiros dias de cada mês em período de 11 meses de vida dos filhotes. Os tempos foram calculados em minutos, perfazendo um total de 240 minutos por episódio. As interações que tinham menos de um minuto de duração foram descartadas.

As categorias comportamentais avaliadas foram as de cuidado parental e de comportamento social, de acordo com os etogramas descritos abaixo.

7.2.2 Etograma

Cuidado Parental

Contato mãe-filhote	Qualquer tipo de contato entre mãe e filhote
Cuidados	Compostos por uma série de comportamento tais como: mamadas ativas, procurando uma mama, mantendo o aperto, empurrando os membros torácicos, inclinando a cabeça para cima e disposição dos membros pélvicos
Lambendo	Qualquer contato da mãe lambendo os filhotes sem ser na região urogenital
Lambendo a região urogenital	Qualquer contato da mãe lambendo a região urogenital

Adaptado de: Guardini, et al, 2015

Comportamento Social

Categorias de comportamento social	Descrição
Comportamento de matilha	
Andar	Ato de dois ou mais indivíduos de se locomoverem em qualquer direção, de forma sincronizada
Deitar	Ato de dois ou mais indivíduos permanecerem deitados perto um do outro
Alimentar	Ato de dois ou mais indivíduos se alimentarem usando o mesmo recipiente
Tomar água	Ato de dois ou mais indivíduos tomarem água no mesmo recipiente, ao mesmo tempo
Latir	Ato de um ou mais indivíduos latirem ao mesmo tempo
Interação social entre cães	
Lamber	Ato de um indivíduo lamber o outro
Monta de brincadeira	Ato de um indivíduo simular o comportamento de monta um no outro, porém sem encaixe pélvico
Mordidas leves	Ato de um indivíduo dar pequenas mordidas uns nos outros
Latir	Ato de um indivíduo dar pequenos latidos para outro
Agachamento	Ato de um indivíduo se agachar na frente do outro e realizar movimentos rápidos com a cauda

Adaptado de: Pal, 2010.

7.2.3 Análise estatística

A análise estatística utilizada é a do teste Mann-Whitney para amostras independentes. Os dados absolutos e os percentuais são analisados e os resultados considerados significantes quando $p < 0,05$.

7.3. Resultados

Os resultados nos mostram que há uma diferença no investimento parental da mãe para com os filhotes afetados, ou seja, a mãe em questão investiu, nos 10 primeiros dias de nascimento, menos tempo no cuidado dos filhotes afetados que nos filhotes não afetados (mediana 240 minutos para os filhotes não afetados e 212 minutos para os filhotes afetado, $p < 0,05$).

No segundo mês de avaliação, foram avaliados os comportamentos sociais dos indivíduos afetados e dos não afetados. Foi encontrada diferença entre os tempos de comportamento social, sendo que os indivíduos afetados apresentavam menor tempo de comportamento social (mediana 240 para os filhotes não afetados e 239 para os filhotes afetados; $p < 0,05$). Porém se analisarmos as categorias comportamento de matilha e interação social com outros indivíduos, a diferença encontrada não é significativa (comportamento de matilha: mediana 220,7, para indivíduos afetados e 225 para indivíduos afetados; $p > 0,05$; interação social com outros indivíduos: mediana 19,3 minutos para indivíduos não afetados e 11,5 para indivíduos afetados, $p > 0,05$).

No terceiro mês, por outro lado, foram encontradas diferenças significativas entre os indivíduos afetados e os indivíduos não afetados. Na interação social com outros cães os cães afetados apresentaram menor tempo médio de interação (Mediana = 37 para os cães não afetados e mediana = 15 para os cães afetados; $p < 0,05$). Já para o comportamento de matilha ocorreu o oposto, cães não afetados tiveram um tempo menor que cães afetados para o comportamento de matilha (Mediana = 203 para os cães não afetados e mediana = 224 para os cães afetados, $p < 0,05$).

No mês 4 houve algumas mudanças com relação aos dados do mês anterior. Embora os cães afetados apresentassem uma mediana maior de comportamento social que cães não afetados, não foram detectadas diferenças significativas na categoria comportamento de matilha (Mediana = 220,5 minutos, para cães não afetados e mediana = 233,5 minutos, para os cães afetados; $p > 0,05$). Porém houve diferenças na categoria interação social (Mediana = 19,5 para cães não afetados; mediana 6,5 para cães afetados; $p < 0,05$).

No mês 5 houve diminuição na interação social entre os cães afetados (Mediana = 0 minutos, dos cães afetados e 19 minutos para os cães não afetados, $p < 0,05$), com relação ao comportamento de matilha houve uma inversão com os afetados apresentando maior tempo que os não afetados (mediana = 221 minutos para os cães não afetados e 240 minutos para os cães afetados $p < 0,05$). Nesse mês os filhotes afetados passaram a ficar separados dos demais membros o que pode explicar essa queda de comportamento.

No mês 6 continuou havendo diferença significativa na interação social entre indivíduos afetados e não afetados (mediana = 3,5 minutos para cães afetados e mediana = 16 para cães não afetados; $p < 0,05$). Porém não houve diferença significativa no comportamento de matilha entre os cães afetados e não afetados (mediana = 230 minutos para cães não afetados e mediana = 238,5 para cães afetados; $p > 0,05$). Um resultado a ser

destacado neste mês foi que todo tempo de interação social entre indivíduos afetados ocorreram somente entre indivíduos afetados, não havendo interferência de indivíduos não afetados, mesmo estes estando no mesmo ambiente que aqueles.

No mês 7 a tendência dos outros meses continuou a mesma. Isto quer dizer também neste mês os cães afetados apresentaram menor tempo de interação social entre os com outros cães que os cães não afetados (mediana=15, 5 minutos para cães não afetados; mediana 1,5 minutos para os cães afetados; $p<0,05$). Já no comportamento de matilha o resultado foi o oposto, ou seja, os cães afetados apresentaram maior tempo médio que os cães não afetados (mediana=224,5 minutos para cães não afetados; mediana= 238,5 minutos para cães não afetados, $p<0,05$).

No Mês 8 foram encontrados resultados semelhantes ao mês anterior. Neste mês os cães afetados apresentaram maior média de comportamento de matilha que os cães não afetados (Mediana= 224 minutos para cães não afetados e mediana= 240 minutos para cães afetados, $p<0,05$). No comportamento de interação social os resultados também seguiram àqueles mostrados no mês anterior (mediana=16 minutos para cães não afetados e mediana= 0 minutos para cães afetados, $p<0,05$).

No mês 9 foram encontrados resultados semelhantes aos meses anteriores. Os cães afetados apresentaram maior mediana de comportamento de matilha que os cães não afetados (Mediana=215 minutos para cães não afetados; mediana 240 minutos para cães afetados; $p<0,05$). Já com relação a categoria interação social entre indivíduos, encontramos que em média o comportamento dos cães afetados foi menor que dos cães não afetados (mediana=25 minutos para cães não afetados; mediana=0 minutos para cães afetados; $p<0,05$).

No mês 10 foram encontrados resultados semelhantes aos meses anteriores. Os cães afetados apresentaram maior mediana de comportamento que os cães não afetados (mediana= 217 minutos para cães não afetados, e mediana = 240 minutos para cães afetados; $p<0,05$). Já para o comportamento de interação social os afetados apresentaram tempos de interação significativamente menores que os cães não afetados (mediana 23 minutos para cães não afetados; mediana= 0 minutos para cães afetados).

No mês 11 os resultados continuaram seguindo a tendência dos meses anteriores. Isto quer dizer que neste mês os cães não afetados também apresentaram menor comportamento de matilha (Mediana= 204 minutos para cães não afetados e 240 minutos para cães afetados $p<0,05$). Já na interação social com outros cães os cães não afetados apresentaram, em média, maior de comportamento que os cães afetados (mediana =36 minutos para cães não afetados e mediana = 0 minutos para cães afetados).

7.4 Discussão

Os resultados nos mostram que houve diferença no comportamento parental da mãe com cada grupo de filhotes, sendo que a mãe dispõe mais tempo no cuidado parental dos filhotes não afetados pela distrofia muscular. Essa diferença de tempo de cuidado pode ser fator de influência no desenvolvimento do comportamento de filhotes, com relação ao temperamento e personalidade (GUARDINI et al., 2016) e no desenvolvimento fisiológico como um todo (DIETZ; ARNOLD; GOERLICH-JANSSON; VINKE, 2018). Isso pode ser explicado pela estampagem (“imprinting”) do comportamento dos filhotes na mãe. Os filhotes conforme vão sugando, dando pequenas cabeçadas e realizando outros comportamentos, estampam suas características na mãe (FOGLE, 1992). Esse motivo vem do fato de o sistema nervoso de filhotes de cães ainda não estarem completamente desenvolvidos quando nascem, fazendo com que os mesmos dependam de fatores ambientais para completarem esse desenvolvimento (FOYER; WILSSON; JENSEN, 2016).

Outro argumento que pode justificar os dados acima citados é o de que as mães precisam investir muito tempo e energia no cuidado dos filhotes. Por esse motivo todo o tempo gasto no cuidado dos filhotes precisa ser otimizado (PAUL et al., 2017), sendo assim é natural pensar que a mãe dedique maior tempo no cuidado de filhotes saudáveis. No caso de seres humanos a família também precisa se adaptar às condições dessa criança, com distrofia muscular de Duchenne, porém nesse caso vemos um esforço maior da família para com as condições das crianças (BAIOCCO, et al., 2017).

Porém embora se tenha muito estudo da relação entre a relação ser humano-cão, ainda não se estudou com grandes detalhes a relação entre filhotes e mãe, nos cães. Os estudos são particularmente carentes no quesito formação de apego do filhote com a mãe durante o período sensitivo, período este que servirá de subsídio para o comportamento social do cão adulto; mas estudos mostram que estímulos sociais e não sociais são essenciais, nesta fase, são essenciais para o desenvolvimento comportamental saudável dos cães. Isso pode influir até mesmo na criação de cães, pois canis cujos filhotes interagem mais com as mães tendem a produzir filhotes com menos problemas comportamentais (DIETZ, *opus cit.*; DENDONCKER et al., 2019).

O segundo resultado não mostra diferenças significativas entre os comportamentos sociais dos filhotes afetados e não afetados durante o segundo mês de vida deles. Vale lembrar que neste período as características da distrofia muscular ainda não eram aparentes, pois, estas características podem levar algumas semanas para se manifestar, sendo que os sintomas progridem de maneira mais rápida no período de 3 a 6 meses (JUBB et al., 2007; KORNEGAY, 2017). Este resultado, aliado com o descoberto nos meses seguintes nos sugere que há relação entre o surgimento dos sintomas da doença e o aparecimento das diferenças comportamentais observadas no experimento 1, dado que animais doentes tendem a ficar mais letárgicos e até mesmo deprimidos (HART, 1991).

No terceiro mês já foram encontradas diferenças significativas de tempo, com os cães afetados interagindo menos, porém apresentado um maior tempo de comportamento

de matilha. A diferença nos tempos de interação e comportamento de matilha pode ser explicada pelo fato do último incluir tempo de repouso. Isto quer dizer os cães afetados tiveram um maior tempo de repouso que os indivíduos não afetados. Esse resultado também pode ser explicado pelo fato de a partir desse mês as características da distrofia muscular começarem a aparecer (KORNEGAY, 2017), fazendo com que os indivíduos afetados comecem a ter limitações musculares.

No mês 4 as características da doença se acentuaram. Isso pode explicar tanto o fato de os indivíduos não afetados não apresentarem diferenças significativas no comportamento de matilha, quanto apresentarem essas diferenças na categoria interação social. O fato de não ter havido diferenças significativas no comportamento de matilha, pode ser explicado pelo aumento de repouso dos cães afetados. Esse aumento de repouso pode ser explicado pelo aumento da fadiga muscular, característica da evolução da distrofia muscular. Por outro foi verificado um aumento na diferença na interação entre os filhotes, com os filhotes afetados interagindo menos que os filhotes não afetados. Esse aumento na diferença também pode ser explicado devido ao agrave dos sintomas da doença que aumentou a atrofia muscular e como consequência diminuiu os movimentos desses filhotes.

No mês 5 e nos meses que se seguiram as diferenças se acentuaram na categoria interação social, sendo que no mês 6 a mediana de tempo para os filhotes afetados chegou a 0 minutos. As diferenças no comportamento de matilha também aumentaram, porém dessa vez os afetados tinham uma mediana de comportamento superior à dos não afetados. Sobre o comportamento de matilha uma possível explicação do aumento pode estar no fato dos afetados não interagirem muito entre si, e, devido a fadiga crônica causada pela acentuação dos sintomas da doença, não conseguirem passar muito tempo ativos, podendo aumentar assim o tempo de repouso. Com relação ao aumento da diferença do comportamento interação social algumas explicações podem ser dadas. Uma delas pode ser a acentuação dos sintomas da doença, que neste mês ficaram mais evidenciadas.

Outra possível explicação pode estar no fato de a partir do mês 5 os cães afetados terem ficado separados dos cães não afetados. A socialização pode ser considerada fator essencial para o desenvolvimento comportamental dos cães. Esse fato pode ser justificado até mesmo por razões hormonais dado que a separação causa uma diminuição do comportamento social o que pode até mesmo diminuir a oxitocina, hormônio relacionado ao prazer (ROSSI, et al., 2018).

Concluindo podemos dizer que a diferença comportamental encontrada nos resultados é influenciada pela distrofia muscular, pois a acentuação das diferenças dos filhotes afetados para com os filhotes não afetados ocorre quando a doença manifesta seus sintomas mais marcantes.

7.5. Referências

1. ALTMANN, J. Observational Study of Behavior: Sampling Methods. **Behaviour**, v. 49, n. 3, p. 227–266, 1974.
2. BAIOTTO, R.; CASTELLI GATTINARA, P.; CIOCCETTI, G.; IOVERNO, S. Parents' Reactions to the Diagnosis of Duchenne Muscular Dystrophy: Associations Between Resolution, Family Functioning, and Child Behavior Problems. **Journal of Nursing Research**, v. 25, n. 6, 2017
3. BRAASTAD, B. O. Effects of prenatal stress on behaviour of offspring of laboratory and farmed mammals. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 61, n. 2, p. 159–180, 1998.
4. DENDONCKER, P. A.; DE KEUSTER, T.; DIEDERICH, C.; DEWULF, J.; MOONS, C. P. H. On the origin of puppies: Breeding and selling procedures relevant for canine behavioural development. **Veterinary Record**, v. 184, n. 23, p. 710, 2019.
5. DIETZ, L.; ARNOLD, A. K.; GOERLICH-JANSSON, V. C.; VINKE, C.M. The importance of early life experiences for the development of behavioural disorders in domestic dogs. **Behaviour**, v. 155, p. 83–114, 2018.
6. FOGLE, B. **The dog's Mind: understanding your dog's Behavior**. 1st Edition. New York: Maxwell Macmilian International, 1992.
7. FOYER, P.; WILSSON, E.; WRIGHT, D.; JENSEN, P. Early experiences modulate stress coping in a population of German shepherd dogs. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 146, n. 1–4, p. 79–87, 2013.
8. FOYER, P.; WILSSON, E.; JENSEN, P. Levels of maternal care in dogs affect adult offspring temperament. **Scientific Reports**, v. 6, n. January, p. 1–8, 2016
9. GAZZANO, A.; MARITI, C.; NOTARI, L.; SIGHIERI, C.; MCBRIDE, E. A. Effects of early gentling and early environment on emotional development of puppies. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 110, n. 3–4, p. 294–304, 2008
10. GUARDINI, G.; BOWEN, J.; RAVIGLIONE, S.; FARINA, R.; GAZZANO, A. Maternal behaviour in domestic dogs : a comparison between primiparous and multiparous dogs. **Dog Behavior**, v. 1, p. 23–33, 2015
11. GUARDINI, G.; MARITI, C.; BOWEN, J.; FATJÓ, J.; RUZZANTE, S.; MARTORELL, A.; SIGHIERI, C.; GAZZANO, A. Influence of morning maternal care on the behavioural responses of 8-week-old Beagle puppies to new environmental and social stimuli. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 181, p. 137–144, 2016.
12. HART, B. L. The Behavior of Sick Animals. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, n. 2, p. 225–237, mar. 1991
13. JUBB K.V.F., KENNEDY P.C. & PALMER N. **Pathology of Domestic Animals**, Volume 1. 5th ed. Elsevier, Philadelphia, USA. P. 211, 2007.
14. KORNEGAY, J. N. The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. **Skeletal Muscle**, v. 7, n. 1, p. 9, 2017.
15. LINDSAY S.R. **Handbook of Applied Dog Behavior and Training** .Volume One. 1st Edition. Iowa USA: Blackwell Publishing, 2000.

16. MADSEN, E. A.; PERSSON, T. Contagious yawning in domestic dog puppies (*Canis lupus familiaris*): The effect of ontogeny and emotional closeness on low-level imitation in dogs. **Animal Cognition**, v. 16, n. 2, p. 233–240, 2013.
17. MIKLÓSI, A. **Dog behavior, evolution, and cognition**. 2nd Edition. Oxford United Kingdom: Oxford University Press, 2015.
18. PAL, S. K. Play behaviour during early ontogeny in free-ranging dogs (*Canis familiaris*). **Applied Animal Behaviour Science**, v. 126, n. 3–4, p. 140–153, 2010.
19. PAUL, M.; SAU, S.; NANDI, A. K.; BHADRA, A. Clever mothers balance time and effort in parental care: a study on free-ranging dogs. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 1, p. 160583, 2017.
20. ROSSI, A.; PARADA, F. J.; STEWART, R.; BARWELL, C.; DEMAS, G.; ALLEN, C. Hormonal correlates of exploratory and play-soliciting behavior in domestic dogs. **Frontiers in Psychology**, v. 9, n. SEP, p. 1–10, 2018.
21. SIKINNER, B.F. The Phylogeny and Ontogeny of Behavior. **Science**, v.153, p. 1205-1213, 1966.
22. WAAIJ, E. H. Van Der; WILSSON, E.; STRANDBERG, E. Genetic analysis of results of a Swedish behavior test on German Shepherd Dogs and Labrador Retrievers 1. p. 2853–2861, 2014.
23. WYNNE, C. D. L.; UDELL, M. A. R.; LORD, K. A. Ontogeny's impacts on human–dog communication. **Animal Behaviour**, v. 76, n. 4, p. e1–e4, out. 2008.

8 Anexo 1

Ontogenesis and Social Behavior in Dystrophic Golden Retrievers (GRMD): a comparative analysis

Fausto Assumpção Fernandes ¹⁺ Caroline Macedo dos Santos² +Concepta Margaret Mcmanus Pimentel³+ Maria Angélica Miglino^{1*}+

¹Sector of Wild and Domestic Animals Anatomy, College of Veterinary Medicine and Animal Science of the University of Sao Paulo FMVZ/USP

²University São Judas Tadeu, São Paulo, Brasil

³ Sector of Physiologic Sciences, Institute of Biologic Sciences of the University of Brasilia .

*Corresponding Author:

e-mail: miglino@usp.br. Phone: 55 11 30917690

Adresse: Av. Professor Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, São Paulo, Brazil

CEP:05508-270

+ All authors contributed equally to work

ABSTRACT: A dog's social behavior can be defined as a set of behaviors performed during interspecific interactions. This kind of behavior can be divided into four periods: neonatal, the transitional period, socialization and juvenile. In this paper, we aim to compare the social interaction between dogs affected by muscular dystrophy with unaffected dogs. The study had one pilot study and one experiment. During the pilot study, a 9-year-old male dog affected by muscular dystrophy and four female dogs carrying the dystrophy gene, but not affected by dystrophy, aged between 6 and 7 years were analyzed. During the experiment, 5 puppies were selected: 3 unaffected females and two males affected by muscular dystrophy, born from crossing a carrier female and a normal male. The dog's behavior was filmed and analyzed according to three categories: pack behavior; social interaction between dogs and occupation of territory. The results of the experiment were analyzed with the Mann-Whitney statistical test for independent factors. There was a significant difference between the affected dogs' behavior compared to the unaffected ones. This difference coincides with the first disease symptoms and increases if the affected animals are separated from the unaffected animals. We can conclude that the dystrophy influenced the dog's behavior.

KEYWORDS: Animal models, DMD, dog behavior, pack, territory

1. INTRODUCTION

Muscular dystrophies constitute a group of heterogeneous genetic diseases (Dai et al, 2015). These diseases are characterized by the absence or very low presence of a membranous cytoplasmic protein - dystrophin. Studies show that this protein is responsible for stabilizing the sarcolemma during muscle contraction (Ervasti, 2007). The absence of this protein can cause severe degeneration of the skeletal muscles, which can start very early in an individual's life (Valentine et al., 1990).

Despite showing some problems, such as variation in symptoms, the dog is still a good model for studying muscular dystrophies. This is because they present similar symptoms to human dystrophies such as progressive degeneration of skeletal and cardiac muscle, which leads to heart and respiratory failure (Barthélèmy et al., 2014). This can lead to the death of these individuals (Lessa, et al., 2014; Kornegay et al., 2003). In addition, the weight of these dogs often resembles that of a child, which can be advantageous if we consider stem cell drug action studies (Abreu, 2014). The most common dog model for dystrophy studies is that of the Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD) (Barthélèmy, *opus cit*).

Ontogenesis or development can be described as the evolution of events in organisms, which culminates in a more complex phenotypic form (Miklósi, 2015). The origin and development of a dog's behavior has components that are innate or may be learnt by experience and both should be considered when evaluating the animals. An example of inherited behavior is the dogs' ability to follow human social cues. Puppies already have this ability, which demonstrates that this behavior has a strong innate component (Wynne, Udell et al., 2008).

Social behavior can be defined as a set of behaviors presented during an intraspecific interaction (Abrantes, 1997). This behavior in dogs is influenced by several external factors, especially during the critical period that can be defined as the period in which the puppy must be exposed to a stimulus until a certain age; otherwise, the learning

opportunity will be lost (Beaver, 2001). A dog's social behavior can be divided into four periods: neonatal (first 2 weeks), transition period, socialization and juvenile (Lindsay, 2000).

In this study we aimed to verify when the differences in social behavior in dogs affected and unaffected by muscular dystrophies occurs and if this coincides with the onset of the first symptoms of the disease. A pilot study was performed to see if there are differences in behavior between an affected dog and unaffected ones. The initial hypothesis would be that the disease would influence the behavior of dogs, as it imposes certain physical limitations on its carriers, forcing them to adapt. In the second part, we evaluated the social behaviors of puppies and parental care.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1 Subjects

2.1.1 Pilot experiment

The subjects used in this pilot experiment were 5 Golden Retriever dogs coming from the Golden Retriever Muscle Dystrophy (GRMD) kennel in Brazil. The tested dogs consisted of four unaffected female carriers of the gene for muscular dystrophy, ages 6 to 7 years old, not neutered and one male affected by muscular dystrophy, 9 years of age, neutered. The dogs were observed for 40 days.

2.1.2 Experiment

A Golden Retriever litter was used, originating from crossing a female carrier of the gene for muscular dystrophy with a normal male. This litter had two affected males and three unaffected females. Their behavior was recorded from the first month until the 11th Month. In the first month, parental care behavior was analyzed. From the 2nd until the 11th month, social behavior was recorded.

2.2 Method:

The methodology used for both experiments was that of a focus group (Altmann, 1974), with one group consisting of unaffected dogs and the other of affected dogs. Interactions of affected dogs were counted when at least one affected dog interacted with one or more dogs, whether these other dogs were affected or unaffected. For the experiment the dogs were kept together until the 5th month. After this, the affected dogs were separated from the unaffected.

For the pilot study all the dogs were kept together.

The methodology included:

- 1) Analysis of the behavior of normal and GRMD dogs in GRMD Kennel Brazil, located in the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science at the University of Sao Paulo, through the scanning method, when the interaction between more than one dogs was evaluated; and animal-focus when the interactions of the affected individual with other members of the group were recorded (Altmann, 1974).
- 2) Observed behaviors were recorded on video, through the security cameras located in the kennel, for further analysis. These videos were always recorded in the morning (from 8:00 AM to 12:00 AM). This period was chosen because the dogs were more active during this period.
- 3) In the pilot study there was a recording period of 40 days, and the first 10 days were selected, according to the methodology adopted by Hiby, Rooney & Bradshaw (2006). Times were calculated in minutes, constituting 240 minutes per episode (4 hours per day - Period of recording), totaling 2400 minutes.
- 4) In the experiment, we used the 10 first days of each month, totaling 2400 minutes per month over an 11-month period.

2.3 Ethogram

2.3.1 Social behavior was observed according to a Social Ethogram (Adapted from Pal, 2010):

Categories	Description
Pack behavior	
Walking	Act of two or more individuals moving in any direction, in a synchronized manner
Lying Down	Act of two or more individuals that remain lying or sitting near each other
Feeding	Act of two or more individuals feeding using the same container
Drinking water	Act of two or more individuals taking water in the same container at the same time
Barking	Act of one or more individuals barking at the same time

Social interaction Between Dogs	
Licking	Act of one individual licking the other
Mounting Play	Act of a dog simulating the behavior of mounting on one another, without pelvic thrusting
Light bites	Act of an individual giving small bites on another dog
Barking	Act of an individual barking at another
Squatting	Act of an individual crouching in front of the other and carrying out quick movements with the tail

2.3.2 Parental Care behavior described according to a Parental care ethogram adapted from Guradini et al. (2015).

Categories	Description
Contact mother-pup	Physical contact of any kind between the mother and the pups
Nursing	Composed of a several components: active suckling, finding a nipple, maintaining the grasp, pushing in of forelegs, pulling up of a head, disposing of rear legs.
Licking	Each occurrence of the mother' licking the pup other than anogenital area
Licking the anogenital area	Each occurrence of the mother licking the anogenital area.

2.4 Statistical analysis

The data was analyzed by Mann-Whitney test for independent samples. The absolute data and percentages are analyzed, and the results considered significant when $p < 0.05$.

2.5 Physical space

The Golden Retriever Muscle Dystrophy (GRMD) Kennel Brazil, is situated in the Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science at the University of São Paulo and comprises a total area of approximately 120 m² distributed as including:

- 15 Bays with the following footage:
 - Bays 1 to 11: Covered area (2.04 m²) and solarium (1.90 m²)
 - Bay 12: Covered Area (2.12 m²) and Solarium (2.12 m²)
- Pantry (6.64 m²)
- Yard (36.65 m²)
- Lawn (38.89 m²)

On the pilot study all the dogs were kept in the lawn and at the yard. In the experiment, after the 5th month the unaffected dogs were kept in the yard and lawn. The affected dogs were kept in the bays, but with their doors open. At night, all dogs (affected and unaffected) were kept at the bays with the doors closed.

3. RESULTS

3.1 Pilot experiment

For pack behavior and in the interaction with other dogs there was a difference in the behavior of the affected animal when compared with the unaffected animals.

i. Pack and Social Interaction Behavior (Table1)

Table 1: Pack and Social Interactions between dogs affected and unaffected by muscular dystrophy

Categories	Unaffected	Affected
Pack		
	The dog initially positioned itself quadrupedally where the hind limbs are slowly led backwards and positioned	In the affected dog, the pelvic limbs become tense at the time of flexion of the patellar region, causing the sitting

Lying Down	under the animal's body, thus causing the patellar region to flex, resulting in the sitting position, where the region of the thoracic and cervical limbs were kept forward. After this, the thoracic limbs move slowly forward, lowering the dorsal region. This results in the contact of the caudal region and the thoracic limbs on the ground, keeping the animal in a ventral dorsal position with its head forward or on the ground.	motion to be sudden. After this movement, the thoracic limbs also move forward sharply, making the final movement abrupt.
Drinking Water	The dog projects its tongue out of the oral cavity. When the tongue encountered the water, its curvature occurs. Just after, the tongue went backwards, thus flexing and retracting it back into the oral cavity. Because of this movement, a column of water appeared and in this way the dog closes the oral cavity before the water fell out and therefore can swallow the water.	The dog flexing the tongue back and closing the oral cavity. Concomitantly the animal quickly flexes backward thus pushing the water column that is formed by flexing the tongue backwards giving the animal more time to swallow the water and repeat the process.
Walking	The movement was performed when the paw of the thoracic limb performs the same movement as the homologous paw of the pelvic limb, thus resulting in a balance of movement exerted by the animal's body.	The affected dog had difficulty supporting his body. So, the dog's body balance during the movement is compromised. Therefore, a pendulum gait is developed where there is no balance on both sides.
	The dog positions itself quadrupedally, because the positioning of cervical, thoracic limbs and pelvic limbs facilitates food swallowing. They used their incisors to capture the food and their molars to break the food into	The affected dog had more difficulty feeding, because it had weaker oral cavity muscles. In addition to the difficulty in swallowing, the animal lay on the floor of the enclosure, remaining in a prone position and swallowing

Feeding	smaller portions and, together with the tongue, aided the movement of food pieces back and forth in the oral cavity to cause friction of solid particles throw the teeth.	the food. He also extended the thoracic limbs and kept the cervical region flexed, thus giving greater aid in swallowing the food.
Barking	Initiates calling (barking) behavior near another unaffected dog. This vocalization causes the second dog to start vocalizing as well. The vocalization can start with two dogs and affect the entire pack. The vocalization consists of short and constant barking and can last several minutes.	His vocalization and with longer barks, not occurring too many repetitions.
Social Interactions		
Squatting	The dog put its thoracic limbs forward and shift its body backwards. The pelvic region was upright, causing the animal to lean forward. At the same time, the animal wagged its tail in a relaxed manner, informing the other dog that it wanted to play.	The affected animal placed its thoracic limbs also in front of the body, this movement was not completely performed, consequently, not having a complete squat. The tail movement occurred in a similar way to the unaffected animal, that is, in a relaxed way, which informed the intention to play to the other dog.
Mount Playing	One dog stood over another dog and performed pelvic movements simulating copulation. This mount differs from copulation, as there was no pelvic engagement.	The affected dog could not maintain the riding movement for a long time, and kept his thoracic limbs tense
	The upright dog began to wag its tail in a relaxed manner. Soon after, both dogs began to	The affected dog may perform short bites on another dog. In general, the animal could also lean and put its mouth on the

Light Bites	exchange short bites without clamping jaws on each other.	other dog but was almost never in a position to encourage the play.
Licking	An unaffected dog initiated that behavior by sticking its tongue out of the oral cavity. Right after he puts his tongue in contact with the other dog's body and performs vertical movements over and over.	The affected dog had atrophic tongue muscles. For this reason, he could not perform the licking behavior.
Barking	The unaffected dog approached an unaffected dog. After that, the first dog (who approached) started short barks, which might or might not be followed by squatting behavior.	The affected dog also approached another unaffected dog. When he did, he started long barks that were generally not accompanied by squatting behavior.

3.2 Experiment

There was a difference in the mother's parental investment towards the affected puppies, that is, the mother invested, in the first 10 days of birth, less time in the care of the affected than the unaffected puppies (mean: 240 minutes for unaffected puppies and 212 minutes for unaffected puppies, $p < 0.05$).

In the second month of evaluation, the social behaviors of affected and unaffected individuals were evaluated. Differences were found between the times of social behavior, with the affected puppies having shorter social behavior time. However, if we analyze the categories of pack behavior and social interaction with other dogs, the difference found is not significant (Table 2).

On the other hand, in the third month, significant differences were found between affected and unaffected dogs. In social interaction with other dogs, affected dogs had a shorter average interaction time. For pack behavior the opposite occurred, unaffected dogs had a shorter time than affected dogs for pack behavior. In the 4th month, there were some changes from the previous month's data. Although affected dogs had a higher

median social behavior than unaffected dogs, no significant differences were detected in the pack behavior category. However, there were significant differences in the social interaction category (Table 2).

From the 5th, until the 11th month, there was a decrease in social interaction between affected dogs (Table 2). Regarding the pack behavior, there was an inversion with the affected ones presenting longer time than the unaffected ones.

Table 2. Mean time for 10 months of social interaction and pack behavior in dogs affected and not affected by muscular dystrophy.

Month	Unaffected dogs	Affected Dogs	Significance
Social interactions	(minutes)	(minutes)	
2	19.3	11.5	P>0.05
3	37	15	P<0.05
4	19.5	6.5	P>0.05
5	19	0	P<0.05
6	16	3.5	P<0.05
7	15.5	1.5	P<0.05
8	16	0	P<0.05
9	25	0	P<0.05
10	23	0	P<0.05
11	36	0	P<0.05
Pack Behavior			
2	225	220.7	P>0.05
3	203	224	P<0.05
4	220.5	233.5	P<0.05
5	221	240	P<0.05
6	230	238.5	P<0.05
7	224.5	238.5	P<0.05
8	224	240	P<0.05

9	215	240	P<0.05
10	217	240	P<0.05
11	204	240	P<0.05

4. DISCUSSION

There was a difference in the mother's parental behavior with each group of pups, as we can see on the first month. The mother dedicated more time in the parental care on puppies unaffected. This time difference may influence the development of puppies' behavior regarding their temperament and personality (Guardini et al., 2016).

Mothers need to invest a lot of time and energy in taking care of the puppies, so time needs to be optimized (Paul et al., 2017). It is natural to think that the mother devotes more time to the care of healthy puppies. During nursing, the unaffected puppies spent more time feeding, and had more attention from the mother (the mother presents more interaction behavior with the unaffected puppies). Due to that fact the unaffected puppies spent more time in breast feeding than the affected ones. But in the first month the puppies are still developing the central nervous system (Lindsay, opus cit.) so they have few interactions with the mother. After the second month (when weaning occurs) the mother stops taking care of the puppies. By that time, the puppies can feed by themselves. In humans, the family also needs to adapt to the conditions of this child with Duchenne muscular dystrophy, but here we see a family investing more time in taking care of a sick children (Baiocco et al., 2017).

The second month shows no significant differences between the social behaviors of affected and unaffected puppies. It is important to remember that, during this period, the characteristics of muscular dystrophy were not yet apparent. The dystrophy characteristics may take a few weeks to manifest and symptoms progress more rapidly over a period of 3 to 6 months (Jubb et al., 2007; Kornegay, 2017). This result suggests that there may be a relationship between the first appearance of disease symptoms and the behavioral differences observed in the experiment 1, since sick animals tend to become more lethargic and even depressed (Hart, 1991). This also explains why, in the pilot experiment the affected dog showed significant differences in all the behaviors, the dog was 9 years old. Age can be considered an important factor to analyze these

differences and the affected dog here was of advanced age (9 years old) which can influence some behaviors due to cognitive dysfunction processes (Neilson et al. 2001).

In the third month, significant differences in behaviors were found. The affected dogs interacted less with other dogs but presented longer periods of pack behavior. This is also described in the pilot experiment, where we saw that the dystrophic dog rarely presented some behaviors. This can also be explained by the fact that, in this month, the muscular dystrophy characteristics began to appear (Kornegay, opus cit). The affected dogs began to have muscle limitations. The socialization period, occurring between the 3rd and 12th week of life, coincides with one of the critical periods of the disease, which occurs between the 1st and 4th week of life (Collins, 2003). A dog with physical limitations may, for example, show less interest in interacting with other dogs or people, (primary and secondary socialization, respectively), causing certain abilities resulting from these interactions to be compromised.

In the 4th month the disease symptoms increased in the affected dogs. This may explain why unaffected dogs did show differences in social interaction. The increase in the difference in pup interaction, with affected pups interacting less than unaffected pups can be explained due to the aggravation of the symptoms of the disease, increasing muscle atrophy and consequently decreased movements of these pups. The fact that there were no significant differences in pack behavior can be explained by the increase in muscle fatigue, characteristic of the evolution of muscular dystrophy.

During the 5th month and in the months that followed, the differences were accentuated in the social interaction category, and in month six the mean time for affected puppies was 0 minutes. Differences in pack behavior also increased, with the affected pups showing longer behavior than the unaffected. One possible explanation may be that the affected pups do not interact much with each other, maintaining a longer rest time, which increased the total pack behavior time, because of the rest. For the increased difference in social interaction behavior some explanations can be given. One may be the accentuation of the symptoms of the disease which begin worsen from month 5, and it is possible to include the emergence of new complications such as heart disease. Another explanation may be that the affected puppies were physically separated from the others from month five on.

Because GRMD is an experimental model for the treatment of DMD, several gene therapies are being applied to dogs (Collins *opus cit*; McGreevy, *opus cit*). These therapies aim to stimulate or increase dystrophin production, thereby decreasing the effects of muscular dystrophy. Although many studies are being carried out, the effect of these therapies still needs to be studied. If the effects of the disease on dogs diminish, the development of social behavior in dogs can be improved, thereby increasing their socialization ability.

5. CONCLUSION

There are significant differences between the behaviors of unaffected and affected dogs and can conclude that this difference is related to the dystrophy.

Acknowledgements

The authors would like to thank all laboratory members, especially to Paula Fratini for her help in taking care of the experimental dogs and for Ana Claudia Oliveira for reviewing the manuscript.

The first author had financial grants from CAPES

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interests.

Ethical approval

This work followed the criteria of the Bioethics Committee of the Veterinary Medicine and Animal Science College of the University of Sao Paulo (CEUA n° 5893010216).

6. REFERENCIAS

1. Abrantes, R. 1997. Dog Language: Encyclopedia of Canine Behaviour. Wakan Tanka Publisher, USA
2. Abreu, D K . 2014. “Imunomodulação *in vitro* de células tronco mesenquimais em cães da raça golden retriever saudáveis e afetados pela distrofia muscular”. PhD Thesis., Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Departamento de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres. Universidade de São Paulo, São Paulo.
3. Adams, J. M.; Perry, J. 1998. Análise da marcha: aplicação clínica. In: ROSE, J; GAMBLE, J.G. Marcha humana, 2.ED. São Paulo.
4. Altmann, J., 1974. Observational Study of Behavior: Sampling Methods. Behaviour 49, 227–266.
5. Baiocco, R., Gattinara, P.C., Ciocchetti, G., Ioverno, S., 2017. Parents’ reactions to the diagnosis of duchenne muscular dystrophy: Associations between resolution, family functioning, and child behavior problems. J. Nurs. Res. 25, 455–463.
6. Beaver B V. 2001. Comportamento canino: Um guia para veterinários. 1. Ed., E. Rocca :São Paulo.
7. Collins, C.A., Morgan, J.E., 2003. Duchenne’s muscular dystrophy: Animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. Int. J. Exp. Pathol. 84, 165–172.
8. Dai, Y., Wei, X., Zhao, Y., Ren, H., Lan, Z., Yang, Y., Chen, L., Cui, L., 2015. A comprehensive genetic diagnosis of Chinese muscular dystrophy and congenital myopathy patients by targeted next-generation sequencing. Neuromuscul. Disord. 25, 617–624.
9. Ervasti, J.M., 2007. Dystrophin, its interactions with other proteins, and implications for muscular dystrophy. Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis. 1772, 108–117.
10. Guardini, G., Bowen, J., Raviglione, S., Farina, R., Gazzano, A., 2015. Maternal behaviour in domestic dogs : a comparison between primiparous and multiparous dogs. Dog Behav. 1, 23–33.
11. Guardini, G., Mariti, C., Bowen, J., Fatjó, J., Ruzzante, S., Martorell, A., Sighieri, C., Gazzano, A., 2016. Influence of morning maternal care on the behavioural responses of 8-week-old Beagle puppies to new environmental and social stimuli. Appl. Anim. Behav. Sci. 181, 137–144.
12. Hart, B.L., 1991. The Behavior of Sick Animals. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 21, 225–237.
13. Jubb K.V.F., Kennedy P.C. & Palmer N. 2007. Pathology of Domestic Animals, Volume 1. 5th ed. Elsevier, Philadelphia: USA.
14. Kornegay, J.N., Cundiff, D.D., Bogan, D.J., Bogan, J.R., Okamura, C.S., 2003. The cranial sartorius muscle undergoes true hypertrophy in dogs with golden retriever muscular dystrophy. Neuromuscul. Disord. 13, 493–500.
15. Kornegay, J.N., 2017. The golden retriever model of Duchenne muscular dystrophy. Skelet. Muscle 7, 9.
16. Lindsay S.R. 2000. Handbook of Applied Dog Behavior and Training .Volume One. 1st Edition. Blackwell Publishing: Iowa, USA.
17. Lessa, T.B., de Abreu, D.K., Rodrigues, M.N., Brólio, M.P., Miglino, M.A., Ambrósio, C.E., 2014. Morphological and ultrastructural evaluation of the golden

- retriever muscular dystrophy trachea, lungs, and diaphragm muscle. *Microsc. Res. Tech.* 77, 857–861.
18. McGreevy, J.W., Hakim, C.H., McIntosh, M.A., Duan, D., 2015. Animal models of Duchenne muscular dystrophy: from basic mechanisms to gene therapy. *Dis Model Mech* 8, 195–213.
 19. Miklósi, A. Dog behavior, evolution, and cognition. 2015. 2nd Edition. Oxford University Press. Oxford: United Kingdom.
 20. Neilson, J.C., Hart, B.L., Cliff, K.D., Ruehl, W.W., Wright, J.C., Nesselrote, M.S., 2001. Prevalence of behavioral changes associated with age-related cognitive impairment in dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 218, 1787–1791.
 21. Pal, S.K., 2010. Play behaviour during early ontogeny in free-ranging dogs (*Canis familiaris*). *Appl. Anim. Behav. Sci.* 126, 140–153.
 22. Valentine, B. a, Blue, J.T., Shelley, S.M., Cooper, B.J., 1990. Increased Serum Alanine Aminotransferase Activity Associated with Muscle Necrosis in the Dog. *J. Vet. Intern. Med.* 4, 140–143.
 23. Vaughan, C.L; Davis, B.; O'Connor, J. 1992. Dynamics of human gait. Human Kinetics Publisher. Champaign Illinois: United States.
 24. Wynne, C.D.L., Udell, M.A.R., Lord, K.A., 2008. Ontogeny's impacts on human–dog communication. *Anim. Behav.* 76, e1–e4.