JULIANA PASSOS ALVES DOS SANTOS

**Ultra-sonografia muscular cervical e pélvica de cães da raça Golden Retriever
portadores e afetados pela Distrofia Muscular e em, terapia celular**

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e

Silvestres

Orientadora:

Profa. Dra. Maria Angélica Miglino

São Paulo

2008

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.1951
FMVZ

Santos, Juliana Passos Alves dos

Ultra-sonografia muscular cervical e pélvica de cães da raça Golden Retriever portadores e afetados pela Distrofia Muscular e em, terapia celular / Juliana Passos Alves dos Santos. – São Paulo: J. P. A. Santos, 2008.

114 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2008.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

1. Golden Retriever. 2. Distrofia muscular. 3. Ultra-sonografia. 4. Terapia celular. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Ultra-sonografia muscular cervical e pélvica de cães da raça Golden Retriever portadores e afetados pela distrofia muscular e em terapia celular", protocolado sob o nº1002/2006, utilizando 08 (oito) cães, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 18/10/06".

(We certify that the Research "Cervical and Pelvic muscular ultrasound of Golden Retriever dogs carrying and affected by muscular dystrophy and in cellular therapy", protocol number 1002/2006, utilizing 08 (eight) dogs, under the responsibility of Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 10/18/2006).

São Paulo, 13 de dezembro de 2007

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Juliana Passos Alves dos

Título: Ultra-sonografia muscular cervical e pélvica de cães da raça Golden Retriever portadores e afetados pela Distrofia Muscular e em, terapia celular

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Prof.Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura _____ Julgamento: _____

Aos meus queridos pais, Zeza e Roberto

AGRADECIMENTOS

À Profa Dra Maria Angélica, pela oportunidade oferecida para descobrir como é interessante e fascinante pesquisar.

Ao Prof Dr. Carlos Eduardo Ambrósio, pela oportunidade e confiança no ingresso do mestrado e pelo apoio na tão complicada fase final.

À Profa Dra. Tilde Rodrigues Froes, pela orientação e confiança depositada para realizar o projeto e por todo apoio oferecido em todos os momentos.

Aos estagiários (as) que me ajudaram no experimento, sem eles todo o procedimento para realização dos exames ficaria complicado.

A TODOS os colegas e amigos que encontrei na Anatomia, em especial Thaís, Simone, Marcelos, Matheus, Leandro, Marinas, Angélica, Cris e Karla, pelos momentos de descontração, de convivência, de amizade e de apoio.

Ao Marcelo Machado, pela ajuda de dissecação de peças para descobrir quais músculos cervicais seriam avaliados pelo exame.

Ao seu Augusto, que está sempre com sua alegria de viver no Canil.

Aos meus pais, pelo apoio no ingresso do Mestrado e durante a minha vida toda e pelo exemplo de honestidade, luta, perseverança e conquista.

Ao meu Pikenho, que com seu carinho, paciência, sempre esteve do meu lado e ajudou em tudo em que foi necessário.

À Fapesp, pelo apoio financeiro.

À Deus.....

RESUMO

SANTOS, J. P. A. **Ultra-sonografia muscular cervical e pélvica de cães da raça Golden Retriever portadores e afetados pela Distrofia Muscular e em, terapia celular.** [Cervical e pelvic ultrasonography of Golden Retriever dogs carrying and affected by the Muscular Dystrophy and in cellular therapy.] 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

Os cães Golden Retriever com Distrofia Muscular (GRMD) são considerados modelos experimentais para estudo da Distrofia Muscular de Duchenne que acomete humanos, devido serem geneticamente homologas. Utilizamos o ultra-som muscular para avaliar a evolução terapêutica de injeção de células tronco (CT). Para este experimento utilizamos 8, sendo 6 afetados pela doença e 2 não afetados (portadora e macho normal). Avaliamos de forma qualitativa (visual) e quantitativa (digital) os músculos cervicais *splenius* e *semispinalis capitis* e o músculo pélvico *semitendinosus* e realizamos mensurações musculares. Em relação aos músculos cervicais verificamos que não há alteração visual na arquitetura das fibras, porém o cão tratado via arterial apresentou menores escores na análise digital em relação ao cão controle afetado, deixando suspeitas sobre a migração de CT nesse grupo muscular. O *splenius* apresentou maior ecogenicidade que o músculo *semispinalis capitis* em 7 animais. Para o músculo *semitendinosus*, a portadora apresentou ecogenicidade elevada; os afetados apresentaram variáveis graus de alteração da arquitetura muscular e aumento de ecogenicidade; o macho normal apresentou fibras regulares, porém em alguns exames apresentou ecogenicidade elevada podendo ser consequência da angulação do transdutor. Quanto às mensurações, há diferença entre os afetados e não afetados para o músculo *splenius* e devido à hipertrofia que afeta os músculos pélvicos, não foi possível estabelecer diferenças entre os dois grupos. Concluímos que a ultra-sonografia com transdutores de até 7,5 MHz não é viável para acompanhar evolução terapêutica de injeção de CT em músculos com a pseudohipertrofia de GRMD, devido a modificação severa da arquitetura, não sendo possível a detecção de prováveis reparos da musculatura.

Palavras-chave: Golden Retriever. Distrofia Muscular. Ultra-sonografia. Terapia Celular.

ABSTRACT

SANTOS, J. P. A. **Cervical e pelvic ultrasonography of Golden Retriever dogs carrying and affected by the Muscular Dystrophy and in cellular therapy.**[Ultra-sonografia muscular cervical e pélvica de cães da raça Golden Retriever portadores e afetados pela Distrofia Muscular e em, terapia celular]. 2008. 114 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

The dogs Golden Retriever with Muscular Dystrophy (GRMD) are considered experimental models for study of the Muscular Dystrophy of Duchenne that acomete human, and they are genetically homologue. We use the muscular ultrasound to evaluate the therapeutical evolution of injection of stem cells (SC). For this experiment we use 8, being 6 affected for disease and 2 not affected (carrying and male normal). We evaluate of qualitative form (visual) and quantitative (digital) the cervical muscles *splenius* and *capitis semispinalis* and the pelvic muscle *semitendinosus* and carry through muscular mensure. In relation to the cervical muscles we verify that it does not have visual alteration in the architecture of fibres, however the treat dog saw arterial presented minors props up in the digital analysis in relation the dog has controlled affected, leaving suspicion on the migration of SC in this muscular group. *Splenius* presented greater echogenicity that the muscle *semispinalis capitis* in 7 animals. For the muscle *semitendinosus*, the carrier presented high echogenicity; the affected ones had presented variable degrees of alteration of the muscular architecture and increase of echogenicity; the normal male presented regular fibres, however in some examinations he presented high echogenicity being able to be consequence of the transducer angle. How much to the mensure, it has difference between the affected ones and not affected for the muscle *splenius* and due to hypertrophy that affects the pelvic muscles, it was not possible to establish differences between the two groups. We conclude that the ultrasonography with transducers of up to 7,5 MHz is not viable to follow therapeutical evolution of injection of SC in muscles with the pseudohypertrophy of GRMD, had the severe modification of the architecture, not being possible the detention of probable repairs of the muscle.

Keywords: Golden Retriever. Muscular Dystrophy. Ultrasonography. Celular Therapy

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1	DISTROFIA MUSCULAR.....	11
2.2	TERAPIA CELULAR.....	16
2.3	CONSIDERAÇÕES ANATÔMICAS DO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO.....	17
2.4	CONSIDERAÇÕES DO EXAME ULTRA-SONOGRÁFICO MUSCULAR NA ANÁLISE DE GRMD.....	21
3	MATERAIS E MÉTODOS	24
3.1	MATERIAL	24
3.1.1	Animais	24
3.1.2	Equipamento.....	24
3.2	MÉTODOS.....	25
3.2.1	Técnica do exame ultra-sonográfico muscular.....	25
3.2.2	Protocolo de injeção de células tronco	28
3.2.3	Análise Estatística	29
4	RESULTADOS	31
4.1	Correlações das Mensurações Musculares	31
4.2	Descrição Comparativa das Mensurações Musculares.....	44
4.3	Descrição Qualitativa dos Músculos Cervicais	52
4.4	Descrição Qualitativa e Estatística do Músculo <i>Semitendinosus</i>	65
5	DISCUSSÃO	95
5.1	Avaliação das Correlações das Mensurações Musculares.....	96
5.2	Avaliação Quantitativa e Qualitativa dos Músculos.....	99
6	CONCLUSÃO	105
	REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de cães da raça Golden Retriever (GRMD), uma miopatia hereditária de caráter recessivo, ligada ao cromossomo X, causada pela ausência da distrofina, é geneticamente homóloga à distrofia muscular de Duchene que acomete humanos, portanto, estes cães são considerados modelos experimentais para estudos que buscam tratamentos para meninos vitimados pela doença.

A ultra-sonografia tem se apresentado como uma técnica promissora na investigação de doenças musculares em pacientes humanos, por ser uma técnica que permite a avaliação da ecogenicidade, ecotextura e padrão das fibras musculares.

Atualmente, cães do canil GRMD – Brasil do Departamento de Cirurgia no Setor de Anatomia Animal da FMVZ-USP – coordenado pela Profa. Dra. Maria Angélica Miglino estão sendo utilizados como base nas pesquisas com células-tronco nas distrofias musculares.

No experimento proposto, temos como objetivo avaliar a técnica ultra-sonográfica muscular na evolução terapêutica dos transplantes das células troncos em cães da raça Golden Retriever com distrofias musculares, desta forma, contribuir para as futuras pesquisas na terapêutica da doença de Duchenne no homem.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 DISTROFIA MUSCULAR

As distrofias musculares são um grupo heterogêneo de doenças hereditárias que apresentam degeneração muscular primária. Existem inúmeros tipos de distrofia muscular, sendo que se diferenciam de acordo com a severidade e o tipo muscular afetado (ANTHONY; FROSCH; GIROLAMI, 2005; PRICE; KURODA; RUDNICKI, 2007).

A distrofia muscular de Duchenne (DMD) é a miopatia hereditária mais comum em humanos, acometendo 1 a cada 3500 nascidos vivos do sexo masculino (CAROMANO, 1999; FOSTER; FOSTER; DICKSON, 2006). De caráter recessivo, ligada ao cromossomo X, é caracterizada por uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética, devido à ausência de distrofina na superfície da membrana da célula muscular (EMERY, 2002; CAROMANO, 1999). Pode se manifestar também através de mutação espontânea do gene da distrofina (PRICE; KURODA; RUDNICKI, 2007).

O gene da DMD está localizado na região Xp21 do cromossomo, responsável pela expressão da proteína distrofina, e se encontra ausente ou severamente diminuída na membrana sarcoplasmática da musculatura cardíaca e esquelética, resultando em perda da estabilidade da mesma principalmente durante a contração (HETE; SHUNG, 1995; CHILDERS et al., 2001). Essas alterações ocorrem porque a proteína distrofina é responsável por manter a função e integridade das células musculares (PRICE; KURODA; RUDNICKI, 2007).

Essa doença foi originalmente descrita pelo inglês Edward Meryon em 1851. Ele descreveu a apresentação clínica da doença, começando na infância e progredindo com a fraqueza e perda da massa muscular até o final da adolescência (EMERY, 2002). No entanto, Guillaune Benjamin Amand Duchenne descreveu casos da doença em 1861 e mais detalhadamente em 1868, definindo-a como sendo a perda progressiva nos movimentos, afetando inicialmente os membros inferiores e posteriormente os superiores, com hipertrofia

progressiva dos músculos afetados, aumento intersticial do tecido conjuntivo e adiposo em estágio avançado (CAROMANO, 1999; BEENAKKER et al., 2002).

Apesar da ausência ou diminuição da distrofina estar estabelecida desde o nascimento, os sinais clínicos ocorrem depois de alguns anos de vida (THIBAUD et al., 2007). Na infância, os meninos vitimados pela doença apresentam dificuldades para correr, e na adolescência para subir escadas, indicando um estágio avançado (EMERY, 2002).

Aproximadamente 5-10% das mulheres portadoras apresentam graus de fraqueza muscular, frequentemente assimétricas, que pode ser desenvolvida na infância ou somente torna-se evidente na vida adulta, podendo haver uma progressão lenta permanecer estática (EMERY, 2002).

Em decorrência das anormalidades estruturais da membrana celular, ocorre um aumento de enzimas séricas, tais como creatino-quinase (CK), aspartato aminotransferase (ALT), entre outras (CAROMANO, 1999).

De acordo com um estudo feito em 1979 por Monckton et. al., o músculo com distrofia é capaz de ajustar o número de sarcômeros em resposta à alteração de comprimento, sugerindo que o mecanismo de regulação da síntese de proteína miofibrilar é operante na doença, ou seja, há evidências de atividade de regeneração no músculo distrófico (CAROMANO, 1999).

Os músculos distróficos demonstram variação no tamanho da fibra, necrose, invasão por macrófagos e deposição de gordura e tecido conectivo (EMERY, 2002; DALKILIC, 2003). Pacientes com DMD expressam mudanças patológicas variáveis que geralmente levam a profunda atrofia. No entanto, alguns músculos apresentam espessamento. Alguns autores sugerem que os músculos afetados inicialmente apresentam hipertrofia (aumento do número e/ou tamanho das fibras musculares), seguida de pseudohipertrofia (deposição de tecido gorduroso e conjuntivo no músculo) quando em estado crônico (KORNEGAY et al., 2003).

Os sinais clínicos resultantes da ausência da distrofina ocorrem em diversas espécies, porém em cães, ao contrário do que ocorre em gatos e ratos afetados, observa-se maior semelhança de evolução à distrofia muscular de Duchene que acometem humanos, portanto, estes cães são considerados modelos experimentais para estudos que buscam tratamentos para meninos vitimados pela doença (CHILDERS et al., 2001; COLLINS; MORGAN, 2003, SHELTON; ENGVALL, 2005). Essas semelhanças incluem severa miopatia com contraturas;

cardiomiopatia; óbito prematuro; aumento da enzima CK; degeneração, regeneração, mineralização e deficiência de distrofina nas fibras musculares. A diferença que existe entre as espécies está no fato em o cão raramente perde a habilidade de andar, consequentemente eles não perdem o equilíbrio facilmente, ao contrário dos meninos com DMD. Existe variação fenotípica nos cães com distrofia, assim como na DMD (SCHATZBERG et al., 1998).

Em 1958, Meier documentou o primeiro caso de Golden Retriever com distrofia muscular (GRMD). Nesses cães, os sinais clínicos referentes à deficiência de distrofina são progressivos, ocorrendo perda da massa muscular e desenvolvimento de contraturas, que geralmente levam a deformidades. A característica que mais se destaca nesses animais é a macroglossia, que ocorre devido à hipertrofia e pseudohipertrofia das fibras musculares (SHELTON; ENGVALL, 2005).

De acordo com Nguyen (2002), os músculos mais afetados em neonatos GRMD são diafragma, três músculos do membro distal (*semitendinosus*, *sartorius*, *tibialis cranialis*), três músculos do membro proximal (*deltoideus*, *brachialis*, *extensor carpi radialis*) e cinco músculos do tronco e pescoço (*pectoralis profundus*, *brachiocephalicus*, *sternocephalicus*, *rhomboides thoracis*, *cutaneus trunci*). Nesta pesquisa, os músculos foram divididos em categorias de graus de afetação como mostra a figura 1. Sendo que os mais severamente afetados (diafragma, músculos intercostais, língua, músculos do tronco e pescoço, e os músculos dos membros flexores) são justamente os músculos mais ativos no período neonatal, responsáveis pela respiração, sucção e rastejamento (VALENTINE; COOPER, 1991).

Figura 1- (A) Músculos severamente afetados (grau III) em neonatos GRMD. 1: língua. 2: *brachiocephalicus*. 3: *omotraversarius*. 4: *trapezius*. 5: músculos intercostais. 6: diafragma. 7: *cutaneus trunci*. 8: *rectus femoris*. 9: *sartorius*. (B) Músculos moderadamente afetados (grau II) em neonatos GRMD. 10: *deltoideus*. 11: *brachialis*. 12: *triceps brachii*. 13: *extensor carpi radialis*. 14: *rhomboides thoracis*. 15: *pectoralis profundus*. 16: *gracilis*. 17: *gastrocnemius*. 18: *tibialis cranialis*. (C) Músculos levemente afetados (grade I) em neonatos GRMD. 19: *temporalis*. 20: *sternocephalicus*. 21: *sternohyoideus*. 22: *biceps brachii*. 23: *extensor digitorum communis*. 24: *extensor digitorum lateralis*. 25: *pectineus*. 26: *biceps femoris*. 27: *semitendinosus*. (D) Músculos não afetados (grade 0) em neonatos GRMD. 28: *orbicularis oculi*. 29: *masseter*. 30: *oesophagus*. 31: *myocardium*. 32: *gluteus medius*. 33: *adductor*. 34: *semimembranosus*. 35: *quadriceps femoris except rectus femoris*. 36: *tensor fasciae latae*. 37: *peroneus longus*. 38: *extensor digitorum longus*. FONTE: NGUYEN (2002)

Os cães afetados se cansam com facilidade, desenvolvem andadura alternante anormal, caracterizada por passadas rígidas e curtas; podem ainda apresentar redução na capacidade de abrir os maxilares e dificuldade na apreensão e deglutição de alimentos devido à macroglossia e megaesôfago; podem desenvolver cifose e lordose; a maior parte da musculatura esquelética torna-se atrofica, porém, certos grupos musculares e a língua, apresentam-se com hipertrofia. Pode ocorrer a morte espontânea em neonatos distróficos dentro das duas primeiras semanas de vida, porém, esta normalmente ocorre por volta dos seis meses; se os animais sobrevivem a este período de crise, podem viver de três a cinco anos, e então, desenvolvem cardiomiopatia (ETTINGER; FELDMAN, 2000; KORNEGAY et al., 2003; TILLEY; SMITH, 2004).

Hoffman e Gorospe (1991) propuseram estabelecer fases para designar os efeitos da deficiência em distrofina em animais. A fase 1 consiste na hipertrofia, necrose e regeneração das miofibrilas. Na fase 2 ocorre a fibrose endomisial e atrofia das miofibrilas, observada aos 2 meses de idade em cães.

Lesões afetando os músculos dos membros, tronco e pescoço variam de acordo com a idade. Após 1 e 2 dias de idade, ocorre necrose aguda (NGUYEN et al., 2002).

As fêmeas portadoras tipicamente demonstram pouca evidência clínica da doença, embora os níveis de CK geralmente apresentem-se elevados. Ocasionalmente, as portadoras podem apresentar manifestações da doença como fraqueza nos membros juntamente com alterações na eletromiografia e na biopsia muscular (SHELTON et al., 2001). Os achados histopatológicos são chamados de “manifestações das portadoras” e consistem em variáveis graus de degeneração, regeneração e fibrose (SHELTON; ENGVALL, 2005).

O diagnóstico pode ser feito pela avaliação dos sinais clínicos, da análise da enzima creatino-quinase (CK) e da biopsia muscular, que detecta a deficiência da distrofina (TILLEY; SMITH, 2004). A enzima CK, encontra-se acentuadamente aumentada antes do aparecimento dos sinais clínicos, mas seu nível cai rapidamente após o desenvolvimento do processo, chegando a níveis normais na fase avançada da doença (CAROMANO, 1999).

Embora esses testes diagnósticos sejam razoavelmente efetivos, a habilidade para avaliar a eficiência de terapias utilizadas ainda é deficiente. Portanto, o ultra-som vem sendo utilizado em humanos, como técnica alternativa de monitorar a progressão da doença (HETE; SHUNG, 1995).

Ainda não há cura para a DMD, e as estratégias terapêuticas desenvolvidas envolvem fármacos para combater a inflamação crônica associada ao processo distrófico. No entanto, os benefícios são temporários e podem ser acompanhados de efeitos adversos, como ganho excessivo de peso, catarata e osteoporose (NEGRONI; BUTLER – BROWNE, 2006).

2.2 TERAPIA CELULAR

Nos últimos dez anos, o estudo das células-tronco (CT) tem sido intensamente explorado. Esse interesse está relacionado com a possibilidade dessas células oferecerem terapias celulares, pois são capazes de multiplicar-se e diferenciar-se nos mais variados tecidos do corpo humano (sangue, ossos, nervos, músculos, etc.). Sua utilização para fins terapêuticos pode representar talvez a única esperança para o tratamento de inúmeras doenças, representando uma revolução no entendimento dos mecanismos de reparo e regeneração de tecidos (SCHWINDT et al., 2005) e órgãos danificados por trauma ou por qualquer tipo de injúria, seja de natureza química, física, metabólica, infecciosa ou funcional (SOUZA; ELIAS, 2005).

Em humanos, várias tentativas terapêuticas já foram testadas na DMD, incluindo a administração de diferentes tipos de drogas (EMERY, 1993; CAMIRAND; CARON; ASSELIN, 2001) e transplante de mioblastos, sem sucesso (GUSSONI; SEGRE, 1999; CAMIRAND; CARON; ASSELIN, 2001).

Atualmente, o tratamento da DMD tem como base prevenir as complicações devido à fraqueza muscular, diminuição da mobilidade, contraturas, escolioses, defeitos cardíacos e respiratórios. Estes tratamentos consistem em: fisioterapias, hidroterapias, cirurgias para diminuição das contraturas e terapias ocupacionais.

Buscam-se então, extensivamente com futuras pesquisas, novas formas terapêuticas (STROBER, 2006).

O sangue do cordão umbilical, a medula óssea e o sangue periférico, respectivamente, são os tecidos mais ricos em CT.

As CT podem ser definidas segundo três propriedades: auto-renovação, ou seja, capacidade de originar em outra CT com características idênticas; habilidade de se diferenciar em mais de uma linhagem celular; capacidade de originar células funcionais nos tecidos derivados da mesma linhagem (SCHWINDT; BARNABE; MELLO, 2005).

Segunda a sua potencialidade, as CT podem ser classificadas em toti, pluri ou multipotentes. As totipotentes são capazes de gerar todos os tipos celulares embrionários e extra-embrionários. As pluripotentes podem originar todas as células que formam um embrião. Multipotentes são as células que originam apenas um subgrupo de linhagens celulares. Existem ainda as células oligopotentes, que são capazes de gerar células mais restritas a uma linhagem, e as unipotentes, que originam apenas um único tipo celular maduro (SCHWINDT, BARNABE; MELLO, 2005).

Podemos dividir as fontes de CT em: embrionária, fetal e adulta. As CT-embrionárias são derivadas da massa interna do blastocisto cinco dias após fertilização (em humanos). As fontes para extração das CT-adultas são: medula óssea, sangue periférico, tecido adiposo, sangue de cordão umbilical, entre outros (SCHWINDT, BARNABE; MELLO, 2005).

Estudos comprovaram que as CT são capazes de regenerar as artérias, aumentar a vascularização das artérias miocárdicas comprometidas e isquêmicas, e regenerar músculo cardíaco fibrosado (SOUZA; ELIAS, 2005).

A maioria das CT são capazes de identificar e migrar até o local lesado, deixando clara a sua capacidade de responder fatores quimiotáticos (liberados pelo tecido lesado). Há várias hipóteses quanto às funções de tais fatores na lesão: liberação de moléculas que previnem a morte celular, recrutamento de CT adjacentes do próprio tecido, interferência na inflamação provocada pelo dano tecidual, suporte de moléculas ou enzimas que suprem defeitos metabólicos (SCHWINDT; BARNABE; MELLO, 2005).

Portanto esses estudos realizados sugerem que o transplante de CT pode ser uma estratégia viável para o tratamento da distrofia muscular, bem como de outras enfermidades que dependem da entrega sistêmica de células terapêuticas para todo o corpo (GUSSONI; SEGRE, 1999).

2.3 CONSIDERAÇÕES ANATÔMICAS DO TECIDO MUSCULAR ESQUELÉTICO

A unidade celular funcional do músculo é a fibra muscular, sendo classificada como lisa ou estriada. A musculatura estriada inclui o músculo cardíaco e esquelético (HERMANSON; EVANS, 1996).

O músculo esquelético é capaz de gerar grandes forças, que podem agir por períodos longos ou curtos. Este é formado por fibras longas, cilíndricas e células multinucleadas organizadas em feixes envolvidos por tecido conjuntivo – endomísio.

Cada fibra contém miofibrilas dispostas longitudinalmente em uma matriz de sarcoplasma que está limitada por uma fina membrana, o sarcolema. Enquanto que, um grupo de fibras é envolvido pelo perimísio. A forma muscular definitiva é envolvida pelo epimísio (Figura 2), que delimita um músculo do outro, ou ocasionalmente se funde com a fascia (CLAIR; SISSON; GROSSMAN, 1986; HERMANSON; EVANS, 1996; JUNQUEIRA, 2005).

Cada fibra muscular é composta por centenas ou milhares de miofibrilas paralelas. Cada miofibrila é composta de uma sequência de sarcômeros, que possuem filamentos finos de actina e grossos de miosina. A contração muscular ocorre devido uma proteína motora presente na miosina (HERMANSON; EVANS, 1996; JUNQUEIRA, 2005).

Figura 2 - Esquema ilustrando organização do músculo estriado esquelético. À direita, o esboço de um músculo do qual foi retirado um segmento (em pontilhado) representado na figura maior à esquerda. FONTE: JUNQUEIRA; CARNEIRO (1999).

O tamanho da fibra muscular varia entre 10 e 100 *um* dependendo da função do músculo, grau de exercício, espécie, sexo (machos tendem a ter a fibra mais larga) e condição

corporal do animal, sendo capaz de hipertrofiar e atrofiar (NEWTON; NUNAMAKER, 1985; HERMANSON; EVANS, 1996).

Cerca de 75 a 92% do volume total do tecido muscular é constituído pelas fibras musculares, sendo que a matriz extracelular, tecido conjuntivo, fibras nervosas e vasos sanguíneos constituem o volume restante.

O ponto mais fixado do músculo é chamado de origem e o ponto onde há maior mobilidade, de inserção ou terminação (HERMANSON; EVANS, 1996).

Em humanos e animais, dois tipos de fibras musculares foram identificados, baseando-se nas características físico-químicas e velocidade de contração. Estas fibras estão entremeadas no músculo, no qual há o predomínio de um tipo sobre o outro, dependendo da função do músculo. O tipo 1 é conhecido como fibras vermelhas e são capazes de realizar uma leve contração e sustentação. O tipo 2 ou fibra branca realizam contração rápida (HERMANSON; EVANS, 1996).

Na presente pesquisa, avaliamos dois grupos musculares, o do pescoço e do membro pélvico.

Os músculos do pescoço são responsáveis por produzirem movimentos da cabeça e manter a postura. A posição da cabeça é crucial para a orientação visual e auditiva, alimentação e função vestibular (SHAIR; MIGRAM; SHAHAR, 2006).

O músculo *esplenius* (Figura 3) possui a forma chata e plana. É um músculo triangular que possui a parte caudal no ápice e a cranial na base do triângulo. Está localizado na porção dorsolateral do pescoço, estendendo da terceira vértebra torácica até o crânio. As fibras correm em direção crânio-ventral e cobrem o músculo *semispinalis capitis* da cabeça, longíssimo da cabeça e a parte terminal do músculo espinhal e semi-espinhal dorsal. Tem como função estender e levantar a cabeça e o pescoço e fixar a primeira vértebra torácica (HERMANSON; EVANS, 1996; TERRADO; GINER; GÓMEZ, 2005).

Figura 3 - Esquema demonstrando a localização do músculo *splenius*. FONTE: HERMANSON; EVANS, 1996

O músculo *semispinalis capitis* (Figura 4) é uma continuação dos músculos *spinais*, *semispinalis thoracis* e *cervicis*. Situa-se entre o músculo *splenius* e os componentes cervicais do músculo precedente (DYCE, 2004). Estende-se da quinta vértebra torácica e da última cervical até o occipital. É envolto pelo ligamento nucal lateral e dorsalmente (HERMANSON; EVANS, 1996). Em humanos, esse músculo contribui para a extensão cervical e rotação contralateral (REZASOLTANI; MALKIA; VINKO, 1999).

Figura 4 - Esquema demonstrando a localização do músculo *semispinalis capitis* FONTE: HERMANSON; EVANS, 1996

Em relação ao grupo muscular pélvico, avaliamos o *semitendinosus* (Figura 5). Este músculo apresenta de 2,5 a 3,5 cm de espessura em cães. Localiza-se na parte caudal da coxa,

entre a parte cranial e lateral do músculo *biceps femoris* e parte medial e cranial do músculo *semimembranosus*. Este surge na parte caudal e ventrolateral da tuberosidade isquiática entre o músculo *biceps femoris* e *semimembranosus*. A divisão do músculo *semitendinosus* entre proximal e caudal é comum entre mamíferos, sendo documentada em gatos, coelhos, cabras e roedores (HERMANSON; EVANS, 1996).

O músculo *semitendinosus* tem como função a extensão da articulação coxofemoral e tarsal, e flexão do joelho (HERMANSON; EVANS, 1996).

Figura 5 - Figura demonstrando localização do músculo *semitendinosus*. FONTE: HERMANSON ; EVANS, 1996

2.4 CONSIDERAÇÕES DO EXAME ULTRA-SONOGRAFICO MUSCULAR NA ANÁLISE DE GRMD

O ultra-som muscular começou a ser realizado, na medicina humana, em 1980, e atualmente é considerado como uma técnica útil para visualizar músculos normais e com alteração patológica (BROCKMANN et al., 2007).

Existem poucos estudos relatando a utilização da análise ultra-sonográfica das estruturas musculares mesmo sendo um método rápido, não invasivo e seguro, que pode ser repetido com frequência (NIELSEN et al. 2000). Comparada com outras modalidades de imagem, como ressonância magnética ou tomografia computadorizada, a ultra-sonografia tem baixo custo operacional.

Os estudos recentes comprovam que a ultra-sonografia é uma ferramenta importante para avaliação da espessura da musculatura esquelética e composição tecidual (NIELSEN et al., 2000), além de fornecer informações da progressão da doença ou da resposta de terapias (MAURITS et al., 2003).

Por meio deste exame é possível detectar alterações como atrofia, hipertrofia, aumento da intensidade de eco muscular e diminuição de eco emitida pelo osso. A mensuração muscular pode, de forma indireta, indicar a força, firmeza e resistência (PILLEN et al., 2003; RANKIN; STOKES, NEWHAM, 2005).

No exame ultra-sonográfico, o músculo normal apresenta-se como uma estrutura de baixa intensidade de eco, dividida por bainhas perimiosais de tecido conectivo que apresenta um discreto aumento de eco – dando então, a característica típica muscular. A gordura subcutânea que envolve o músculo apresenta um leve aumento de ecogenicidade quando comparada ao mesmo (HECKMATT; PIER; DUBOWITZ, 1988; SCHOLTEN et al., 2003). Na distrofia muscular, a intensidade do eco aumenta e a arquitetura muscular é interrompida devido às células musculares serem substituídas por tecido conectivo e gordura (ZUBERI et al., 1999; PILLEN et al., 2003; PILLEN et al., 2006).

Em crianças com DMD, a atrofia muscular é uma característica típica dos estágios avançados da doença. O aumento do tamanho do músculo ocorre devido à hipertrofia ou pseudohipertrofia, que foi observada no músculo gastrocnêmio e outros (KORNEGAY et al., 2003; MAURITS et al., 2004).

Os graus de eco muscular são susceptíveis a alteração e variação do ângulo de incidência do transdutor em relação ao músculo durante a análise, portanto a detecção visual das alterações pode ser difícil (WALKER et al., 2004; PILLEN et al., 2006).

O tecido muscular varia na espessura e intensidade por toda extensão do músculo. No músculo tibial cranial, assim como em outros, o eco mais proeminente é gerado pela aponeurose (WALKER et al., 2004).

Diferentes músculos apresentam dessemelhantes proporções de tecido fibroso, e devem, por isso, apresentar maior ou menor grau de ecogenicidade. O músculo *triceps*, por exemplo, é tipicamente mais ecogênico que o *biceps* (WALKER et al., 2004).

Heckmatt (1988) estabeleceu critérios para graduar de forma qualitativa as características das imagens dos músculos. O Grau I indica músculo normal; os graus II, III e IV indicam o aumento de ecogenicidade muscular com eco óssea normal, reduzida e ausente, respectivamente.

Outra forma de descrever qualitativamente a aparência do músculo implica em distinguir entre homogêneo e heterogêneo; envolvimento focal ou generalizado e hiper/hipoecogenicidade (MAURITS et al., 2003).

Para uma melhor análise do grau de ecogenicidade (“densidade”) do tecido muscular, atualmente, utilizam-se técnicas de aquisição das imagens do vídeo, requeridas pela ultrasonografia, salvas e posteriormente acopladas a um computador para posterior análise em programas específicos, ou seja, a *análise digital da imagem*, sendo possível desta forma quantificar estatisticamente as amostras de eco (“densidade”) dos tecidos com maior precisão. Acredita-se que esses parâmetros possam auxiliar na diferenciação entre miopatias e neuropatias (MAURITS et al., 2003; PILLEN et al., 2006; PILLEN et al., 2007).

Segundo Brockmann et al. (2007), Pillen et al. (2007), Pillen et al. (2006), a quantificação da intensidade do eco é considerada como um método mais objetivo e eficaz quando comparada com a avaliação visual dos músculos.

Estudos demonstram que a análise visual pelo ultra-sonografista apresenta 71% de sensibilidade e utilizando a análise digital aumenta para 87% (PILLEN et al., 2006).

O ultra-som pode ser usado para avaliar o potencial de terapias que induzam regeneração focal ou sistêmica do tecido muscular (WALKER et al., 2004). Portanto, o acompanhamento ultra-sonográfico da musculatura de GRMD poderá fornecer informações da progressão da doença e resposta a terapia celular contribuindo para futuras pesquisas de distrofias musculares.

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Animais

Foram utilizados cães da colônia de Golden Retriever com distrofia muscular, pertencentes ao canil de pesquisa VCI - Departamento de Cirurgia no Setor de Anatomia Animal da FMVZ-USP, coordenado pela Profa. Dra. Maria Angélica Miglino.

Os animais serão divididos em três grupos:

- Grupo 1: 1 fêmea portadora e 1 macho normal
- Grupo 2: 2 animais afetados sem tratamento
- Grupo 3: 4 animais em tratamento com transplante de células-tronco.

Iniciamos os exames com os animais a partir dos 3 meses de idade. Os animais do grupo 2 e 3 pertenciam a mesma ninhada.

3.1.2 Equipamento

Foi utilizado um aparelho de ultra-sonografia dinâmico, bidimensional – Modelo GE Logic Pro 100, com transdutor linear de frequência de 7,5 MHz. Após inúmeros testes,

decidimos utilizar ganho 98dB, para que fosse possível avaliar tanto o *semitendinosus*, quanto os músculos do pescoço (*semispinalis capitis* e *splenius*), sem que houvesse ajustes deste valor.

A documentação fotográfica dos exames foi implementada em impressoras vídeo preto e branco.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Técnica do exame ultra-sonográfico muscular

Todos os exames sonográficos foram realizados por um único observador, a interpretação das imagens foi realizada durante o exame, pela observação dinâmica das alterações (avaliação qualitativa). O observador não teve conhecimento quais animais foram tratados, ou seja, não teve conhecimento de quais animais pertenciam ao grupo 2 e 3 – sendo um estudo cego.

Avaliamos os animais por um período de 11 meses. Nos primeiros quatro meses dos exames, avaliamos os animais do grupo 2 e 3 quinzenalmente, até que completassem seis meses de idade, fase crítica da doença. Após esse período, os exames foram realizados mensalmente.

Nos animais do grupo 1 realizamos exames mensalmente.

Foram avaliados os músculos *semitendinosus*, *semispinalis capitis* e *splenius*, após tricotomia da região.

Os seguintes critérios foram utilizados para escolha dos músculos: avaliar músculos pertencentes aos grupos musculares mais afetados e facilidade da realização do exame em locais específicos.

Nos músculos *semispinalis capitis* e *splenius* realizamos cortes longitudinais de ambos os antímeros e uma medida de cada músculo por meio de calibres eletrônicos do aparelho. Durante este exame, os animais permaneceram sentados, como mostra a figura 6, e mantemos o transdutor em posição de aproximadamente 90° em relação ao músculo. No mesmo corte avaliaram-se os dois músculos.

Figura 6 - Posição do animal (sentado) e do transdutor (aproximadamente 90° em relação ao músculo) para avaliação dos músculos cervicais (*splenius* e *semispinalis capitis*)

Em relação ao músculo *semitendinosus*, realizamos cortes longitudinais e transversais, em ambos os antímeros. Medimos a porção que apresentava maior diâmetro. Para isolar e avaliar o músculo, o animal permaneceu em decúbito lateral direito e esquerdo e posicionamos o transdutor após a palpação do músculo.

Devido ao tamanho do animal, foi difícil palpar o músculo relaxado durante os primeiros meses de idade, portanto durante cinco meses de exames realizamos somente medidas do músculo contraído, como mostra figura 7. Após esse período, medidas do músculo relaxado também foram tomadas, como mostra figura 8.

Figura 7 - Posição do animal em decúbito lateral com o membro posterior estendido, e posição do transdutor para a realização do exame do músculo *semitendinosus* contraído

Figura 8 - Posição do animal em decúbito lateral e posição do transdutor para a realização do exame do músculo *semitendinosus* relaxado

Durante a contração, a espessura muscular aumenta e as estrias ecogênicas (fibras) ficam pronunciadas de forma oblíqua.

A característica de padronização das fibras musculares e intensidade do eco foram analisadas, sendo que o último foi avaliado de forma qualitativa (visual) e quantitativa (digital).

A análise da intensidade do eco, por meio de forma digital (avaliação quantitativa), foi realizada após o salvamento das imagens adquiridas do equipamento sonográfico com posteriores cálculos de escalas de cinza, utilizando o programa Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.). Para a realização dos cálculos, as imagens foram salvas no formato TIFF (“tagged image file format”) e cada músculo foi selecionado de forma que incluísse o quanto fosse possível de sua área, conforme sugere PILLEN et al. (2007). As escalas de cinza deste programa variam de 0 (preto) à 255 (branco), como mostra o exemplo da figura 9.

Figura 9 - Avaliação quantitativa da intensidade de ecogenicidade do músculo *semitendinosus*. A região de interesse foi selecionada, e pelo histograma determinamos a intensidade da ecogenicidade, como mostra a figura do antímetro direito. Preto = 0 (esquerda) e Branco = 255 (direita)

3.2.2 Protocolo de injeção de células tronco

Foram injetadas células tronco de polpa dentária imatura humana em quatro cães afetados, sendo dois machos (L3 e L7) e duas fêmeas (L4 e L6). Em L3 e L6, as células foram injetadas sistematicamente (via intravenosa –IV), utilizando a artéria femoral e em L4 e L7 foram transplantadas por via muscular (IM) no *bíceps femoralis*.

Nas fêmeas as injeções iniciaram quando completaram 1 mês de idade, e nos machos com 45 dias de idade. Para verificar o potencial de efeito de tratamento a curto e em longo prazo, as fêmeas receberam uma única injeção, enquanto que os machos receberam injeções

repetidas. Um macho (L7) recebeu três injeções por via intramuscular, enquanto que o outro (L3) recebeu nove injeções pela artéria femoral.

3.2.3 Análise Estatística

Os testes estatísticos utilizados serão não-paramétricos (flexíveis às restrições), já que o número de animais é limitado devido pertencerem a um canil experimental para estudo da distrofia muscular.

O teste não-paramétrico de Wilcoxon, também chamado de Mann-Whitney, é uma ferramenta para testar diferenças entre dois conjuntos de amostras independentes, ou seja, se a aplicação das injeções nos músculos dos animais foi estatisticamente significativa para reduzir as medidas associadas aos escores dos histogramas.

Para verificar a eficácia de um tratamento, estruturamos as amostras num teste, definimos as hipóteses e rejeitamos hipótese nula (H_0) a um nível de significância α , que para esta análise o valor estabelecido foi de 0.1 para a avaliação do músculo *semitendinosus* e 0,05 para os músculos cervicais. A (H_0) é a hipótese de que não há diferença entre duas amostras, tipos de tratamento, ou ainda a que especifica que uma amostra segue uma determinada distribuição de probabilidade. Em geral, é essa a hipótese que buscamos aceitar ou não, baseado num erro associado, o p-valor. Por conseguinte, se o valor crítico relacionado ao teste tem um p-valor associado menor do que 0,1 significa que está na região de rejeição e, portanto, rejeita-se H_0 . Se o p-valor associado ao valor crítico for maior que 0,1 ou 0,05, a decisão é aceitar H_0 , pois a estatística de teste encontra-se na região de aceitação de H_0 .

A escolha de uma das hipóteses é associada a um erro. Há dois tipos de erro: tipo I e tipo II. O erro do tipo I (α) é a probabilidade de rejeitar a hipótese nula e ela ser verdadeira, ou seja, de assumir que existem padrões não aleatórios e diferenças que na verdade não existem. O erro do tipo I também é denominado p-valor ou nível de significância, e representa a área da região de rejeição num teste de hipótese. O erro do tipo II é caracterizado pela chance de aceitar H_0 sendo que esta é falsa. Este tipo de erro é considerado mais grave, pois se assumem que não existem diferenças, padrões, tendências, quando na verdade existem, e, portanto, mais investigações deveriam ser feitas.

Em relação à mensuração dos músculos realizamos correlações entre espessura muscular X peso do animal e comparamos as medidas entre os animais. Para medirmos a correlação existente entre os pesos consideramos o método de Spearman, que mede a correlação para dados pareados. E para a comparação das medidas entre os animais, realizamos o teste Wilcoxon.

4 RESULTADOS

Os resultados serão expostos através de uma descrição qualitativa e estatística.

4.1. Correlações das Mensurações Musculares

A seguir temos um tabela que resume a correlação entre o peso do animal e a espessura de cada músculo. A medida considerada para o músculo *semitendinosus* para sua espessura foi da forma contraída e no corte longitudinal, devido termos mais dados sobre esses valores.

Tabela 1 - Correlação entre o peso de cada animal com os músculos avaliados (ED = *splenius* direito, EE = *splenius* esquerdo, SD = *semispinalis capitis* direito, SE = *semispinalis capitis* esquerdo, STD = *semitendinosus* direito, STE = *semitendinosus* esquerdo)

	MUSCULO					
	ED	EE	SD	SE	STD	STE
L2	-0.1760239	-0.2086275	0.7719418	0.7902327	0.7684258	0.7311174
L3	0.6149649	-0.3016056	0.899184	0.8859177	0.884216	0.8210577
L7	0.1256562	-0.04839056	0.6584297	0.6931432	0.901414	0.7649123
C4	0.4074074	0.8257228	0.7241051	0.5578656	0.5555556	0.2477168
L4	0.5446294	0.4967097	0.6751654	0.770417	0.6780822	0.5048281
L6	0.6035694	0.2778363	0.5672012	0.7339788	0.7902772	0.6242424
L5	0.71155	0.7198086	0.8845855	0.8199161	0.788157	0.7534247
X7	0.6668859	0.9746794	0.9746794	0.6324555	0.2	0.9

Estatisticamente consideramos que uma correlação é realmente significativa se apresenta valores maiores do que 0,8 ou menores que $-0,8$. O animal normal apresentou maior ganho de peso do que os demais animais.

Figura 10 - Diagrama de dispersão de peso (Kg) X espessura (cm) do músculo *splenius* direito para os machos L2 (afetado controle), L3 (afetado tratado via IV), L7 (afetado tratado via IM) e C4 (normal)

Em relação aos machos (Figura 10), observamos para o músculo *splenius* direito um comportamento atípico para L2 (controle afetado), no sentido de que não existe uma tendência linear de crescimento do peso juntamente com a espessura muscular (correlação negativa), pois parece haver uma tendência de aumento seguido de diminuição da espessura muscular. Temos maior correlação em L3, fato que indica que para esse animal o peso e a espessura do músculo apresentaram uma tendência linear de crescimento conjunta maior que os demais animais.

Figura 11 - Diagrama de dispersão de peso (Kg) X espessura (cm) do músculo *splenius* direito para as fêmeas L4 (afetada tratada via IM), L5 (afetada controle), L6 (afetada tratada via IV) e X7 (portadora)

Para as fêmeas em geral (Figura 11), houve um crescimento linear entre o peso e a espessura muscular. A fêmea portadora também apresentou maior ganho de peso. L5 apresentou maior correlação linear no crescimento de peso e espessura, mas isso não quer dizer que teve melhores resultados, pois não temos as duas últimas medidas para peso e espessura muscular, devido ao óbito com 9 meses.

Figura 12 - Diagrama de dispersão de peso (Kg) X espessura (cm) do músculo *splenius* esquerdo para os machos L2 (afetado controle), L3 (afetado tratado via IV), L7 (afetado tratado via IM) e C4 (normal)

Somente o animal normal apresentou correlação positiva o que significa que as medidas do peso e da espessura aumentaram linearmente. Para os demais animais observamos variações de aumento e diminuição de peso ao longo do tempo e o mesmo observado para a espessura muscular. Na figura 12, as medidas de L2 apresentaram novamente tendência de diminuição maior que as medidas dos demais animais. Para L3 temos a maior correlação negativa devido a variação de ganho e perda de peso ao longo do tempo. A espessura muscular se concentrou em valores entre 0,5 e 0,8 para esse animal.

Figura 13 - Diagrama de dispersão de peso (Kg) X espessura (cm) do músculo *splenius* esquerdo para as fêmeas L4 (afetada tratada via IM), L5 (afetada controle), L6 (afetada tratada via IV) e X7 (portadora)

Temos poucas observações para X7, para considerar sua alta correlação entre peso e espessura muscular realmente correta. Na figura 13, observamos que para L5 e L6 o aumento de peso foi menor do que de L4, talvez pelo fato de terem menos observações no final do estudo, devido ao óbito de L5 aos 9 meses e de L6 com 8 meses de idade. A medida da espessura muscular para L4 também se concentra em valores maiores no final da avaliação.

Figura 14 - Diagrama de dispersão de peso (Kg) X espessura (cm) do músculo *semispinalis capitis* direito para os machos L2 (afetado controle), L3 (afetado tratado via IV), L7 (afetado tratado via IM) e C4 (normal)

Em geral temos correlações positivas entre o peso e a espessura muscular dos machos. Para C4 há uma correlação baixa porque em geral ocorreu um ganho rápido de peso não acompanhado pelo ganho de espessura muscular que se estabilizou em valores baixos (Figura 14). Para L2 e L3 temos aumento constante da espessura e variação dos pesos nas primeiras observações em estudo.

Figura 15 - Diagrama de dispersão de peso (Kg) X espessura (cm) do músculo *semispinalis capitis* direito para as fêmeas L4 (afetada tratada via IM), L5 (afetada controle), L6 (afetada tratada via IV) e X7 (portadora)

Na figura 15, observa-se a tendência de aumento de peso juntamente com o aumento da espessura muscular com pequenas variações. As correlações foram em geral positivas. A fêmea L5 apresentou maior ganho de espessura muscular. Novamente, X7 conta com poucas informações e o fato de L4 ter mais ganho de peso de que L5 e L6 é que L4 teve mais medidas anotadas do que as anteriores no final do estudo.

Figura 16 - Diagrama de dispersão de peso (Kg) X espessura (cm) do músculo *semispinalis capitis* esquerdo para os machos L2 (afetado controle), L3 (afetado tratado via IV), L7 (afetado tratado via IM) e C4 (normal)

Para C4 as medidas da espessura do músculo parece se estabilizar entre 1,4 e 1,5 cm, e o peso sempre tende a crescer (Figura 16). L2 e L3 apresentam comportamentos similares de maneira que o ganho de peso (com variações no começo do estudo) é acompanhado pelo aumento na medida da espessura muscular, fato comprovado pela maior correlação para as medidas desses animais. Para L7 temos um declínio na medida da espessura muscular no final do estudo, influenciando na correlação das medidas.

Figura 17 - Diagrama de dispersão de peso (Kg) X espessura (cm) do músculo *semispinalis capitis* esquerdo para as fêmeas L4 (afetada tratada via IM), L5 (afetada controle), L6 (afetada tratada via IV) e X7 (portadora)

Para o músculo *semispinalis capitis* esquerdo, temos correlações positivas entre peso e espessura, e observamos maior correlação para L5. Em X7 temos poucos dados pareados e em L4 e L6 temos correlações positivas influenciadas por poucas variações principalmente em relação à medida da espessura do músculo que parece oscilar de maneira a ter uma tendência de crescimento seguida por uma diminuição (Figura 17). Para L4 temos mais informações do que para L5 e L6, entretanto, as medidas da espessura muscular variam sob um mesmo intervalo.

Figura 18 - Diagrama de dispersão de peso (Kg) X espessura (cm) do músculo *semitendinosus* direito (corte longitudinal) para os machos L2 (afetado controle), L3 (afetado tratado via IV), L7 (afetado tratado via IM) e C4 (normal)

Observamos em todos os animais, exceto C4, que as medidas de peso e espessura muscular são altamente correlacionadas. C4 apresenta além de maior ganho de peso, maior valor para espessura muscular quando comparado aos demais animais (Figura 18). Observamos para C4 um ganho de peso rápido enquanto que a espessura parece oscilar entre aumento e diminuição das medidas de espessura ao longo do tempo.

Figura 19 - Diagrama de dispersão de peso (Kg) X espessura (cm) do músculo *semitendinosus* direito (corte longitudinal) para as fêmeas L4 (afetada tratada via IM), L5 (afetada controle), L6 (afetada tratada via IV) e X7 (portadora)

Na figura 19, as medidas seguem, em geral, uma tendência de crescimento conjunta. X7 apresentou baixo valor de correlação entre os pesos e as espessuras, já que o pareamento entre o peso e a espessura causou influência no valor da correlação, pois em geral para X7 se tem um aumento ao longo do tempo do peso, mas depois de T9 apresentou diminuição da espessura muscular.

Figura 20 - Diagrama de dispersão de peso (Kg) X espessura (cm) do músculo *semitendinosus* esquerdo (corte longitudinal) para os machos L2 (afetado controle), L3 (afetado tratado via IV), L7 (afetado tratado via IM) e C4 (normal)

Em geral todos os animais tiveram aumento de peso acompanhado pelo aumento da espessura muscular com poucas variações (Figura 20), entretanto a baixa correlação para C4 se deve ao pareamento das observações.

Figura 21 - Diagrama de dispersão de peso (Kg) X espessura (cm) do músculo *semitendinosus* esquerdo (corte longitudinal) para as fêmeas L4 (afetada tratada via IM), L5 (afetada controle), L6 (afetada tratada via IV) e X7 (portadora)

Para X7 o pareamento favoreceu a observação de alta correlação, mas na realidade o que se observa é um ganho conjunto de peso e espessura muscular com queda, principalmente da medida da espessura do músculo, logo depois seguida de aumento. Para as demais fêmeas observamos uma diminuição das medidas da espessura muscular nas últimas avaliações (Figura 21).

Entretanto, por meio desta análise estatística das correlações das mensurações musculares, obtivemos poucas correlações positivas, ou seja, poucos animais apresentaram aumento da espessura muscular de acordo com o aumento do peso.

Quanto às mensurações musculares, os valores das espessuras para os músculos, de forma geral, variaram principalmente entre os seguintes valores: 0,5 – 0,6 cm para o músculo *splenius* dos machos afetados, 0,8 – 1,0 cm para o macho normal, 0,6 – 0,8 cm para as fêmeas afetadas e 0,9 cm para a portadora; 1,2 – 1,6 cm para o músculo *semispinalis capitis* dos machos afetados, 1,4 – 1,7 para o macho normal, 1,1 – 1,3 cm para as fêmeas afetadas, 1,2 – 1,8 para a portadora; 4,0 – 5,5 para o músculo *semitendinosus* dos animais afetados, 4,5 – 6,5 para a portadora e 5,5 – 6,0 para o macho normal.

4.2 Descrição Comparativa das Mensurações Musculares

Os resultados das mensurações serão expostos a seguir através de comparações entre animais afetados controle X afetado tratados e afetado controle X normal/portadora, pelo teste Wilcoxon. Para os p-valores menores que 0,05, fizemos o gráfico Box-Plot para comparar qual animal que apresenta, de forma significativa, maior ou menor mensuração muscular.

E de acordo com teste Wilcoxon, temos os seguintes p-valores para o músculo *splenius* direito:

1. C4 X L2: 0,0021
2. L2 X L3: 0,1662
3. L2 X L7: 0,1662
4. L3 X L7: 1,0000
5. X7 X L5: 0,2155
6. L5 X L4: 0,1048
7. L5 X L6: 0,6727
8. L4 X L6: 0,1287

Figura 22 - Box-Plot comparando a mensuração (em cms) do músculo *spleinius* direito entre os machos L2 (controle afetado) e C4 (normal)

Comparando as mensurações do músculo *spleinius* direito entre os machos L2 e C4 (Figura 22), temos que o animal normal possui medidas significativamente maiores que o animal afetado controle.

Para o músculo *spleinius* esquerdo de acordo com teste Wilcoxon, temos os seguintes p-valores para o músculo:

1. C4 X L2: 0,0037
2. L2 X L3: 0,5383
3. L2 X L7: 0,7196
4. L3 X L7: 0,7779
5. X7 X L5: 0,0456
6. L5 X L4: 0,5981
7. L5 X L6: 0,3258
8. L4 X L6: 0,1928

Figura 23 - Box-Plot comparando a mensuração (em cms) do músculo *splenius* esquerdo entre os machos L2 (controle afetado) e C4 (normal)

Comparando as mensurações do músculo *splenius* esquerdo entre os machos L2 e C4 (Figura 23), temos que o animal normal possui medidas significativamente maiores que o animal afetado controle.

Figura 24 - Box-Plot comparando a mensuração (em cms) do músculo *splenius* esquerdo entre as fêmeas L5 (controle afetada) e X7 (portadora)

Comparando as mensurações do músculo *splenius* esquerdo entre as fêmeas L5 e X7 (Figura 24), temos que a portadora possui medidas significativamente maiores que a afetada controle.

Para o músculo *semispinalis capitis* direito, de acordo com teste Wilcoxon, temos os seguintes p-valores para o músculo:

1. C4 X L2: 0,0113
2. L2 X L3: 0,1371
3. L2 X L7: 0,0313
4. L3 X L7: 0,6261
5. X7 X L5: 0,9342
6. L5 X L4: 0,6430
7. L5 X L6: 0,4181
8. L4 X L6: 0,5981

Figura 25 - Box-Plot comparando a mensuração (em cms) do músculo *semispinalis capitis* direito entre os machos L2 (controle afetado) e C4 (normal)

Comparando as mensurações do músculo *semispinalis capitis* direito entre os machos L2 e C4 (Figura 25), temos que o animal normal possui medidas significativamente maiores que o animal afetado controle.

Figura 26 - Box-Plot comparando a mensuração (em cms) do músculo *semispinalis capitis* direito entre os machos L2 (controle afetado) e L7 (afetado tratado via IM)

Comparando as mensurações do músculo *semispinalis capitis* direito entre os machos L2 e L7 (Figura 26), temos que o animal afetado tratado via IM possui medidas significativamente maiores que o animal afetado controle.

Para o músculo *semispinalis capitis* esquerdo, de acordo com teste Wilcoxon, temos os seguintes p-valores para o músculo:

1. C4 X L2: 0,4470
2. L2 X L3: 0,8375
3. L2 X L7: 0,3551
4. L3 X L7: 0,3841
5. X7 X L5: 0,3020
6. L5 X L4: 0,6020
7. L5 X L6: 0,9159
8. L4 X L6: 0,6869

Quanto ao músculo *semitendinosus* direito, de acordo com teste Wilcoxon, temos os seguintes p-valores para o músculo:

C4 X L2: 0,1330

L2 X L3: 0,3299

L2 X L7: 0,7389

L3 X L7: 0,3051

X7 X L5: 0,1266

L5 X L4: 0,8955

L5 X L6: 0,8880

L4 X L6: 0,9439

Quanto ao músculo *semitendinosus* esquerdo, de acordo com teste Wilcoxon, temos os seguintes p-valores para o músculo:

C4 X L2: 0,0212

L2 X L3: 0,2931

L2 X L7: 0,8777

L3 X L7: 0,4418

X7 X L5: 0,0758

L5 X L4: 0,5430

L5 X L6: 0,9159

L4 X L6: 0,7565

Figura 27 - Box-Plot comparando a mensuração (em cms) do músculo *semitendinosus* direito entre os machos L2 (controle afetado) e C4 (normal)

Comparando as mensurações do músculo *semitendinosus* direito entre os machos L2 e C4 (Figura 27), temos que o animal normal possui medidas significativamente maiores que o animal afetado controle. Se fossemos considerar o $p\text{-valor} < 0,1$, a portadora apresentaria valores significativamente maiores que as afetadas.

Agora, comparando as medidas do músculo contraído em relação ao relaxado de todos os animais do experimento, temos para o músculo *semitendinosus*, os seguintes p-valores:

1. 0,0117 para o antímero direito
2. 0,0173 para o antímero esquerdo

Podemos observar então, que há diferença significativa entre o músculo contraído e relaxado, sendo que para esse experimento, o músculo relaxado apresentou medidas inferiores quando comparado com o contraído (figura 28 e 29).

Figura 28 - Box – Plot comparando as médias das medidas (em cms) do músculo *semitendinosus* direito contraído (STDC) com o relaxado (STDR) de todos os animais do experimento

Figura 29. Box – Plot comparando as médias das medidas (em cms) do músculo *semitendinosus* esquerdo contraído (STEC) com o relaxado (STER) de todos os animais do experimento.

Pela análise comparativa das mensurações poucos animais apresentaram diferenças significativas nas espessuras dos músculos avaliados. Obtivemos evidência significativa da diferença entre as mensurações musculares entre C4 (macho normal) e L2 (afetado controle), principalmente para o músculo *splenius*.

4.3 Descrição Qualitativa dos Músculos Cervicais

Os músculos cervicais em todos os grupos de animais apresentaram, pela avaliação visual, de forma geral, uma homogeneidade nos exames, parecendo não haver diferenças significativas entre os animais. No entanto, pela avaliação quantitativa, verificamos que existem algumas diferenças.

Em relação à visibilização das fibras musculares, no macho normal (C4) foi possível identificá-las pelo ultra-som desde o primeiro exame (2 meses de idade), para a portadora (X7) e os animais afetados somente a partir do segundo exame, ou seja, quando estavam com 3 meses de idade.

A regularidade das fibras foi observada em todos os animais a partir do tempo em que puderam ser observadas.

Quanto à ecogenicidade há diferença entre os dois músculos avaliados, sendo o *splenius* mais ecogênico que o *semispinalis capitis* (Figura 30, 31, 32), sendo que somente L2 apresentou o contrario para o antímero direito (Figura 31).

Figura 30 - Imagem ultra-sonográfica ilustrando respectivamente o músculo *splenius* e *semispinalis capitis*

Figura 31 - Gráfico demonstrando a diferença entre escores dos histogramas do músculos ED (*splenius* direito) e SD (*semispinalis capitis* direito) de cada animal do experimento

Figura 32 - Gráfico demonstrando a diferença entre escores dos histogramas do músculos EE (*splenius* esquerdo) e SE (*semispinalis capitis* esquerdo) de cada animal do experimento

Figura 33 - Box-Plot dos escores dos histogramas do músculo *splenius* direito de todos os animais do experimento (L2,L3,L4,L5,L6,L7,C4,X7)

Por meio da figura 33 podemos observar que as médias dos escores dos histogramas para o músculo *splenius* direito, entre os animais afetados, são semelhantes, exceto para as fêmeas afetadas L5 e L6, que apresentaram valores aparentemente maiores que os outros animais. C4 (macho normal) e X7 (portadora) apresentam valores discretamente menores que os animais afetados.

E de acordo com teste Wilcoxon, temos os seguintes p-valores:

1. C4 X L2: 0,6911
2. L2 X L3: 0,1711
3. L2 X L7: 0,0083
4. L3 X L7: 0,6911
5. X7 X L5: 0,6547
6. L5 X L4: 0,0940
7. L5 X L6: 0,2265
8. L4 X L6: 0,0191

Para os p-valores menores que 0,05, fizemos o gráfico Box-Plot (Figura 34) para comparar qual animal que apresenta, de forma significativa, maior ou menor escores pelo histograma.

Figura 34 - Box-Plot dos escores do músculo *splenius* direito dos animais L2 e L7

O p-valor para a comparação entre L2 e L7 foi menor que 0,05, ou seja, os escores de L7 foram significativamente menores que L2

Figura 35 - Box-Plot dos escores do músculo *splenius* direito dos animais L4 e L6

O p-valor para a comparação entre L4 e L6 foi menor que 0,05, ou seja, os escores de L4 foram significativamente menores que L6, como mostra a figura 35.

Figura 36 - Box-Plot dos escores dos histogramas do músculo *splenius* esquerdo de todos os animais do experimento (L2,L3,L4,L5,L6,L7,C4,X7)

Pela figura 36 observamos, para o músculo *splenius* esquerdo, que todos os animais afetados e a portadora mantêm valores médios próximos, exceto L5 e L6 que apresentam valores relativamente maiores. C4 (macho normal) apresenta escores discretamente menores que os animais afetados e a portadora.

E de acordo com teste Wilcoxon, temos os seguintes p-valores:

1. C4 X L2: 0,3006
2. L2 X L3: 0,0001
3. L2 X L7: 0,0027
4. L3 X L7: 0,4267
5. X7 X L5: 0,4822
6. L5 X L4: 0,2786
7. L5 X L6: 0,0696

8. L4 X L6: **0,0294**

Figura 37 - Box-Plot dos escores do músculo *splenius* esquerdo dos animais L2 e L3

O p-valor para a comparação entre L2 e L3 foi menor que 0,05, ou seja, os escores de L3 foram significativamente menores que L2, como mostra a figura 37.

Figura 38 - Box-Plot dos escores do músculo *splenius* esquerdo dos animais L2 e L7

O p-valor para a comparação entre L2 e L7 foi menor que 0,05, ou seja, os escores de L7 foram significativamente menores que L2 (Figura 38).

Figura 39 - Box-Plot dos escores do músculo *splenius* esquerdo dos animais L4 e L6

O p-valor para a comparação entre L4 e L6 foi menor que 0,05, ou seja, os escores de L4 foram significativamente menores que L6 (Figura 39).

Portanto, para o músculo *splenius* temos diferença em ambos os antímeros, entre as fêmeas L6 (tratada via IV) e L4 (tratada via IM), no qual L6 apresenta maiores escores que L4; e entre L2 (afetado controle) e L7 (afetado tratado via IM), sendo que L2 apresenta maiores escores que L7. Considera-se então importante na avaliação muscular cervical somente a diferença significativa entre ambos os antímeros, pois não foram realizadas injeções via IM nesse grupo muscular.

Figura 40 - Box-Plot dos escores dos histogramas do músculo *semispinalis capitis* direito de todos os animais do experimento (L2,L3,L4,L5,L6,L7,C4,X7)

Em relação aos histogramas do músculo *semispinalis capitis* direito (figura 40) observamos discreto aumento dos escores de L3, L5 e L6 em relação aos outros animais e menores escores para o macho normal (C4) e a portadora (X7) quando comparados com os afetados.

E de acordo com teste Wilcoxon, temos os seguintes p-valores:

1. C4 X L2: 0,8946
2. L2 X L3: 0,0225
3. L2 X L7: 0,1178
4. L3 X L7: 0,3428
5. X7 X L5: 0,0350
6. L5 X L4: 0,0275
7. L5 X L6: 0,8798
8. L4 X L6: 0,0412

Figura 41 - Box-Plot dos escores do músculo *semispinalis capitis* direito dos animais L2 e L3

O p-valor para a comparação entre L2 e L3 foi menor que 0,05, ou seja, os escores de L3 foram significativamente menores que L2 (Figura 41).

Figura 42 - Box-Plot dos escores (0-100) do músculo *semispinalis capitis* direito dos animais X7 e L5

O p-valor para a comparação entre X7 e L5 foi menor que 0,05, ou seja, os escores de X7 foram significativamente menores que L5 (Figura 42).

Figura 43 - Box-Plot dos escores do músculo *semispinalis capitis* direito dos animais L4 e L5

O p-valor para a comparação entre L4 e L5 foi menor que 0,05, ou seja, os escores de L4 foram significativamente menores que L5 (Figura 43).

Figura 44 - Box-Plot dos escores do músculo *semispinalis capitis* direito dos animais L4 e L6

O p-valor para a comparação entre L4 e L6 foi menor que 0,05, ou seja, os escores de L4 foram significativamente menores que L6 (Figura 44).

Figura 45 - Box-Plot dos escores dos histogramas do músculo *semispinalis capitis* esquerdo de todos os animais do experimento (L2,L3,L4,L5,L6,L7,C4,X7)

Na figura 45 observamos, para o músculo *semispinalis capitis* esquerdo, que L5 e L6 apresentaram escores dos histogramas, maiores que os demais animais. C4 (macho normal) e X7 (portadora) apresentaram escores menores que os animais afetados.

E de acordo com teste Wilcoxon, temos os seguintes p-valores:

1. C4 X L2: 0,0031
2. L2 X L3: 0,0001
3. L2 X L7: 0,0044
4. L3 X L7: 0,8980
5. X7 X L5: 0,3379
6. L5 X L4: 0,1228
7. L5 X L6: 0,4057

L4 X L6: 0,0494

Figura 46 - Box-Plot dos escores do músculo *semispinalis capitis* esquerdo dos animais C4 e L2.

O p-valor para a comparação entre C4 e L2 foi menor que 0,05, ou seja, os escores de L2 foram significativamente menores que C4 (Figura 46).

Figura 47 - Box-Plot dos escores do músculo *semispinalis capitis* esquerdo dos animais L2 e L3

O p-valor para a comparação entre L2 e L3 foi menor que 0,05, ou seja, os escores de L3 foram significativamente menores que L2 (Figura 47).

Figura 48 - Box-Plot dos escores do músculo *semispinalis capitis* esquerdo dos animais L2 e L7

O p-valor para a comparação entre L2 e L7 foi menor que 0,05, ou seja, os escores de L7 foram significativamente menores que L2 (Figura 48).

Figura 49 - Box-Plot dos escores do músculo *semispinalis capitis* esquerdo dos animais L4 e L6

O p-valor para a comparação entre L4 e L6 foi menor que 0,05, ou seja, os escores de L4 foram significativamente menores que L6 (Figura 49).

Para o músculo *semispinalis capitis* têm-se a diferença em ambos os antímeros, entre as fêmeas L6 (tratada via IV) e L4 (tratada via IM), no qual L6 apresenta maiores escores que L4; e entre L2 (afetado controle) e L3 (afetado tratado via IV). Já L2 apresenta maiores escores que L3. Considera-se importante na avaliação muscular cervical somente a diferença significativa entre ambos os antímeros, pois não foram realizadas injeções via IM nesse grupo muscular.

Entre os afetados e não afetados, o músculo *semispinalis capitis* praticamente não apresentou diferença, assim sendo esse músculo não apresenta um grau elevado de comprometimento.

4.4 Descrição Qualitativa e Estatística Músculo *Semitendinosus*

Para este músculo, tivemos que estabelecer graus para as características musculares apresentadas através da avaliação qualitativa, já que foram observadas alterações ao longo dos exames. Os graus estabelecidos foram (figura 50):

1. Músculo com fibras definidas e hipoecogênico
2. Músculo com fibras definidas e hiperecogênico
3. Músculo com fibras pouco definidas e hipoecogênico
4. Músculo com fibras pouco definidas e pouco hiperecogênico
5. Músculo com fibras pouco definidas e moderadamente hiperecogênico
6. Músculo com ausência de definição de fibras e moderadamente hiperecogênico

Figura 50 - Avaliação visual em escalas da característica do músculo por exame ultra-sonográfico do semitendinoso direito contraído. Grau 1: fibras definidas e ecogenicidade normal; Grau 2: fibras definidas e ecogenicidade elevada; Grau 3: fibras pouco definidas e ecogenicidade normal; Grau 4: fibras pouco definidas e ecogenicidade elevada; Grau 5: fibras pouco definidas e ecogenicidade acentuadamente elevada

Os resultados do histograma e da análise qualitativa serão expostos a seguir com as comparações entre animais afetados controle X afetados tratados e afetados controle X normal/portadora.

A) O macho L2 (afetado controle) foi comparado ao macho L7 (afetado tratado), ou seja, estamos vendo se aplicação de células tronco (3 injeções) via IM, tiveram efeito quando comparada ao macho afetado controle.

Tabela 2 - Estatísticas das medidas do músculo *semitendinosus* direito de L2

Estatísticas	
1º quartil	74,21
Mediana	87,66
Média	99,68

3º quartil	108,2
Mínimo	126,1
Máximo	145,3
Desvio Padrão	24

Tabela 3 - Estatísticas das medidas do músculo *semitendinosus* direito de L7

Estatísticas	
1º quartil	78,93
Mediana	84,24
Média	96,76
3º quartil	99,68
Mínimo	108,6
Máximo	138,7
Desvio Padrão	18,9

Pelas medidas obtidas anteriormente (Tabela 1 e 2) parece haver uma diminuição dos valores (escores) relacionados ao músculo *semitendinosus* direito do animal do grupo tratado.

Figura 51 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* direito para os machos L7 e L2

No gráfico de dispersão acima (figura 51-A) observamos que os valores das medidas não seguem nenhuma tendência linear. Vemos também que no decorrer do tratamento as medidas para L7 parecem decrescer mais rapidamente do que as medidas de L2.

Concluimos também pelo Box-Plot (figura 51-B) que L7, teve diminuição de seus escores em relação a L2.

O teste Wilcoxon ($p = 0,0636$) rejeitou a hipótese de igualdade entre os escores dos animais, ou seja, para os músculos desses animais verificamos diminuição significativa dos escores de L7 quando comparada a L2, verificada estatisticamente ao nível de 10% de rejeição da hipótese de igualdade entre as medianas dos escores dos animais sob questão.

Quanto à avaliação qualitativa, a tabela 4 mostra a evolução de L2 e L7, sendo que a estabilidade das características dos cães afetados ocorrem em T7 para L2 e T6 para L7, e pelo teste Wilcoxon ($p=0,9795$), não há diferença significativa entre esses dois machos.

Tabela 4 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* direito para os machos L2 e L7

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L2	3	4	2	3	3	2	4	2	4	4	4	4	5
L7	2	4	2	4	1	4	4	4	3	3	4	4	4

Para o músculo *semitendinosus* esquerdo observamos nas tabelas 5 e 6, os seguintes resultados estatísticos dos histogramas:

Tabela 5 - Estatísticas das medidas do músculo *semitendinosus* esquerdo para o macho do grupo afetado controle (L2)

Estatísticas	
Mínimo	72,35
1º quartil	83,78
Mediana	93,01
Média	101,09
3º quartil	120,59

Máximo	150
Desvio Padrão	26,17

Tabela 6 - Estatísticas das medidas do músculo *semitendinosus* esquerdo para o macho do grupo afetado tratado (L7)

Estatísticas	
Mínimo	83
1º quartil	93,94
Mediana	106,3
Média	108,5
3º quartil	117,4
Máximo	150,4
Desvio Padrão	19,77

Figura 52 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* esquerdo para os machos do grupo afetado tratado (L7) e afetado controle (L2), respectivamente

O teste de Wilcoxon ($p=0,1910$) aceita a hipótese de igualdade entre os escores de L2 e L7, como observamos na figura 52.

Quanto à avaliação qualitativa, a tabela 7 mostra a evolução de L2 e L7, sendo que a estabilidade das características de animal afetado ocorrem em T10 para os dois animais, e pelo teste Wilcoxon ($p=0,6444$), não há diferença significativa entre esses dois machos.

Tabela 7 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* esquerdo para os machos L2 e L7

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L2	3	4	2	4	3	2	2	2	1	4	4	4	5
L7	1	4	3	2	3	4	2	3	2	4	5	4	5

B) O macho L2 (afetado controle) foi comparado ao macho L3 (afetado tratado), ou seja, estamos analisando se aplicação de células tronco via artéria femoral tiveram efeito quando comparada ao macho afetado.

Para o músculo *semitendinosus* direito, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L2 e L3 (Tabela 8 e 9):

Tabela 8 - Estatísticas das medidas do músculo *semitendinosus* direito de L2

Estatísticas	
Mínimo	74,21
1º quartil	87,66
Mediana	99,68
Média	108,2
3º quartil	126,1
Máximo	145,3
Desvio Padrão	24,03

Tabela 9 - Estatísticas das medidas do músculo *semitendinosus* direito de L3

Estatísticas	
Mínimo	78,76
1º quartil	97,04
Mediana	127,8

Figura 53 - Dispersão e Box-Plot dos escores do músculo *semitendinosus* direito para os machos L2 (afetado controle) e L3 (afetado tratado), respectivamente

Observamos menor variabilidade para L3 (Figura 53), entretanto L2 apresentou tendência de menores valores ao longo do tempo, e escore médio e mediano menores do que de L3.

Pelo teste Wilcoxon ($p= 0,8446$) não há diferença estatística entre os escores dos dois animais.

Quanto a avaliação qualitativa, a tabela 10 mostra a evolução de L2 e L3, sendo que a estabilidade das características ocorrem em T9 e pelo teste Wilcoxon ($p=0,2184$), não há diferença significativa entre esses dois machos.

Tabela 10 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* direito para os machos L2 e L3

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L2	3	4	2	3	3	2	4	2	4	4	4	4	5
L3	2	4	2	2	4	4	4	4	4	5	5	5	5

Para o músculo *semitendinosus* esquerdo, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L2 e L3 (Tabela 11 e 12):

Tabela 11 - Estatísticas das medidas do músculo *semitendinosus* esquerdo para o macho do grupo afetado controle (L2)

Estatísticas	
Minimo	72,35
1º quartil	83,78
Mediana	93,01
Média	101,09
3º quartil	120,59
Máximo	150
Desvio Padrão	26,17

Tabela 12 - Estatísticas das medidas do músculo *semitendinosus* esquerdo para o macho do grupo afetado tratado (L3)

Estatísticas	
Minimo	84,97
1º quartil	108,1
Mediana	118,3
Média	115,5
3º quartil	124,3
Máximo	144,5
Desvio Padrão	17,67

Figura 54 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* esquerdo para os machos L2 (afetado controle) e L3 (afetado tratado), respectivamente

Pelos resultados da Dispersão e Box-Plot da figura 54, concluímos que o L2 (afetado controle) apresentou escores melhores do que os observados para o L3 (afetado tratado), e ainda, o teste Wilcoxon ($p=0,008204$) demonstrou que essa diferença é significativa.

Quanto a avaliação qualitativa, a tabela 13 mostra a evolução de L2 e L3, sendo que a estabilidade das características dos cães afetados ocorrem em T10 para L2 e T6 para L3. O teste Wilcoxon ($p=0,0293$), demonstra diferença significativa entre esses dois machos, sendo que L2 apresenta valores menores que L3, e isso corrobora os resultados do histograma e também com a diferença de tempo em pode ser observada a estabilidade entre esses 2 cães.

Tabela 13 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* esquerdo para os machos L2 e L3

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L2	3	4	2	4	3	2	2	2	1	4	4	4	5
L3	3	4	4	2	2	4	5	4	4	5	5	5	5

C) O macho L2 (afetado controle) foi comparado ao macho C4 (normal), ou seja, estamos comparando a diferença de escore entre um animal normal e afetado.

Para o músculo *semitendinosus* direito, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L2 e C4 (Tabela 14 e 15):

Tabela 14 - Estatísticas das medidas do músculo *semitendinosus* direito de L2

Estatísticas	
Mínimo	68,51
1º quartil	82,32
Mediana	88,73
Média	96,15
3º quartil	101
Máximo	145,9
Desvio Padrão	24,58

Tabela 15 - Estatísticas das medidas do músculo *semitendinosus* direito de C4

Estatísticas	
Mínimo	92.22
1º quartil	97.57
Mediana	101.20
Média	103.30
3º quartil	110.50
Máximo	116.70
Desvio Padrão	8,65

Figura 55 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* direito para os machos C4 e L2

No diagrama de dispersão e o Box- Plot da figura 55, observamos menor dispersão (variabilidade) para C4 quando comparado com L2.

Pelo teste Wilcoxon ($p=0,948$), não há diferença estatísticas entre os escores dos dois animais. Este resultado foi influenciado pelo fato de que para C4 temos informações faltantes, já que temos medidas mensais para esse animal e para os que sofreram tratamento temos as 8 primeiras medidas quinzenais e as restantes mensais. Entretanto vale ressaltar a regularidade dos escores de C4 contra a variação exagerada nos escores de L2, sendo que este apresentou uma tendência de crescimento apresentando escores maiores do que de C4.

Quanto a avaliação qualitativa, a tabela 16 mostra a evolução de L2 e C4, sendo que a estabilidade das características do cão afetado ocorreu em T9 para T2 e para o cão normal, a estabilidade ocorre em T5, porém não temos dados de T3 e T4. O teste Wilcoxon ($p=0,0637$), demonstra diferença significativa entre esses dois machos, sendo que C4 apresenta valores menores que L2.

Tabela 16 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* direito para os machos L2 e C4

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L2	3	4	2	3	3	2	4	2	4	4	4	4	5
C4	3	4	-	-	2	-	1	1	2	-	1	2	2

Para o músculo *semitendinosus* esquerdo, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L2 e L3 (Tabela 17 e 18):

Tabela 17 - Estatísticas das medidas do músculo *semitendinosus* esquerdo para o macho do grupo afetado controle (L2)

Estatísticas	
Mínimo	72,35
1º quartil	83,78
Mediana	93,01
Média	101,09
3º quartil	120,59
Máximo	150

Desvio Padrão	26,17
---------------	-------

Tabela 18 - Estatísticas das medidas do músculo *semitendinosus* esquerdo para o macho normal (C4)

Estatísticas	
Mínimo	99,83
1º quartil	109,3
Mediana	112,9
Média	116,5
3º quartil	117,9
Máximo	142,2
Desvio Padrão	12,96

Figura 56. Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* esquerdo para os machos C4 (normal), L2 (afetado não tratado), respectivamente

Pelo teste Wilcoxon ($p=0,0305$) há diferença significativa entre os escores de L2 e C4 (Figura 56).

Quanto à avaliação qualitativa, a tabela 19 mostra a evolução de L2 e C4, sendo que a estabilidade das características do cão afetado ocorreu em T10 para o cão normal, a estabilidade ocorre em T5, porém não temos dados de T3 e T4. O teste Wilcoxon ($p=0,1120$), demonstra que não há diferença significativa entre esses dois machos.

Tabela 19 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* esquerdo para os machos L2 e C4

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L2	3	4	2	4	3	2	2	2	1	4	4	4	5
C4	3	4	-	-	2	-	2	2	2	-	2	2	2

D) O macho L3 (afetado tratado por via IV) foi comparado ao macho L7 (afetado tratado por via IM), ou seja, estamos comparando a diferença de escores entre animais que foram submetidos a diferentes protocolos de injeção.

Para o músculo *semitendinosus* direito, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L3 e L7 (Tabela 20 e 21):

Tabela 20 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* direito para o macho L3

Estatísticas	
Mínimo	78,76
1º quartil	97,04
Mediana	127,8
Média	119,1
3º quartil	134
Máximo	140,6
Desvio Padrão	20,92

Tabela 21 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* direito para o macho L7

Estatísticas	
Mínimo	78,93
1º quartil	84,24
Mediana	96,76
Média	99,68
3º quartil	108,6
Máximo	138,7

Figura 57 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* direito para os machos L7 e L3

Comparando as estatísticas descritivas anteriormente (Figura 57), percebemos uma tendência de melhora dos resultados pela aplicação de injeções via intramuscular quando comparada a aplicação de injeções via artéria femoral.

Pelo teste de Wilcoxon ($p=0,2869$), não há diferença significativa entre os cães.

Quanto a avaliação qualitativa, a tabela 22 mostra a evolução de L3 e L7, sendo que a estabilidade das características de cão afetado ocorre em T5 para L3 e T11 para L7. O teste Wilcoxon ($p=0,1585$), demonstra que não há diferença significativa entre esses dois machos.

Tabela 22 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* direito para os machos L3 e L7

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L3	2	4	2	2	4	4	4	4	4	5	5	5	5
L7	2	4	2	4	1	4	4	4	3	3	4	4	4

Para o músculo *semitendinosus* esquerdo, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L3 e L7 (Tabela 23 e 24):

Tabela 23 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* esquerdo para o macho L3

Estatísticas	
Mínimo	84,97
1º quartil	108,1
Mediana	118,3
Média	115,5
3º quartil	124,3
Máximo	144,5
Desvio Padrão	17,67

Tabela 24 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* esquerdo para o macho L7

Estatísticas	
Mínimo	83
1º quartil	93,94
Mediana	106,3
Média	108,5
3º quartil	117,4
Máximo	150,4
Desvio Padrão	19,77

Figura 58 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* esquerdo para os machos L7 e L3

Embora a diferença agora seja sutil, os escores L7 apresentam menores escores do que L3 (Figura 58). Entretanto, o teste Wilcoxon ($p=0,1879$) não foi significativo, ou seja, não houve evidências de melhora para o antímero esquerdo com a aplicação do tratamento via IM quando comparado a aplicação do tratamento via IV.

Quanto a avaliação qualitativa, a tabela 25 mostra a evolução de L7 e L3, sendo que a estabilidade das características de cão afetado ocorrem em T10 para L7 e T6 para L3. O teste Wilcoxon ($p=0,1119$), demonstra que não há diferença significativa entre esses dois machos.

Tabela 25 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* esquerdo para os machos L3 e L7

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L3	3	4	4	2	2	4	5	4	4	5	5	5	5
L7	1	4	3	2	3	4	2	3	2	4	5	4	5

E) A fêmea L5 (afetada controle) foi comparado a fêmea L6 (afetada tratada), ou seja, estamos verificando a diferença entre escores de fêmea afetada com a submetida a tratamento via IV.

Para o músculo *semitendinosus* direito, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L5 e L6 (Tabela 26 e 27):

Tabela 26 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* direito para a fêmea L5

Estatísticas	
Mínimo	68,27
1º quartil	92,78
Mediana	106,4
Média	108,7
3º quartil	121,9
Máximo	171,4
Desvio Padrão	27,76

Tabela 27 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* direito para a fêmea L6

Estatísticas	
Mínimo	72,3
1º quartil	80,64
Mediana	89,37
Média	101,6
3º quartil	124,7
Máximo	145,4
Desvio Padrão	28,42

Figura 59 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* direito para as fêmeas L5 e L6

Para fêmea L6 percebemos ligeira melhora dos resultados quando comparada a fêmea L5 (Figura 59), entretanto, verificamos maior variabilidade para o animal sobre tratamento.

Pelo teste Wilcoxon ($p=0,2131$) não houve diferença estatística entre os escores de L5 e L6.

Quanto a avaliação qualitativa, a tabela 28 mostra a evolução de L5 e L6, sendo que a estabilidade das características de afetadas ocorreu somente em L6, desde T1. O teste Wilcoxon ($p=0,0494$), demonstra que há diferença significativa entre as fêmeas.

Tabela 28 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* direito para as fêmeas L5 e L6

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L5	3	5	4	2	2	2	2	2	2	3	4	5	-
L6	4	4	4	4	4	4	4	4	3	4	3	-	-

Para o músculo *semitendinosus* esquerdo, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L5 e L6 (Tabela 29 e 30):

Tabela 29 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* esquerdo para a fêmea L5

Estatísticas	
Mínimo	72,07
1º quartil	94,48
Mediana	107,3
Média	115
3º quartil	134,7
Máximo	166,2
Desvio Padrão	31,97

Tabela 30 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* esquerdo para a fêmea L6

Estatísticas	
--------------	--

Mínimo	88,81
1º quartil	99,32
Mediana	105,1
Média	117,2
3º quartil	115,2
Máximo	177,8
Desvio Padrão	30,46

Figura 60 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* esquerdo para as fêmeas L5 e L6

Na comparação acima (Figura 60) parece não haver melhora nos resultados do animal que recebeu tratamento (L6), quando comparada a fêmea afetada controle (L5), embora os escores da fêmea sob tratamento se comportaram de maneira mais homogênea (menor dispersão).

O teste Wilcoxon ($p=0,673$) revela também que não diferença entre os escores de L5 e L6.

Quanto a avaliação qualitativa, a tabela 31 mostra a evolução de L5 e L6, sendo que a estabilidade das características das afetadas ocorrem somente para L6, praticamente desde o T1. O teste Wilcoxon ($p=0,1124$), demonstra que não há diferença significativa entre as fêmeas.

Tabela 31 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* esquerdo para as fêmeas L5 e L6

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L5	3	5	4	4	2	2	2	4	3	3	5	-	-
L6	4	4	2	4	4	4	4	5	4	4	-	-	-

F) A fêmea L5 (afetada controle) foi comparado a fêmea L4 (afetada tratada), ou seja, estamos verificando a diferença entre escores da fêmea afetada controle com a submetida a tratamento via IM.

Para o músculo *semitendinosus* direito, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L5 e L4 (Tabela 32 e 33):

Tabela 32 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* direito para a fêmea L5

Estatísticas	
Mínimo	68,27
1º quartil	92,78
Mediana	106,4
Média	108,7
3º quartil	121,9
Máximo	171,4
Desvio Padrão	27,76

Tabela 33 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* direito para a fêmea L4

Estatísticas	
Mínimo	66,48
1º quartil	101,2
Mediana	109,2

Média	113,8
3º quartil	131,8
Máximo	154,2
Desvio Padrão	23,24

Figura 61 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* direito para as fêmeas L5 e L4

Comparando a fêmea afetada que não sofreu tratamento (L5) com a fêmea tratada via IM (L4), parece que não houve melhora significativa do tratamento, já que pelos gráficos acima observamos uma leve alta no escore de L4 quando comparada a L5 (Figura 61).

O Teste Wilcoxon ($p=0,8041$) confirma que não houve diferença de escore entre essas fêmeas.

Quanto a avaliação qualitativa, a tabela 34 mostra a evolução de L5 e L4, sendo que a estabilidade das características de afetadas ocorreu somente em L4, desde T10. O teste Wilcoxon ($p=0,5767$), demonstra que não há diferença significativa entre as fêmeas.

Tabela 34 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* direito para as fêmeas L5 e L4

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L5	3	5	4	2	2	2	2	2	3	4	5	-	-
L4	6	3	4	2	2	2	4	4	2	4	5	4	4

Para o músculo *semitendinosus* esquerdo, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L5 e L4 (Tabela 35 e 36):

Tabela 35 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* esquerdo para a fêmea L5

Estatísticas	
Mínimo	72,07
1º quartil	94,48
Mediana	107,3
Média	115
3º quartil	134,7
Máximo	166,2
Desvio Padrão	31,97

Tabela 36 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* esquerdo para a fêmea L4

Estatísticas	
Mínimo	75
1º quartil	95,57
Mediana	99,66
Média	103,4
3º quartil	107,2
Máximo	146,9
Desvio Padrão	19,19

Figura 62 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* esquerdo para as fêmeas L5 e L4

Pela figura 62, observamos que parece haver uma pequena diminuição dos escores de L4.

Entretanto, estatisticamente isso não foi observado, pelo teste Wilcoxon ($p=0,1804$), já que não houve indícios de diferença significativa entre as medianas dos escores dos animais L5 e L4.

Quanto a avaliação qualitativa, a tabela 37 mostra a evolução de L5 e L4, sendo que a estabilidade das características de cão afetado ocorrem somente para L4, a partir de T11. O teste Wilcoxon ($p=0,5767$), demonstra que não há diferença significativa entre as fêmeas.

Tabela 37 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* esquerdo para as fêmeas L5 e L4

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L5	3	5	4	4	2	2	2	4	3	3	5	-	-
L4	4	4	3	2	2	3	4	2	2	3	5	4	4

G) A fêmea L5 (afetada controle) foi comparado a fêmea X7 (portadora), ou seja, estamos verificando a diferença entre escores da fêmea afetada controle com a portadora.

Para o músculo *semitendinosus* direito, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L5 e X7 (Tabela 38 e 39):

Tabela 38 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* direito para a fêmea L5

Estatísticas	
Mínimo	68,27
1º quartil	92,78
Mediana	106,4
Média	108,7
3º quartil	121,9
Máximo	171,4
Desvio Padrão	27,76

Tabela 39 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* direito para a fêmea X7

Estatísticas	
Mínimo	96,42
1º quartil	112,9
Mediana	118,3
Média	122,3
3º quartil	134,8
Máximo	144,8
Desvio Padrão	16,08

Figura 63 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* direito para as fêmeas L5 e X7.

Percebe-se que a fêmea portadora passa a apresentar tendência de crescimento dos escores, e a fêmea afetada controle passa a ter escores relativamente baixos quando comparadas (Figura 63).

Pelo teste Wilcoxon ($p=0,09518$), a portadora apresentou escores maiores que L5.

Quanto a avaliação qualitativa, a tabela 40 mostra a evolução de L5 e X7, sendo que a estabilidade das características ocorreu somente em X7, desde T3, porém em T11 apresentou alteração. O teste Wilcoxon ($p=0,4799$), demonstra que não há diferença significativa entre as fêmeas.

Tabela 40 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* direito para as fêmeas L5 e X7

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L5	3	5	4	2	2	2	2	2	3	4	5	-	-
X7	4	-	2	-	-	2	2	2	2	-	4	2	2

Para o músculo *semitendinosus* esquerdo, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L5 e X7 (Tabela 41 e 42):

Tabela 41 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* esquerdo para a fêmea L5

Estatísticas	
Mínimo	72,07
1º quartil	94,48
Mediana	107,3
Média	115
3º quartil	134,7
Máximo	166,2
Desvio Padrão	31,97

Tabela 42 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* esquerdo para a fêmea X7

Estatísticas	
Mínimo	79,35
1º quartil	107,8
Mediana	111,8
Média	114,6
3º quartil	116,6
Máximo	161,1
Desvio Padrão	22,28

Figura 64 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* esquerdo para as fêmeas L5 e X7

Percebe-se que a fêmea portadora passa apresentar tendência de crescimento dos escores, e a fêmea controle afetada passa a ter escores relativamente baixos quando comparadas (Figura 64).

Pelo teste Wilcoxon ($p=0,7103$), observamos que não há diferença significativa entre os escores da fêmea portadora e da fêmea afetada controle.

Quanto à avaliação qualitativa, a tabela 43 mostra a evolução de L5 e X7, sendo que a estabilidade das características ocorre somente para X7. O teste Wilcoxon ($p=0,0527$), demonstra que L5 apresenta valores significantemente maiores que X7.

Tabela 43 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* esquerdo para as fêmeas L5 e X7

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L5	3	5	4	4	2	2	2	4	3	3	5	-	-
X7	4	-	2	-	-	2	2	2	1	-	2	2	4

H) A fêmea L4 (afetada tratada via IM) foi comparado a fêmea L6 (afetada tratada via IV), ou seja, estamos verificando a diferença entre escores de fêmeas submetidas a diferentes protocolos de tratamento.

Para o músculo *semitendinosus* direito, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L4 e L6 (Tabela 44 e 45):

Tabela 44 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* direito para a fêmea L4

Estatísticas	
Minimo	66,48
1º quartil	101,2
Mediana	109,2
Média	113,8
3º quartil	131,8
Máximo	154,2

Desvio Padrão	23,24
---------------	-------

Tabela 45 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* direito para a fêmea L6

Estatísticas	
Mínimo	72,3
1º quartil	80,64
Mediana	89,37
Média	101,6
3º quartil	124,7
Máximo	145,4
Desvio Padrão	28,42

Figura 65 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* direito para as fêmeas L4 e L6

Visualmente parece que o tratamento sobre L6, a aplicação de células tronco via arterial, parece ter apresentado melhores resultados do que o tratamento de aplicação de células tronco via intramuscular, no músculo semitendinoso direito (Figura 65).

Pelo teste Wilcoxon ($p=0,08303$), percebe-se que houve diferença significativa, ou seja, L6 apresentou menores escores medianos quando comparada a L4.

Quanto à avaliação qualitativa, a tabela mostra a evolução de L4 e L6, sendo que a estabilidade das características de afetadas ocorreu somente em L6, desde praticamente T1. O teste Wilcoxon ($p=0,4813$), demonstra que não há diferença significativa entre as fêmeas.

Tabela 46 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* direito para as fêmeas L4 e L6

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L4	6	3	4	2	2	2	4	4	2	4	5	4	4
L6	4	4	4	4	4	4	4	3	4	3	-	-	-

Para o músculo *semitendinosus* esquerdo, observamos os seguintes valores estatísticos dos histogramas de L4 e L6 (Tabela 47 e 48):

Tabela 47 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* esquerdo para a fêmea L4

Estatísticas	
Mínimo	75
1º quartil	95,57
Mediana	99,66
Média	103,4
3º quartil	107,2
Máximo	146,9
Desvio Padrão	19,19

Tabela 48 - Estatísticas do músculo *semitendinosus* esquerdo para a fêmea L6

Estatísticas	
Mínimo	88,81
1º quartil	99,32
Mediana	105,1
Média	117,2
3º quartil	115,2
Máximo	177,8

Desvio Padrão 30,46

Figura 66 - Dispersão (A) e Box-Plot (B) dos escores do músculo *semitendinosus* esquerdo para as fêmeas L4 e L6

Visualmente (Figura 66) temos que a eficiência de L4 (via intramuscular antímero esquerdo) foi um pouco superior a L6 (via arterial antímero esquerdo), entretanto aplicando um teste de Wilcoxon ($p=0,1158$) para comparação de medianas, temos que não houve diferença estatística a um nível de 5% de significância entre os tratamentos.

Quanto à avaliação qualitativa, a tabela 49 mostra a evolução de L4 e L6, sendo que a estabilidade das características afetada ocorre somente a partir de T11 para L4, e a partir de T4 para L6. O teste Wilcoxon ($p=0,233$), demonstra que há diferença significativa entre as fêmeas.

Tabela 49 - Valores referentes à classificação em graus da característica do músculo *semitendinosus* esquerdo para as fêmeas L4 e L6

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13
L4	4	4	3	2	2	3	4	2	2	3	5	4	4
L6	4	4	2	4	4	4	4	5	4	4	-	-	-

Em relação à avaliação do músculo *semitendinosus*, pela avaliação visual ficou claro, para o realizador do exame ultra-sonográfico, que animal L3 (afetado tratado via IV) apresentou aumento de ecogenicidade evidente e alteração de ecotextura importante, sendo

confirmado pela avaliação digital, quando comparado com L2 (afetado controle). No entanto, entre os outros animais afetados, essas alterações não foram manifestadas claramente pela avaliação visual, sendo necessária à utilização do método digital, como nos casos da comparação entre L2 e L7 e L4 e L6 para o antímero direito, no qual L2 (afetado controle) apresenta maiores escores que L7 (afetado tratado via IM) e L6 (afetada tratada IV) apresentam maiores escores que L4 (afetada tratada via IM), porém na avaliação visual esse aumento de ecogenicidade não foi discriminado.

Devido ao tratamento IM se dar no grupo muscular pélvico, deu-se uma maior importância nas alterações ocorridas em um único antímero.

Na análise visual dos animais C4 (macho normal) e X7 (portadora), têm-se como característica muscular predominante de fibras definidas e quanto a ecogenicidade, em determinados tempos, estes animais apresentaram aumento, contudo na fêmea com maior frequência, compatibilizando com a descrição de “manifestação das portadoras” da classe médica. E pela análise digital, tivemos resultados ambíguos, pois C4 (macho normal) não apresentou escores menores que L2 (afetado controle) e X7 (portadora) no antímero direito apresentou escores maiores que L5 (afetada controle) e no esquerdo não houve diferença significativa. Deste modo, devemos ressaltar que as duas análises são complementares, mesmo que na análise quantitativa não haja diferença, precisamos levar em consideração as características visibilizadas pela análise qualitativa, assim como quando não for possível estabelecer se a ecogenicidade realmente está alterada, devemos recorrer a análise quantitativa.

As alterações acima descritas são discutidas posteriormente, mesmo assim, devemos ressaltar que durante o exame ultra-sonográfico a angulação do transdutor é um dos fatores que implicam no grau de variação da ecogenicidade apresentada.

5 DISCUSSÃO

A distrofia muscular mais comum em humanos está associada à deficiência de distrofina, conhecida como Distrofia Muscular de Duchenne. De caráter recessivo, ligada ao cromossomo X, é caracterizada por uma degeneração progressiva e irreversível da musculatura esquelética, devido à ausência de distrofina na superfície da membrana da célula muscular (CAROMANO, 1999; EMERY, 2002;). Pode se manifestar também através de mutação espontânea do gene da distrofina (PRICE; KURODA; RUDNICKI, 2007).

Os sinais clínicos resultantes da ausência da distrofina ocorrem em diversas espécies, porém em cães, observa-se maior semelhança de evolução à Distrofia Muscular de Duchenne que acometem humanos, portanto, estes cães são considerados modelos experimentais para estudos que buscam tratamentos para meninos vitimados pela doença (CHILDERS et al., 2002; COLLINS; MORGAN, 2003, SHELTON; ENGVALL, 2005). Essas semelhanças incluem severa miopatia com contraturas; cardiomiopatia; óbito prematuro; aumento da enzima CK; degeneração, regeneração, mineralização e deficiência de distrofina nas fibras musculares. Existe variação fenotípica nos cães com distrofia, assim como na DMD (SCHATZBERG et al., 1998).

O diagnóstico pode ser feito pela avaliação dos sinais clínicos, da análise da enzima creatino-quinase (CK) e da biopsia muscular, que detecta a deficiência da distrofina (TILLEY; SMITH, 2004).

Acredita-se assim como em humanos que o ultra-som é utilizado como ferramenta de alta especificidade e sensibilidade para avaliação de doenças neuromusculares. Além de a técnica ser caracterizada por um método rápido, não invasivo, e quando comparada com outras técnicas de imagem, como Ressonância Magnética e Tomografia Computadorizada, é considerada de baixo custo operacional, sendo, portanto aceita facilmente (ZUBERI et al. 1999; MAURITS et al. 2003).

Como reportado na literatura, verificou-se que a habilidade para avaliar a eficiência de terapias utilizadas ainda é deficiente. Portanto, o ultra-som vem sendo utilizado em humanos, como técnica alternativa de monitorar a progressão da doença (HETE; SHUNG, 1995). Porém existem poucos estudos relatando a utilização da análise ultra-sonográfica das estruturas musculares (NIELSEN et. al., 2000).

Apesar do mencionado, em relação à perspectiva do uso da ultra-sonorografia muscular, em cães verificou-se alguma dificuldade quanto à técnica ultra-sonográfica, provavelmente devido ao tamanho do músculo principalmente em animais muito jovens, uma maior dificuldade do posicionamento do transdutor, sendo que esse fator pode interferir na avaliação exata da ecotextura e ecogenicidade muscular, bem como, na análise de mensuração.

Devido ao baixo número de animais afetados por esta doença e pelos óbitos ocorridos durante o experimento, devemos considerar que existam variações individuais afetando as conclusões deste estudo. Vainzof e Zatz (2003) já relataram que indivíduos humanos com distrofias musculares apresentam variabilidade clínica inter e intrafamiliar. E de acordo com Oliveira (2004), os músculos (e também o indivíduo) têm propriedades genéticas e disponibilidade metabólica que conferem as variações anatômicas.

Sendo assim, para melhor organização da discussão dos resultados, iremos dividir em duas seções: avaliação das correlações das mensurações musculares e avaliação quantitativa e qualitativa muscular da ecogenicidade. No entanto, iremos discutir a utilização de CT somente na última avaliação citada, pois é através desta que podemos observar alterações da arquitetura muscular, podendo trazer informações quanto ao tratamento.

5.1 Avaliação das Correlações das Mensurações Musculares

Não existem relatos na literatura sobre a mensuração dos músculos cervicais em cães, portanto iremos utilizar como base de comparação as medidas do animal normal para os machos e da portadora para as fêmeas.

Verificou-se realmente que pelo ultra-som é possível detectar alterações como atrofia, hipertrofia. A mensuração muscular pode, de forma indireta, indicar a força, firmeza e resistência (PILLEN et al. 2003; RANKIN; STOKES; NEWHAM, 2005).

De acordo com os resultados obtidos, quanto ao músculo *splenius* tanto antímero direito e esquerdo, o macho normal (C4) apresentou medidas significativamente maiores que o macho afetado controle, sendo que, dos 9 aos 11 meses de idade, as medidas estabilizaram em aproximadamente em 0,9 cm (podendo chegar à 1,1cm) e 0,6 cm, respectivamente. A diferença entre as mensurações do macho normal e afetado é esperada, já que os animais

afetados não crescem como o animal normal e nem chegam a pesos semelhantes devido à condição corporal dos afetados, como consequência da progressão da doença, caracterizada pela perda da massa muscular e dificuldade na apreensão e deglutição de alimentos devido à macroglossia e megaesôfago (KORNEGAY et al., 2003; SHELTON; ENGVALL, 2005). Temos que considerar também que o tamanho da fibra muscular varia de acordo com o grau de exercício (NEWTON; NUNAMAKER, 1985; HERMANSON; EVANS, 1996). Verificamos que o macho normal pesou até 34 Kgs, enquanto que os afetados ficaram em torno de 16 -18 Kgs.

Para o mesmo músculo relatado acima, a portadora apresentou valores significativamente maiores que as fêmeas afetadas somente no antímero esquerdo, no entanto, os valores das medidas dos 9 aos 11 meses de idade, estabilizaram em aproximadamente 0,9 cm (podendo chegar à 1,1 cm) para a portadora e 0,7-0,8 cm para as afetadas. A portadora apresentou medidas semelhantes ao macho normal e as fêmeas afetadas apresentaram valores discretamente maiores quando comparadas aos machos afetados e isso se deve a melhor condição corporal apresentada pelas fêmeas deste canil, principalmente L4 que chegou a pesar até 20 kgs, porém não existem artigos relatando se realmente a enfermidade apresenta-se de uma forma mais branda em fêmeas caninas ou mesmo em mulheres. Raros são os casos descritos em mulheres devido a provável ocorrência de mutação genética. Já, nas cadelas, além da provável mutação, os resultados de cruzamento (inseminação artificial) podem ter sido a causa dessa discrepância, já que o macho era afetado e a fêmea somente portadora, forma essa utilizada em canis experimentais, semelhante ao caso deste estudo.

O fato da portadora não apresentar diferença significativa das medidas em relação às fêmeas afetadas no antímero direito, pode ser explicado pela fêmea afetada apresentar maiores valores para esse antímero, por variação anatômica, erro estatístico tipo II, erro na mensuração ou manifestação de alteração de portadora. A literatura menciona que aproximadamente 5-10% das mulheres portadoras apresentam graus de fraqueza muscular, frequentemente assimétricas, que pode ser desenvolvida na infância ou somente torna-se evidente na vida adulta, podendo haver uma progressão lenta e permanecer estática (EMERY, 2002). Acredita-se na hipótese da manifestação das portadoras, já que esta portadora apresentou altos índices da enzima CK de acordo com a veterinária responsável pelas análises clínicas do canil GRMD – Brasil.

O erro na mensuração muitas vezes pode estar relacionado ao comportamento do animal, induzindo a angulação do transdutor de forma errônea, principalmente do macho normal e da portadora, que possuem maior força muscular e não estão familiarizados com situações experimentais. Esses fatores que contribuem para angulação do transdutor não são reportados por outros autores pelos seguintes fatores: em humanos não é necessário realizar contenção física, proporcionando possivelmente ao examinador maior firmeza na angulação.

Quando comparamos com a literatura veterinária, verifica-se que na ultra-sonografia muscular têm-se somente a descrição de algumas características de seromas, hematomas ou abscessos intramusculares (NYLAND; MATTON, 2002), completamente diferente do delineamento desse experimento, no qual as mensurações e perfeitas análises dos músculos eram importantíssimas para perfeita compilação dos dados. Isso nos faz refletir que realmente talvez ressonância nuclear magnética, seja a melhor forma de análise dos músculos de cães, assim como indicado por outros pesquisadores.

Em relação ao músculo *semispinalis capitis*, observamos para o antímero direito valores significativamente maiores para C4 em relação aos afetados e, entre os afetados, L7 apresentou medidas significativamente maiores que L2. Porém para o antímero esquerdo não houve diferença significativa entre todos os animais do estudo. Como não ocorreu nenhuma diferença para o antímero esquerdo, sugerimos a esses valores significativamente maiores de C4 e L7 como variação anatômica, erro estatístico tipo II ou mesmo erro na mensuração.

Para o músculo *semitendinosus* contraído constatamos que, para todos os animais, não há diferença significativa para o antímero direito. Porém do antímero esquerdo, C4 apresenta valores maiores e, X7, considerando $p\text{-valor} < 0,1$, também apresenta valores significativamente maiores que as afetadas. A falta de significância para o antímero direito pode ser como consequência do aumento do tamanho do músculo dos cães afetados devido à hipertrofia ou pseudohipertrofia (KORNEGAY et al., 2003) que ocorre principalmente em membros pélvicos dos animais afetados, não necessariamente ocorrendo de forma simétrica, como pode ser observado nos animais do Canil GRMD – Brasil.

A pseudohipertrofia foi observada no músculo *gastrocnemio* e outros (KORNEGAY et al. 2003; MAURITIS et al. 2004). E também de acordo com Beenakker et al. (2002), a pseudohipertrofia contribui com o aumento do músculo. Cros et al. (1989) relatam que em seu experimento com biopsia de pacientes DMD, a porcentagem de tecido gorduroso e fibroso

depositado no músculo representa entre 18-38%, enquanto que nos controles esses valores nunca ultrapassava de 8%.

Na comparação o músculo *semitendinosus* contraído e relaxado, observamos que há um aumento significativo das medidas do músculo em contração em relação relaxado, em ambos os antímeros. Estudos demonstram que a estrutura do músculo durante a contração é alterada, mas não da mesma forma em todos os músculos. Esses dados também foram demonstrados em humanos, no qual o *brachialis*, por exemplo, apresenta mais diferença na espessura do que o *vastus lateralis*, sugerindo que a mudança de arquitetura muscular é específica, complexa e não pode ser baseada em um simples modelo (CHI-FISHMAN et al., 2004). Como demonstramos neste experimento, acredita-se que há diferença significativa das medidas entre músculo contraído e relaxado, acredita-se que a ultra-sonografia colabora na realização de mensurações musculares, mas temos que ressaltar que ainda não há um padrão estabelecido em cães, sendo necessárias pesquisas para instituí-lo.

Quanto à correlação da espessura muscular X peso do animal, de forma geral, observamos que nos machos, L3 é o animal que mais apresentou correlação significativa, ou seja, conforme foi aumentando o peso, a espessura muscular acompanha. E entre as fêmeas, L5 foi a que a mais apresentou alta correlação. O fato de o macho normal e a portadora apresentarem menores correlações que os animais afetados pode ser explicado pela estabilização das mensurações em um determinado tempo e continuação do aumento de peso.

5.2 Avaliação Quantitativa e Qualitativa dos Músculos

Para os músculos cervicais, na avaliação qualitativa observamos regularidade das fibras e maior ecogenicidade do músculo *splenius* em relação ao *semispinalis capitis* em todos os animais avaliados. Essa diferença pode ocorrer porque de acordo com Pillen et al. (2006), diferentes músculos possuem diferentes escalas de cinza, corroborando com os dados do nosso experimento. Já Walker et al. (2004) descreve que diferentes músculos apresentam

dessemelhantes proporções de tecido fibroso, e devem, por isso, apresentar maior ou menor grau de ecogenicidade.

Já a diferença de ecogenicidade pela avaliação visual, entre os animais não foi detectada, confirmando-se o reportado por Pillen et al. (2006) no qual cita que a avaliação visual pode não ser um método suficientemente confiável.

Porém através da avaliação quantitativa essas diferenças foram esclarecidas. Esses resultados mostram que somente a avaliação visual sugerida por Heckmatt, não é suficiente. Heckmatt (1988) estabeleceu critérios para graduar de forma qualitativa as características das imagens dos músculos. O Grau I indica músculo normal; os graus II, III e IV indicam o aumento de ecogenicidade muscular com eco óssea normal, reduzida e ausente, respectivamente.

Segundo Pillen et al. (2006), Brockmann et al. (2007), Pillen et al. (2007), a quantificação da intensidade do eco é considerada como um método mais objetivo e eficaz quando comparada com a avaliação visual dos músculos. Pillen et al. (2006) conclui que, devido às diferenças de escala de cinza de cada músculo e a inabilidade de fazer correções a esse respeito, a avaliação visual é um método inadequado para descrever alterações de ecogenicidade muscular. Nesta pesquisa, também pôde-se observar que somente a análise visual não é suficiente, pois em alguns casos detectamos aumento de ecogenicidade significativo somente pela análise digital e além de constatarmos por meio de escores essa diferença entre os músculos cervicais avaliados.

Por meio da análise quantitativa podemos observamos que para o músculo *splenius* direito e esquerdo, L2 (controle afetado) apresentou ecogenicidade significativamente maiores que L7 (afetado tratado via IM), assim como L6 (afetada tratada via IV) apresentou escores de ecogenicidade maiores que L4 (afetada tratada via IM). Para o antímero esquerdo, temos também que L2 apresenta escores maiores que L3 (afetado tratado via IV). O esperado para um resultado positivo de melhora, no exame ultra-sonográfico, para qualquer tratamento realizado em músculo, é a visualização da arquitetura muscular o mais próxima possível da normalidade, ou seja, uma estrutura de baixa intensidade de eco, divididas por bainhas perimiosal de tecido conectivo que apresenta um discreto aumento de eco (HECKMATT; PIER; DUBOWITZ, 1988; SCHOLTEN et al., 2003). Na distrofia muscular, a intensidade do eco aumenta e a arquitetura muscular é interrompida devido às células musculares serem

substituídas por tecido conectivo e gordura (ZUBERI et al. 1999; PILLEN et al. 2003; PILLEN et al. 2006).

Os estudos sobre injeção de CT relatam migração das células quando estas foram injetadas via IV, como relata Chamberlain (2006) citando um estudo com injeção de células tronco realizado por Giulio Cossu et al., descrevendo que a distrofina quando injetada por via endovenosa, é encontrada em vários sítios musculares, indicando que essas células migram. Como nenhum animal afetado(a) tratado IV apresentou escores menores que o afetado(a) controle simultaneamente em ambos os antímeros do músculo *splenius*, sugerimos que as comparativas diminuições de eco entre os animais se deva às variações individuais, erro estatístico tipo I ou a posição do transdutor pois os graus de eco muscular são susceptíveis a alteração e variação do ângulo de incidência do transdutor em relação ao músculo durante a análise (PILLEN et al. 2006; WALKER et al. 2004). Contudo L3 apresentou menores escores em relação a L2, somente do antímero esquerdo, deixando suspeitas sobre a migração de CT nesse grupo muscular.

Quanto ao músculo *semispinalis capitis*, temos para ambos os antímeros, maiores escores de L2 em relação à L3 e de L6 em relação a L4. Sugerimos para o caso de L3, que recebeu CT com maior frequência que L6, que esses menores escores se devam pela migração das células para esse sítio muscular, já que também apresentou menores escores no músculo citado anteriormente. Porém a confirmação da expressão da distrofina só pode ser admitida após retirada de fragmento deste músculo, quando o animal vier a óbito. A biopsia muscular no animal vivo não seria indicada devido à espessura deste músculo e pela topografia do mesmo.

Mesmo sabendo que o diagnóstico por imagem nem sempre condiz com a condição clínica, sugerimos quanto aos resultados de L6 e L4 como consequência das variações previamente reportadas. Talvez esse experimento exemplifique o mencionado por Sampaioles et al. (2006), no qual demonstrou com dois cães GRMD que em três injeções consecutivas (intervalo de 1 mês) de células tronco não foram suficientes para ocorrer a melhora clínica.

Para o antímero direito do mesmo músculo, ainda observamos que L5 apresentou maiores escores em relação à X7 e L4 e para o antímero esquerdo C4 teve maiores escores que L2, assim como L2 em relação à L7. Como foram alterações que ocorreram somente de um antímero sugerimos como consequência das variações reportadas anteriormente.

Em relação ao músculo *semitendinosus*, temos homogeneidade de resultados para ambos os antímeros, somente na comparação entre as fêmeas afetadas L5 com L6 e L5 com L4. Entre elas, não há diferença de escores dos histogramas e nem em relação aos graus de característica do músculo, exceto para o antímero direito, que L6 apresentou graus mais elevados que L5, porém, por ser um fato isolado, pode ser devido variações individuais, erro estatístico tipo I ou a posição do transdutor. Quanto à comparação de L4 e L6, temos que L4 apresentou escores inferiores à L6 somente para o antímero direito, porém na avaliação de graus não há diferença. E como a veterinária responsável pelas injeções relatou que as por via IM ocorreram no antímero esquerdo, não há a possibilidade de esses menores valores estarem relacionados à injeção. Portanto, entre essas fêmeas afetadas não foi possível identificar resposta positiva quanto à injeção de CT.

Para a comparação entre a portadora (X7) e afetada controle (L5) temos para o antímero direito o aumento de escores dos histogramas da primeira e igualdade na graduação e escores semelhantes para o antímero esquerdo, porém na graduação temos que L5 apresentou maiores valores que X7. De acordo com Gomez et al. (1988), as portadoras de distrofias musculares podem apresentar aumento de ecogenicidade muscular, porém essa alteração já foi descrita como de ocorrência em mulheres normais obesas, dificultando a diferenciação através do ultra-som, entre tais enfermidades. Há também achados histopatológicos nas portadoras que são chamados de “manifestações das portadoras” e consistem em variáveis graus de degeneração, regeneração e fibrose (SHELTON et al., 2005). Portanto, para esse estudo, acredita-se que o aumento de ecogenicidade da fêmea X7 pode estar relacionado com a “manifestação das portadoras”.

Quando nos referimos aos machos, dispomos para o antímero direito do músculo *semitendinosus*, que pela análise quantitativa não há diferenças de escores entre os animais L2 e L3, L2 e C4 e L3 e L7, somente L2 apresentou maiores escores que L7. E para os graus estabelecidos para a análise qualitativa não há diferenças entre L2 e L3, L2 e L7 e L3 com L7, somente para L2 e C4, sendo que L2 apresentou maiores graus que C4. Como entre os afetados não há diferença de escores, exceto entre L2 e L7, sugerimos que para o membro pélvico, a avaliação da utilização do ultra-som como técnica para acompanhar evolução terapêutica foi prejudicada pelo grau elevado de pseudohipertrofia que afeta esse sítio muscular e quanto a L2 e L7 pode ser devido variações individuais, erro estatístico tipo I ou a posição do transdutor pois a veterinária responsável pelas injeções relatou que as injeções via IM ocorreram no antímero esquerdo, portanto, não há a possibilidade de esses menores

valores estarem relacionados à injeção. C4 não apresentou escores inferiores, como era esperado, mas na análise qualitativa apresentou menores graduações. Iremos sugerir para este fato, que esses valores estão nitidamente influenciados pela angulação do transdutor e/ou erro tipo II.

Para o antímero esquerdo do músculo *semitendinosus*, dispomos pela análise quantitativa e qualitativa que não há diferença de escores entre L2 e L7 e L3 e L7. L2 apresentou escores menores que L3 nas duas análises. A ausência de diferença entre os afetados novamente sugere que para o membro pélvico, a avaliação da utilização do ultra-som como técnica para acompanhar evolução terapêutica foi prejudicada pelo grau elevado de pseudohipertrofia que afeta esse sítio muscular. Quanto à diminuição de escores em relação à L3 sugerimos um depósito maior de tecido conjuntivo e fibroso. No entanto C4 apresentou maiores valores para a análise quantitativa e valores equivalentes para a análise qualitativa em relação a L2. Esses resultados pode ser devido a angulação do transdutor e/ou erro tipo II, mesmo porque no gráfico de dispersão dos escores do histograma (figura 56) observamos uma regularidade dos escores de C4 contra a variação exagerada nos escores de L2, sendo que este apresentou uma tendência de crescimento apresentando escores maiores do que de C4. E na questão da análise qualitativa, os animais não apresentaram diferença significativa provavelmente porque L2 apresentou o grau 2 em determinado tempos e C4 apresentou essa graduação praticamente em todos os tempos. Cabe ressaltar que o grau 2 prevaleceu em C4 devido ao alto ganho utilizado para a avaliação dos dois grupos musculares adicionando a variância da angulação do transdutor, já que através da análise qualitativa observamos fibras definidas.

Por fim, verifica-se que a ultra-sonografia colabora na realização de mensurações musculares; agora, para avaliação de ecogenicidade muscular faz-se necessária à análise digital em conjunto com a análise visual. O modelo animal apresentou determinados dados sugerindo variações, mas que podem ser excluídas em futuras pesquisas pela realização da repetição (sugere-se 3) da imagem e um maior número de animais; o aparelho que utilizamos para a avaliação não possibilitou a detecção de alterações sutis da arquitetura nos músculos que apresentaram pseudohipertrofia, no entanto, não podemos excluir a possibilidade de que equipamentos de alta resolução possam visibilizar tais alterações.

Apesar do estudo com CT ter sido extensamente explorado há pelo menos 10 anos, ainda não temos um tratamento efetivo para doenças degenerativas, como DMD. Portanto,

acredita-se que são necessários também mais estudos nas diferentes técnicas imaginológicas, no qual, possam avaliar a evolução terapêutica. Cabe, aqui ressaltar o ultra-som de alta resolução devido ao seu baixo custo operacional e a sua qualidade não invasiva.

6 CONCLUSÃO

1. O cão L3 (afetado tratado via IV) apresentou menores escores em relação a L2, no antímero esquerdo do músculo *splenius* e para ambos os antímeros do músculo *semispinalis capitis*, deixando suspeitas sobre a migração de CT nesse grupo muscular.
2. Para a mensuração da espessura de músculos severamente afetados, apresentando hipertrofia, não há meios de estabelecer diferenças significativas entre animais não afetados e afetados.
3. Neste estudo, a utilização da ultra-sonografia como técnica para acompanhar evolução terapêutica de injeção de CT em músculos de cães GRMD, apresentando pseudohipertrofia, não foi viável devido à modificação severa da arquitetura, não sendo possível a detecção de prováveis e sutis reparos da musculatura. Porém, não se descarta a hipótese de visibilização de tais alterações em equipamentos de alta resolução.
4. Pelas diversas sugestões de variância de angulação do transdutor, erro estatístico e variância individual, acredita-se que há a necessidade de repetição (sugere-se 3) das imagens durante o mesmo exame para que essas possibilidades sejam excluídas.
5. O número limitado de cães e a ausência de estudos na medicina veterinária a este respeito dificultam a interpretação dos nossos resultados, abrindo-se assim novas perspectivas para estudos na avaliação ultra-sonográfica muscular de cães, principalmente com equipamentos de alta resolução.

REFERENCIAS

KUMAR,V; ABBAS, A.; FAUSTO, A. Peripheral nerve and skeletal muscle. In: ANTHONY, D. C.; FROSCH, M. P.; GIROLAMI, U. **Pathologic basis of disease**. 7 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2005. P. 1325-1346.

BAROHN, R. J.; LEVINE, E. J.; OLSON, J. O.; MENDELL, J. R. Gastric hypomotility in Duchenne's muscular dystrophy. **The New England Journal of Medicine**, v. 319, p. 15-18, 1988.

BEENAKKER, E. A. C.; VRIES, J.; FOCK, J. M.; TOL, M.; BROUWER, O. F.; MAURITIS, N. M.; HOEVEN, J. H. Quantitative assessment of calf circumference in Duchenne muscular dystrophy patients. **Neuromuscular disorders**, v.12, p. 639-642, 2002.

BROCKMANN, K.; BECKER, P.; SCHREIBER, G.; NEUBERT, K.; BRUNNER, E.; BONNEMANN, C. Sensitivity and specificity of qualitative muscle ultrasound in assessment of suspected neuromuscular disease in childhood. **Neuromuscular disorder**, v. 17, p. 517–523, 2007.

BRUMITT, J. W.; ESSMAN, S. C.; KORNEGAY, J. N.; GRAHAM, J. P.; WEBER, W. J.; BERRY, C. R. Radiographic features of golden retriever muscular dystrophy. **Veterinary Radiology & Ultrasound**, v. 47, n. 6, p. 574-580, 2006.

CAMIRAND, G.; CARON, N. J.; ASSELIN, I. T. Combined immunosuppression of mycophenolate mofetil and FK506 for myoblast transplantation in *mdx* mice. **Transplantation**, v. 72, p. 38- 4, 2001.

CAROMANO, F. A. Características do portador de distrofia muscular de duchenne (dmd) – revisão. **Arquivos Ciência Saúde Unipar**, v. 3, n. 3, p. 211 - 218, 1999.

CHAMBERLAIN, J. S. A move in the right direction. **Nature**, v. 444, p. 552- 553, 2006.

CHI-FISHMAN, G.; HICKS, J. E.; CINTAS, H. M.; SONIES, B. C.; GERBER, L. H. Ultrasound imaging distinguishes between normal and weak muscle. **Archives of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 85, p. 980-986, 2004.

CHILDERS, M. K.; OKAMURA C. S; BOGAN D. J.; BOGAN J. R. ; SULLIVAN, M. J.; KORNEGAY J. N. Myofiber injury and regeneration in a canine homologue of duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Physical Medicine & Rehabilitation**, v. 80, n. 3, p. 175- 81, 2001.

CLAIR, L. E. St. Miologia geral. In: SISSON; GROSSMAN. **Anatomia dos animais domesticos**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 1986.

COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal model used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, p. 165- 72, 2003.

COOPER, B. J.; VALENTINE, B. A.; WILSON, S.; PATTERSON, D. F.; CONCANNON, P. W. Canine muscular dystrophy: confirmation of x-linked inheritance. **The Journal of Heredity**, v. 79, n. 6, p. 405-408, 1988.

CROS, D.; HARDEN, P; PELLISSIER, J. F.; SERRATRICE, G. Muscle hypertrophy in Duchenne Muscular Dystrophy. A pathological and morphometric study. **Journal of Neurology**, v. 236, p. 43- 47, 1989.

DALKILIC, I.; KUNKEL, L.M. Muscular dystrophies: genes to pathogenesis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 13, p. 231- 238, 2003.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. In: DYCE, K. M. **Tratado de Anatomia Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier , 2004.

EMERY, A. E. H. The muscular dystrophies. **The Lancet**, v. 359, p. 687- 695, 2002.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Textbook of veterinary internal medicine diseases of the dog and cat**. 5 ed, Philadelphia: W.B. Saunders Company.

FOSTER, K.; FOSTER, H.; DICKSON J. G. Gene therapy progress and prospects: Duchenne muscular dystrophy. **Gene Therapy**, v. 13, p. 1677-1685, 2006.

GOMEZ, J. A.; SAMPEDRO, J. V.; FERNANDEZ, J. L. H.; MANJON-CABEZA, R. A. Valor de la ecografía muscular em la detección de portadoras de distrofia muscular progresiva. **Anales Españoles de Pediatría**, v. 28, n. 1, p. 35-37, 1988.

GUSSONI, E.; SEGRE, J. Stem cell: A new lease on life. **Cell**, v. 100, p. 143-155, 2000.

HECKMATT, J. Z., PIER, N.; DUBOWITZ, V. Real time ultrasound imaging of muscles. **Muscle Nerve**, v. 11, p. 56- 65, 1988.

HETE, B.; SHUNG, K. K. A study of the relationship between mechanical and ultrasonic properties of dystrophic and normal skeletal muscle. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 21, n. 3, p. 343- 352, 1995.

HERMANSON, J. W; EVANS, H. E. The muscular system. In: **Miller's anatomy of the dog**. 3 ed. Philadelphia: WB Saunders Company, 1996. p. 258-384.

HOFFMAN, E. P.; GOROSPE, J. R. M. The animal models of Duchenne muscular dystrophy: windows on the pathophysiological consequences of dystrophin deficiency. **Current Topics in Membranes**, v. 38, p. 113–154, 1991.

JUNQUEIRA, L. C. U. **Biologia estrutural dos tecidos: histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.225.

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 Disorder**, v. 13, p. 493-500, 2003.

MAURITS, N. M.; BOLLEN, A. E.; WINDHAUSEN, A.; JANDER, A. E. J.; HOEVEN, J. H. Muscle ultrasound analysis: normal values and differentiation between myopathies and neuropathies. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 29, n. 2, p. 215 - 255, 2003.

MAURITS, N. M; BEENAKKER, E. A. C.; SCHAIK, D. E. C.; FOCK, J. M.; HOEVEN, J. H. Muscle ultrasound in children: normal values and application to neuromuscular disorders. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 30, n. 8, p. 1017-1027, 2004.

NEGRONI, E.; BUTLER-BROWNE, G. S.; MOULY, V. Myogenic stem cells: regeneration and cell therapy in human skeletal muscle. **Pathologie Biologie**, v. 54, p. 100 – 108, 2006.

NEWTON, C. D.; NUNAMAKER, D. M. **Textbook of small animal orthopedics**. 1985. Disponível em: <[http: www.ivis.org.br](http://www.ivis.org.br)>. Acesso em: ago. 2007.

NIELSEN, P. K.; JENSEN, B. R.; DARVANN, T.; JORGENSEN, K.; BAKKE, M. Quantitative ultrasound image analysis of the supraspinatus muscle. **Clinical Biomechanics**, n. 1, S13-S16, 2000.

NGUYEN, F.; CHEREL, Y.; GUIGAND, L.; GOUBAULT-LEROUX, I.; WYERS, M. Muscle lesions associated with dystrophin deficiency in neonatal golden retriever puppies. **Journal Comp. Pathology**, v. 126, p. 100- 108, 2002.

NYLAND, T. G.; MATTOON, J. S. **Small animal diagnostic ultrasound**. 2ed., Philadelphia: Saunders, 2002. p. 267–284.

OLIVEIRA, C.; TEIXEIRA, R. A. P.; CONCHALO, W. L. **Uma abordagem contextualizada da anatomia humana e comparada**. 2004. Disponível em: <http://www.unesp.br/prograd/PDFNE2004/artigos/eixo3/umabordagemcontextualizada.pdf>. Acesso em: nov. 2007.

PILLEN, S.; KEIMPEMA, M.; NIEVELSTEIN, R. A. J.; VERRIPS, A.; KRUIJSBERGEN-RAIJMANN, W.; ZWARTS, M. J. Skeletal muscle ultrasonography: visual versus quantitative evaluation. **Ultrasound in Medicine & Biology**, v. 32, n. 9, p. 1315- 1321, 2006.

PILLEN, S.; SCHOLTEN, R. R.; ZWARTS, M. J.; VERRIPS, A. Quantitative skeletal muscle ultrasonography in children with suspected neuromuscular disease. **Muscle & Nerve**, v. 27, p. 699- 705, 2003.

PILLEN, S.; VERRIPS, A.; ALFEN, N.; ARTS, I. M. P.; SIE, L. T. L.; ZWARTS, M. J. Quantitative skeletal muscle ultrasound: Diagnostic value in childhood neuromuscular disease. **Neuromuscular Disorder**, v. 17, p. 509- 516, 2007.

PRICE, F. D.; KURODA, K.; RUDNICKI, M. A. Stem cell based therapies to treat muscular dystrophy. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1772, p. 272 – 283, 2007.

RANKIN, G.; STOKES, M.; NEWHAM, D. J. Size and shape of the posterior neck muscles measured by ultrasound imaging: normal values in males and females of different ages. **Manual Therapy**, v. 10, p. 108- 115, 2005.

REZASOLTANI, A.; MALKIA, E.; VINKO, V. Neck muscle ultrasonography of male weight-lifters, wrestlers and controls. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 9, p. 214- 218, 1999.

SCHOLTEN, R. R.; PILLEN, S.; VERRIPS, A.; ZWARTS, M. J. Quantitative ultrasonography of skeletal muscles in children: normal values. **Muscle Nerve**, v.27, p. 693- 698, 2003.

SHAIR, A.; MILGRAM, J.; SHAHAR, R. Structural and functional anatomy of the neck musculature of the dog. **Journal of Anatomy**, v. 208, p. 331- 351, 2006.

SHELTON, G. D.; ENGVALL, E. Canine and feline models of human inherited muscle diseases. **Neuromuscular Disorder**, v. 15, p. 127- 138, 2005.

SHELTON, G. D.; LIU, L. A.; GUO, L. T.; SMITH, G. K.; CHRISTIANSEN, J. S.; THOMAS, W. B.; SMITH, M. O.; KLINE, K. L.; MARCH, P. A.; FLEGEL, T.; ENGVALL, E. Muscular dystrophy in female dogs. **Journal Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 240-244, 2001.

SCHATZBERG, S. J.; ANDERSON, L. V. B.; WILTON, S. D.; KORNEGAY, J. N.; MANN, C. J.; SOLOMON, G. G.; SHARP, N. J. H. Alternative dystrophin gene transcripts in golden retriever muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, v. 21, p. 991- 998, 1998.

SCHWINDT, T. T.; BARNABÉ, G. F.; MELLO, L. E. A. M. Proliferar ou diferenciar? Perspectivas de destino das células-tronco. **Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 16, n. 1, p. 13-19, 2005.

SOUZA, M. H. L.; ELIAS, D. O. As células-tronco e o seu potencial na reparação de órgãos e tecidos. **Centro de Estudos Alfa Rio - Perfusion Line – educação continuada em biomedicina e biotecnologia**, 2005. Disponível em:
<http://perflin.com/cear/artigos/stem_teste.html>. Acesso em: set. 2006.

STROBER, J. B. Therapeutics in Duchenne Muscular Dystrophy. **The American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, v. 3, p. 225- 234, 2006.

TERRADO, J.; GINER, M.; GÓMEZ, O. Anomalous insertion of the splenius muscle in a dog. **The Veterinary Journal**, v. 170, p. 375- 376, 2005.

TILLEY, L. P ; SMITH Jr, F. W. K. **The 5-minute veterinary consult canine and feline**. 3 ed, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkis, 2004. p.885.

THIBAUD, J. L.; MONNET, A.; BERTOLDI, D.; BARTHÉLÉMY, I.; BLOT, S.;
CARLIER, P.G. Characterization of dystrophic muscle in golden retriever muscular
dystrophy dogs by nuclear magnetic resonance imaging. **Neuromuscular Disorders**, v. 17,
p.575-584, 2007.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J. Canine X-linked muscular dystrophy: selective
involvement of muscles in neonatal dogs. **Neuromuscular Disorder**, v. 1, p. 31- 38, 1991.

VAINZOF, M.; ZATZ, M. Protein defects in neuromuscular diseases. **Brazilian Journal of
Medical and Biological Research**, v. 36, p. 543–555, 2003.

WALKER, F.O.; CARTWRIGHT, M.S.; WIESLER, E.R.; CARESS, J. Ultrasound of nerve
and muscle. **Clinical Neurophysiology**, v. 115, p. 495-507, 2004.

ZATZ, M; VAINZOF, M; PASSOS-BUENO, M. R. Limb-girdle muscular dystrophy: one
gene with different phenotypes; one phenotype with different genes. **Current Opinion in
Neurology**, v. 13, p. 511-517, 2000.

ZUBERI, S. M.; MATTA, N.; NAWAZ, S.; STEPHENSON, J. B. P.; MCWILLIAM, R. C.;
HOLLMAN, A. Muscle ultrasound in the assessment of suspected neuromuscular disease in
childhood. **Neuromuscular Disorders**, v. 9, p.203-207, 1999.