ROBSON FORTES GIGLIO

**Estudo longitudinal da densidade mineral óssea de cães normais,
portadores e afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever
(D.M.G.R.)**

São Paulo
2004

ROBSON FORTES GIGLIO

**Estudo longitudinal da densidade mineral óssea de cães normais,
portadores e afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever
(D.M.G.R.)**

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 a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária

Departamento:

Cirurgia

Área de Concentração:

Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientador:

Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno

São Paulo
2004

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1411
FMVZ

Giglio, Robson Fortes

Estudo longitudinal da densidade mineral óssea de cães normais, portadores e afetados pela distrofia muscular do Golden Retriever (D.M.G.R.) / Robson Fortes Giglio. - São Paulo : R. F. Giglio, 2004.
83 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, 2004.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno.

1. Densitometria óssea. 2. Cães. 3. Cão Golden Retriever.
4. Distrofia muscular. 5. Radiologia. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"

PARECER

Interessado: Robson Fortes Giglio

Assunto: Protocolo de experimentação adotado em experimento animal.

A Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, após analisar o projeto sob o número 446/2004, intitulado: "Estudo longitudinal da densidade mineral óssea em cães da raça "Golden Retriever" normais, portadores e afetados por distrofia muscular (GRMD)", no qual foram utilizados 15 cães, sob responsabilidade do Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno, constatou que o mesmo foi realizado de acordo com os princípios de bioética, adotados por esta Comissão.

São Paulo, 06 de abril de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera

Presidente da Comissão de Bioética

FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Giglio, Robson Fortes.

Título: Estudo longitudinal da densidade mineral óssea de cães normais, portadores, e afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever (D.M.G.R.)

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: _____

DEDICATÓRIA

“Aos meus pais Haroldo Giglio Jr. e Maria Beatriz Fortes Giglio, irmão Marcelo Fortes Giglio, avós Haroldo Giglio, Maria Alcântara Giglio, Ignês de Castro Fortes , tios Carlos Alberto , Regina Quintanilha, Regina Teresinha, Hercília Helena Giglio e primo Carlos Alberto Giglio Júnior pelo amor, carinho, apoio, companheirismo, dedicação ...”

“A Lilian de Jesus de Oliveira por todo
companheirismo nas horas alegres, apoio
nas horas difíceis, dedicação e felicidade
que tenho a oportunidade de desfrutar ao
longo destes quase um ano e meio...”

AGRADECIMENTOS

- A Deus por todas as oportunidades de seguir o caminho almejado...;
- Ao Prof. Dr. Cássio Ricardo Auada Ferrigno por me aceitar como seu orientado, pelos anos de convivência, ensinamentos, opiniões, conversas e toda a paciência;
- A Faïçal Simon (*in memoriam*), Edgar L. Sommer, Milton Kolber, Prof. Dr. Benedicto W. de Martin e Prof. Dr. Franklin de Almeida Serman por serem profissional e pessoalmente exemplares;
- A Taeko Sommer, Maria José de Martin e Maria Teresa Serman pela determinação e espírito empreendedor;
- Ao incansável José D. F. da Silva;
- A Profa. Dr.^a Myriam Krasilchik da Faculdade de Educação da USP pela imensa simpatia e todos os ensinamentos;
- A Profa. Dra. Maria Angélica Miglino e Profa. Dra. Mayana Zatz pela oportunidade;
- A todos os professores e funcionários da Universidade Paulista pelo convívio e ensinamentos;
- Aos colegas de turma Luis Fernando de Moraes, Déborah C. D. Nahkur, Fábio D. C. Monteiro, Leandro Pelegrinni, Fábio T. Nichida pela amizade e companheirismo inigualáveis;
- Aos médicos veterinários Ana Maria Falklen, Jane Maria Rocha, Carlo L. G. Frattocchi, Rogério Solia, Silvia M. Neves, Cláudia Andrade, Miriam H. Valasc, Nilson K. Kage, Mariana Ferreira, Fábio Kozu, Salvador L. R. Urtado, Thelma R. Cintra, Gabriela S. Rodrigues, Patrícia R. Cuyumjian pelos ensinamentos, conselhos e convivência;

- Aos colegas Roberto C. Darabas, Anny K. R. Garcia e Daniel Batista pelos conselhos e amizade;
- A todos os docentes do Departamento de Cirurgia da FMVZ-USP, principalmente a Profa. Dra. Ana Carolina B. C. Fonseca Pinto, Prof. Dr. Pedro Primo Bombonato, Prof. Dr. Francisco J. H. Blazquez, Prof. Dra. Silvia R. Cortopassi e Prof. Dr. José Roberto Kfoury Júnior pelos ensinamentos, oportunidades e amizade;
- A Caterina Muramoto e Jefferson D. Alves pela disposição e por todas as explicações;
- Ao Prof. Dr. Júlio César C. Balieiro pela disposição e grande ajuda na análise estatística;
- Ao grande amigo André Norman Lang, por todo tempo de convivência e a ajuda com o idioma inglês;
- A Maria Aparecida de Jesus, Luis Manoel de Oliveira, Rodolfo Manoel e Luciana de Jesus Oliveira pela recepção, companheirismo e suporte;
- A todos os proprietários dos animais doados deste experimento, principalmente Maria Rita Passos-Bueno e Natássia Viera pela compreensão e vontade de ajudar;
- A todos os funcionários do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos (Edinaldo, Diogo e Ronaldo) e Silvestres, da Biblioteca, da CPG (Daise, Cláudia e Sandra), da Lavanderia, do Hospital e aos médicos veterinários residentes contratados da FMVZ-USP pela convivência e colaboração;
- Aos secretários Patrícia, Jaqueline, Maicon e Rose por toda ajuda;
- Aos funcionários do Setor de Diagnóstico por Imagem Hugo, Reginaldo, Benjamim, Kátia e a médica veterinária Silvana M. Unruh pela amizade e grande ajuda na viabilização deste experimento;

- Aos alunos da 66ª e 69ª turma da FMVZ-USP pelo convívio e dedicação;
- Aos amigos e a todos que promovem e engrandecem o Agility: Dante Camacho, Maria Suzuki, André e Daniela Gaspar, Denis Pissarro, Carla Maria, Fátima, Evelise, Plínio e Cris Leme, Fernando, Elmo, José Luis Filho, Flávio Tamaio, Samy e Dan Wroblewski, Laís e Marina Aranha, Nelson e Daniela Lombardi, Mauro Zimenez, entre tantos outros;
- As minhas cadelas Ingra e Maria Bonita pelo amor incondicional;
- A todos os cães do canil GRMD;
- Aos todos colegas do Canil GRMD e do curso de pós-graduação desta universidade pelo companheirismo e colaboração;
- Aos grandes amigos que encontrei neste período: Ana Rita Lima, Felipe Camargo Braga, Flávia T. V. Pereira, Janaína M. Monteiro, André L. S. Casas, Alexandre Schmaedecke, Mônica Lotito, Emerson Fioretto, Karina Martinez, Naianne Clebis, Patrícia O. Gonçalves, Gustavo C. Rodrigues, Renata Iunes, Carolina do Prado, Ryan E. Piera, Vanessa Marques, Roselaine de Oliveira, Gisele Saviani, Rafael Cardoso, Hildebrando Benedicto, Wilker Gléria, Karina do Valle, Angélica P. Grando, Elisângela Aneli, por passarmos juntos tantos momentos importantes;

RESUMO

GIGLIO, R. F. **Estudo longitudinal da densidade mineral óssea de cães normais, portadores, e afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever (D.M.G.R.).** [Longitudinal study of bone mineral density in healthy, carrier, and affected dogs by Golden Retriever Muscular Dystrophy (GRMD).] 2004. 83 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

A forma mais comum de distrofia muscular em humanos é do tipo Duchenne, com uma incidência aproximada de um caso a cada 3.500 nascimentos masculinos. A Distrofia Muscular do Golden Retriever (DMGR) é considerada o modelo animal mais apropriado à Distrofia Muscular de Duchenne (DMD). A Densitometria Óptica Radiográfica é um método de análise para quantificação da matéria mineral óssea, sendo, neste estudo, realizado com radiografias simples da tíbia direita ao lado de escala de alumínio. Foram utilizados 15 cães da raça Golden Retriever, sendo 5 cães normais, 5 fêmeas portadoras e 5 machos afetados pela DMGR, que foram radiografados mensalmente, dos 3 aos 9 meses de idade. Estas radiografias foram digitalizadas e analisadas por meio de um *software* de análise de imagens (ImageLab, Softium®), que compara as tonalidades de cinza da escala com região óssea analisada, obtendo-se valores em milímetros de alumínio (mmAl). Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente utilizando o procedimento Proc Means do programa *Statistical Analysis System*, versão 8.0. O estudo revelou que a região epifisária possui maior densidade mineral óssea (DMO), seguida pela região metafisária e diafisária, respectivamente, nos três grupos avaliados, ao longo do período experimental, e seguiram o comportamento do peso corpóreo. Houve uma tendência de aumento da DMO nas três regiões avaliadas dos três grupos ao longo do experimento. A região metafisária proximal de tíbia demonstrou ser a região de eleição para a leitura da DMO por ser o local estudado com menor correlação com o peso corpóreo e por promover estimativas médias consideradas significativas entre grupos avaliados mais cedo que nas demais regiões. O potencial

de diagnóstico do exame densitométrico, em relação a DMGR, foi considerado baixo, entretanto demonstrou ter grande potencial no acompanhamento do progresso desta doença por apresentar alta sensibilidade para detecção de variações na densidade mineral óssea.

Palavras-chave: Densitometria óssea. Radiologia. Cães. Cão Golden Retriever. Distrofia muscular.

ABSTRACT

GIGLIO, R. F. **Longitudinal study of bone mineral density in healthy, carrier, and affected dogs by Golden Retriever Muscular Dystrophy (G.R.M.D.).** [Estudo longitudinal da densidade mineral óssea de cães normais, portadores, e afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever (D.M.G.R.).] 2004. 83 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

Duchenne Muscular Dystrophy is the most common type of muscular dystrophy in humans affecting 1 in 3,500 male births. Muscular dystrophy in Golden Retrievers appears to be an appropriate model of the human Duchenne Muscular Dystrophy. Radiographic Optical Densitometry is an analytic method to measure bone mineral content. This technique was performed by right tibia simple radiograph conjugated with an aluminium stepwedge. 5 healthy dogs, 5 female carriers and 5 male affected dogs by Golden Retriever Muscular Dystrophy were divided in 3 groups. Monthly, all the dogs were radiographed from 3-months until 9-months old. Radiographs were digitalized and analyzed by an image processing software (ImageLab, Softium), which compares the aluminium grey scale tonalities with a bone region analyzed obtaining with this the value of bone mineral density in aluminium millimeters (mmAl). The obtained results were statistically analyzed using the the procedure Proc Means of the program Statistical Analysis System 8.0 software. The epiphyseal region possess higher bone mineral density followed for the metaphyseal and diaphyseal regions, respectively, in the three evaluated groups during the experimental period and followed by the behavior of the corporeal weight. There was a trend of increase of the bone mineral density in the three evaluated regions of all three groups. The proximal metaphyseal region of tibia demonstrated to be the best region of selection to evaluate the bone mineral density since it is place studied with less correlation with the corporeal weight and by promoting significant considered average estimates between groups evaluated earlier than other regions. The potential of diagnosis of this densitometric method in

Golden Retriever Muscular Dystrophy was considered low, however this study demonstrated to have great potential in the accompanying the progress of this disease due to the high sensitivity for detection of bone mineral density changes.

Keywords: Densitometry. Radiology. Dogs. Golden Retriever. Muscular dystrophy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Foto ilustrativa de um cão da raça Golden Retriever afetado pela Distrofia Muscular do Golden Retriever aos cinco meses de idade.....	37
Figura 2a e 2b -	Foto ilustrativa de um cão da raça Golden Retriever afetado pela Distrofia Muscular do Golden Retriever aos nove meses de idade.....	37
Figura 3 -	Foto ilustrativa do penetrômetro posicionado sobre o chassis	39
Figura 4 -	Foto ilustrativa do posicionamento radiográfico para a realização da incidência médio-lateral da tíbia direita do filhote paralela ao penetrômetro.....	40
Figura 5a e 5b-	Fotos ilustrativas do Laboratório de Densitometria onde se observa o microcomputador Pentium III Infoway (Itautec®), o adaptador para transparências Hewlett-Packard, modelo ScanJet XPA e o <i>scanner</i> de mesa Hewlett-Packard, modelo Scanjet 630.....	41
Figura 6 -	Visualização do programa HP PrecisionScan Pro mostrando a imagem adquirida por este da articulação fêmoro-tíbio-patelar e região médio-proximal do fêmur direito paralela ao penetrômetro.....	42
Figura 8 -	Visualização do programa ImageLab mostrando a configuração do programa para a seleção de 25 degraus do penetrômetro.....	44
Figura 9 -	Visualização do programa ImageLab mostrando a seleção do filtro (3) para a adequada leitura das densidades minerais ósseas.....	44
Figura 10 -	Visualização do programa ImageLab mostrando a rotação da imagem para a correta leitura das densidades minerais ósseas.....	45
Figura 11 -	Visualização do programa ImageLab mostrando a seleção dos 25 degraus da imagem padrão do penetrômetro.....	45

Figura 12 -	Visualização do programa ImageLab mostrando a planilha e o gráfico dos valores de densidade óptica radiográfica dos degraus da imagem padrão do penetrômetro.....	46
Figura 13 -	Visualização do programa ImageLab mostrando a planilha e o gráfico após a seleção dos degraus do penetrômetro de outra radiografia, onde se observa no gráfico uma curva em vermelho representando os valores de densidade óptica radiográfica dos degraus da imagem padrão e outra curva em azul representando os valores de densidade óptica radiográfica dos degraus de outra radiografia, anterior ao processo de equalização desta nova imagem a imagem estabelecida como padrão.....	47
Figura 14 -	Visualização do programa ImageLab mostrando a confecção de linhas que servirão de guias para a elaboração dos três quadriláteros das regiões a serem analisadas.....	48
Figura 15 -	Visualização do programa ImageLab mostrando a demarcação dos três quadriláteros correspondentes as regiões epifisária (E), metafisária (M) e diafisária(D).....	49
Figura 16 -	Visualização do programa ImageLab mostrando a seleção dos três quadriláteros correspondentes as regiões epifisária (E), metafisária (M) e diafisária(D) com a leitura da densidade óptica (DO), à direita, da região metafisária (M).....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estimativas de médias, número de observações, desvios-padrão, coeficientes de variação, mínimo e máximo para os valores de densidade mineral óssea das regiões de epífise, metáfise e diáfise proximal da tíbia direita e de peso corpóreo avaliados ao longo do período experimental dos cães do Grupo I (animais afetados pela D.M.G.R.), São Paulo – 2003/2004.....	53
Tabela 2 -	Estimativas de médias, número de observações, desvios-padrão, coeficientes de variação, mínimo e máximo para os valores de densidade mineral óssea das regiões de epífise, metáfise e diáfise proximal da tíbia direita e de peso corpóreo avaliados ao longo do período experimental dos cães do Grupo II (animais portadores da D.M.G.R.), São Paulo – 2003/2004.....	54
Tabela 3 -	Estimativas de médias, número de observações, desvios-padrão, coeficientes de variação, mínimo e máximo para os valores de densidade mineral óssea das regiões de epífise, metáfise e diáfise proximal da tíbia direita e de peso corpóreo avaliados ao longo do período experimental dos cães do Grupo III (animais normais), São Paulo – 2003/2004.....	54
Tabela 4 -	Resumo dos efeitos de grupo (G), idade (I) e da interação grupo-idade (G x I) avaliados para o peso corpóreo por meio do grau de liberdade do numerador (G.L.) e o Teste F (F), São Paulo – 2003/2004.....	55
Tabela 5 -	Desdobramento da interação grupo-idade (GxI), considerando os grupos dentro de cada idade (em meses) avaliados para o peso corpóreo por meio do grau de liberdade do numerador (G.L.) e o Teste F (F), São Paulo - 2003/2004.....	56
Tabela 6 -	Estimativas médias do peso corpóreo (em Kg) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade, São Paulo – 2003/2004.....	57
Tabela 7 -	Resumo dos efeitos de grupo (G), idade (I) e da interação grupo-idade (Gx I) avaliados para a densidade mineral óssea (D.M.O.) da região epifisária proximal do tíbia direita por meio do grau de liberdade do numerador (G.L.) e o Teste F (F), São Paulo – 2003/2004.....	58
Tabela 8 -	Desdobramento da interação grupo-idade (GxI), considerando os grupos dentro de cada idade (em meses) avaliados para a densidade mineral óssea (D.M.O.) da região epifisária proximal da tíbia direita por meio do grau de liberdade do numerador (G.L.) e o Teste F (F), São Paulo – 2003/2004.....	59

Tabela 9 -	Estimativas médias da densidade mineral óssea (D.M.O.) da região epifisária proximal da tíbia direita (em mm Al) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade, São Paulo – 2003/2004.....	60
Tabela 10 -	Resumo dos efeitos de grupo (G), idade (I) e da interação grupo-idade (G x I) avaliados para a densidade mineral óssea (D.M.O.) da região metafisária proximal da tíbia direita por meio do grau de liberdade do numerador (G.L.) e o Teste F (F), São Paulo - 2003/2004.....	61
Tabela 11 -	Desdobramento da interação grupo-idade (GxI), considerando os grupos dentro de cada idade (em meses) avaliados para a densidade mineral óssea (D.M.O.) da região metafisária proximal da tíbia direita por meio do grau de liberdade do numerador (G.L.) e o Teste F (F), São Paulo – 2003/2004.....	62
Tabela 12 -	Estimativas médias da densidade mineral óssea (D.M.O.) da região metafisária proximal da tíbia direita (em mm Al) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade, São Paulo – 2003/2004.....	63
Tabela 13 -	Resumo dos efeitos de grupo (G), idade (I) e da interação grupo-idade (G x I) avaliados para a densidade mineral óssea (D.M.O.) da região diafisária proximal da tíbia direita por meio do grau de liberdade do numerador (G.L.) e o Teste F (F), São Paulo – 2003/2004.....	64
Tabela 14 -	Desdobramento da interação grupo-idade (GxI), considerando os grupos dentro de cada idade (em meses) avaliados para a densidade mineral óssea (D.M.O.) da região diafisária proximal da tíbia direita por meio do grau de liberdade do numerador (G.L.) e o Teste F (F), São Paulo – 2003/2004.....	65
Tabela 15 -	Estimativas médias da densidade mineral óssea (D.M.O.) da região diafisária proximal da tíbia direita (em mm Al) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade, São Paulo - 2003/2004.....	66

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Representação das estimativas médias do peso corpóreo dos grupos avaliados dentro das idades consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade.....57
- Gráfico 2 - Representação das estimativas médias da densidade mineral óssea (DMO) da região epifisária proximal da tíbia direita (em mm Al) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade.....60
- Gráfico 3 - Representação das estimativas médias da densidade mineral óssea (DMO) da região metafisária proximal da tíbia direita (em mm Al) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade.....63
- Gráfico 4 - Representação das estimativas médias da densidade mineral óssea (DMO) da região diafisária proximal da tíbia direita (em mm Al) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade.....66

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

® -	marca registrada
% -	porcentagem
ABNT -	Associação Brasileira de Normas Técnicas
bmp -	bitmap
cm -	centímetros
CV -	coeficiente de variação
DMD -	Distrofia Muscular de Duchenne
DMGR -	Distrofia Muscular do Golden Retriever
DMO -	Densidade mineral óssea
DNA -	Ácido desoxiribonuclêico
DOR -	Densitometria óptica radiográfica
DP -	desvio-padrão
DPA -	Absorciometria de fótons de dupla energia
F -	teste F
G -	grupo
Gb -	gigabite
GL -	grau de liberdade do numerador
GRMD -	Golden Retriever Muscular Dystrophy
G x I -	interação grupo-idade
HD -	HardDisk
I -	idade
Kg -	quilogramas
Kv -	quilovolts
m -	mês
mA -	miliampère
Máx -	valor máximo
Méd -	média
Mín -	valor mínimo
mm -	milímetros
mmAl -	milímetros de alumínio
MHz -	megaHertz
N -	número de observações
s -	segundos
SPA -	Absorciometria de fótons de uma energia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	OBJETIVOS.....	24
3	REVISÃO DA LITERATURA.....	26
4	MATERIAL E MÉTODO.....	35
4.1	ANIMAIS.....	36
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	38
4.2.1	Tempo de Avaliação.....	38
4.3	MÉTODO.....	38
4.3.1	Equipamentos.....	38
4.3.2	Pesagem.....	40
4.3.3	Obtenção das imagens radiográficas.....	40
4.3.4	Técnica de Densitometria Óptica Radiográfica.....	42
4.3.5	Seleção das regiões analisadas.....	47
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
5	RESULTADOS.....	52

5.1	ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS ESTIMATIVAS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS ANALISADAS.....	53
5.2	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VARIÁVEL PESO CORPÓREO.....	55
5.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VARIÁVEL DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DA REGIÃO EPIFISÁRIA PROXIMAL DA TÍBIA.....	58
5.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VARIÁVEL DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DA REGIÃO METAFISÁRIA PROXIMAL DA TÍBIA DIREITA.....	61
5.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VARIÁVEL DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DA REGIÃO DIAFISÁRIA PROXIMAL DA TÍBIA DIREITA.....	64
6	DISCUSSÃO	67
7	CONCLUSÕES	75
	REFERÊNCIAS	78

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A forma mais comum de distrofia muscular em humanos é a do tipo Duchenne uma incidência aproximada de um caso a cada 3.500 nascimentos masculinos. A Distrofia Muscular do Golden Retriever (DMGR) é considerada o modelo animal mais apropriado à Distrofia Muscular de Duchenne (DMD).

Poucos estudos sobre a densidade mineral óssea em humanos afetados por DMD foram publicados.

Em estudos recentes, pesquisadores afirmam que somente a ambulação não é suficiente para manter a densidade mineral óssea das crianças com DMD.

Devido ao seu baixo custo, facilidade de execução e boa correlação com os métodos de absorção de fótons alguns autores preconizam a utilização da densitometria radiográfica como exame inicial na determinação da densidade óssea em humanos.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem a finalidade de avaliar a densidade mineral óssea dos cães da raça Golden Retriever normais, afetados e portadores da DMGR de forma longitudinal (dos 3 aos 9 meses de idade), correlacionar a densidade mineral óssea com as variáveis (peso, idade e grupo) e regiões (epífise, metáfise e diáfise) estudadas, para determinar se há diferenças na mineralização óssea de cães dos grupos de animais normais, portadores e afetados pela DMGR em fase de crescimento com o intuito de avaliar o potencial de diagnóstico e de acompanhamento da evolução da DMGR através da técnica de densitometria óptica radiográfica.

REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

Distrofia muscular é termo amplamente utilizado para se referir a qualquer doença primária dos músculos esqueléticos, que resultam em degeneração progressiva, regeneração limitada e fibrose das fibras musculares (BERGMAN et al., 2002).

A forma mais comum de distrofia muscular em humanos e cães é causada por mutações no gene da distrofina, que se localiza no cromossomo X, afetando predominantemente machos por estes possuírem apenas um cromossomo X (BERGMAN et al., 2002; SHELTON et al., 2001). Formas de distrofias musculares ligadas ao cromossomo X foram descritas também em ratos e gatos (GOROSPE et al., 1994; HOFFMAN; GOROSPE, 1991; KORNEGAY et al., 1994b).

Distrofina é grande proteína do citoesqueleto importante na manutenção da integridade estrutural do músculo durante a contração e está presente predominantemente na musculatura esquelética e cardíaca, e ,em menor quantidade, em outros tecidos como no encéfalo (BERGMAN et al., 2002; SHELTON et al., 2001).

Em humanos, a forma mais comum de distrofia muscular é o tipo Duchenne com uma incidência aproximada de um caso a cada 3.500 nascimentos masculinos (FLETCHER et al., 2000).

A DMD é essencialmente uma doença de atrito, na qual a lesão das fibras musculares, devido à deficiência na formação da distrofina, é seguida por ciclos de degeneração e regeneração até a capacidade de regeneração esgotar-se (FLETCHER et al., 2000), gerando fibrose progressiva destas (GOROSPE et al., 1994).

A evolução da DMD é relativamente rápida gerando profunda fraqueza muscular e contratura fibrosa nos membros, tornando não ambulantes as crianças afetadas por esta

distrofia. Os músculos inicialmente atingidos por esta degeneração, nos humanos, são os iliopsoas, quadríceps femorais e glúteos (APARÍCIO et al., 2002).

Os sinais clínicos observados nas crianças afetadas pela DMD iniciam-se entre três a cinco anos de idade, onde observam-se quedas freqüentes e dificuldade de correr, levantar do chão e subir escadas. Estas crianças deixam de ser ambulantes com até doze anos e raramente sobrevivem a terceira década de idade (ZATZ et al., 1988).

A Distrofia Muscular do Golden Retriever é considerada o modelo mais apropriado devido a sua analogia com a Distrofia Muscular de Duchenne tanto em relação ao genótipo quanto ao fenótipo (BERGMAN et al., 2002; COOPER et al., 1988; FLETCHER et al., 2000; KORNEGAY, 1988; KORNEGAY et al.1990; KORNEGAY et al.1994a; KORNEGAY et al. 1994b; SCHATZBERG et al., 1998; VALENTINE et al., 1988).

Os sinais clínicos da Distrofia Muscular do Golden Retriever podem ser observados a partir do nascimento do cão. Observa-se com maior freqüência disfagia, enrijecimento dos membros pélvicos com atrofia e hipertrofia muscular seletiva, desvio de eixo dos membros, hipertrofia da língua, fraqueza muscular e contraturas (BERGMAN et al., 2002; KORNEGAY et al., 1988; KORNEGAY et al., 1994b; VALENTINE et al., 1986). Alterações cardíacas são variáveis neste tipo de distrofia (BERGMAN et al., 2002). A progressão destes sinais clínicos é particularmente rápida entre 3 a 6 meses de idade em cães afetados (KORNEGAY et al. 1994b).

Em exames clínicos laboratoriais observa-se dramática elevação dos níveis séricos de creatinina quinase (AMANN, 1987; BERGMAN et al., 2002; KORNEGAY et al., 1988). Em fragmentos musculares coletados através de biópsia submetidos a técnicas histológicas observa-se degeneração, regeneração, fibrose e mineralização das fibras musculares e a técnicas imunohistoquímicas nota-se ausência da distrofia e proteínas associadas (BERGMAN et al., 2002).

O tecido ósseo promove suporte para as partes moles, protege órgãos vitais, aloja a medula óssea, atua como um depósito de cálcio, fosfato e outros íons, proporciona apoio aos músculos esqueléticos e é constituinte do sistema de alavancas que ampliam as forças geradas na contração muscular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

Histologicamente há dois tipos de tecidos ósseos denominados primário ou imaturo e secundário ou lamelar, que possuem as mesmas células e constituintes da matriz, no entanto, as fibras colágenas estão dispostas irregularmente e em menor quantidade no tecido ósseo primário, ao passo que sua disposição se torna lamelar no tecido ósseo secundário (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

Nos ossos longos as epífises são formadas por osso esponjoso com uma delgada camada superficial de osso compacto. A diáfise é composta quase que totalmente por osso compacto, com pequena quantidade de osso esponjoso delimitando o canal medular (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1990).

O tecido ósseo sofre contínua remodelação, desenvolvendo-se em proporção direta ao estresse sofrido, tornando-se mais espesso quando submetido à carga de peso maior (GUYTON; HALL, 1997).

No estudo realizado por Talbott et al. (2001), utilizando ratos, observaram que a densidade mineral óssea está altamente relacionada com o peso corpóreo, e, que a perda deste pode ser acompanhada da redução da densidade mineral dos ossos.

O nível de atividade e exercícios são, principalmente para pessoas saudáveis e jovens, fatores predominantes na regulação da densidade mineral óssea (WHALEN; CARTER, 1988). Assim como Slemenda et al. (1991) que obtiveram dados que sugerem que importante aumento da densidade óssea pode ser resultado da realização de atividades físicas durante a infância.

Poucos estudos sobre a densidade mineral óssea em humanos afetados por distrofia muscular de Duchenne foram publicados.

Osteoporose foi bem caracterizada em meninos com DMD não-ambulantes (APARÍCIO et al., 2002).

Bianchi et al. (2003) relatam que a redução da densidade mineral óssea, principalmente no quadril e membros inferiores, de seus pacientes com DMD parecer ser consequência da redução da tensão mecânica no osso.

Chabot et al. (2002) observaram diminuição da densidade mineral óssea em 46 meninos com DMD ambulantes tratados com corticoesteróides por longo período. Entretanto, Aparício et al. (2002) também observaram diminuição da densidade mineral óssea de 10 meninos com DMD ambulantes que não foram tratados com corticoesteróides.

Larson e Henderson (2000) observaram diminuição da densidade mineral óssea no fêmur em crianças ambulantes com DMD, assim como Palmieri et al. (1996) notaram esta diminuição analisando toda a massa óssea do corpo, demonstrando correlação direta entre a incidência de fraturas e o conteúdo mineral ósseo, e concluindo que somente a ambulação não é suficiente para proteger a mineralização óssea .

Há vários anos estudos nas áreas de Medicina e Odontologia humana objetivam desenvolver métodos que estimassem a quantidade de material mineral presente nos ossos, sendo de fundamental importância no diagnóstico da osteoporose (BOONEN et al., 1997; HUI et al., 1997).

A densidade mineral óssea pode ser estimada através de métodos invasivos, como a análise de cinzas, espectroscopia atômica, histomorfometria microscopia eletrônica “*back-scatter*” e a microradiografia, e métodos não-invasivos, que são divididos em métodos radiológicos e não-radiológicos (LOUZADA et al., 1998a).

Entre os métodos não-invasivos não-radiológicos destacam-se o ultra-som, e mais atualmente, a ressonância nuclear magnética (LOUZADA et al., 1998), e entre os métodos radiológicos pode-se citar a densitometria radiográfica (VOSE, 1969), fotometria radiográfica (DUBREZ et al., 1992), absorciometria radiográfica (YANG et al.1994), densitometria radiográfica computadorizada (HAYASHI et al., 1996), absorciometria de fótons de dupla energia (DPA) (SWEZEY et al. 1996), absorciometria de fótons de uma energia (SPA) e tomografia computadorizada quantitativa (BOONEN et al., 1997), que possuem elevados custos para sua realização (LOUZADA et al., 1998). A densitometria óptica radiográfica enquadra-se nos métodos não-invasivos radiológicos porém possui um custo significativamente inferior aos demais (LOUZADA et al., 1997; LOUZADA et al., 1998a).

O exame radiográfico simples não é eficiente na detecção de alterações do processo de mineralização óssea inferior a 30% de seu conteúdo (GARTON et al., 1994). A utilização da técnica de densitometria óptica radiográfica é sugerida por Louzada et al. (1998b) para transpor as limitações visuais e a subjetividade da interpretação radiográfica.

Estudos anteriores evidenciam boa correlação entre os métodos de densitometria óptica radiográfica com os métodos de absorção de fótons, que foram os métodos de escolha para a determinação da densidade mineral óssea em humanos durante muito tempo (HAYASHI et al., 1996; SWEZEY et al., 1996; YANG et al., 1994).

Devido ao seu baixo custo e facilidade de execução, alguns autores ainda preconizam a utilização da densitometria radiográfica um exame inicial na determinação da densidade óssea em humanos (HAYASHI et al., 1996; YANG et al., 1994).

A técnica de densitometria óptica radiográfica ressurgiu com maior aceitação graças ao grande desenvolvimento da informática no processamento e análise de imagens (MURAMOTO, 2003; STERMAN, 2001)

Delaquerriere-Richardson et al. (1982) enfatizam que para minimizar a variação dos valores encontrados, a realização da técnica de densitometria óptica radiográfica deve seguir uma rígida padronização. No entanto, Duinkerke et al. (1978) observaram que variações quilovoltagem, tempo de exposição, tempo de processamento e espessura dos tecidos moles circundantes não interferiram nos valores finais obtidos, com exceção de situações onde as radiografias processadas tornaram-se muito escuras.

O uso de técnicas de densitometria óptica radiográfica necessita da presença de uma escala de referência, e o alumínio tem sido utilizado para a sua confecção devido ao seu coeficiente de absorção à radiação X ser similar ao do tecido ósseo (MACK et al. 1959; OWEN, 1956), obtendo resultado em valores equivalentes de alumínio (mmAl) (ALVES, 2004; HAYASHI et al., 1996; LEAL, 2002; MURAMOTO, 2003; PRADO FILHO, 2001; STERMAN, 2001; VULCANO et al., 1997; YANG et al., 1994).

O processo de digitalização das imagens obtidas deve ser rigorosamente padronizado para não interferir nos valores finais obtidos (CHEN; HOLLENDER, 1995).

Barden e Mazess (1988) recomendam que as aferições sejam feitas na diáfise devido a mudança mineral ser menor neste local.

Deve-se realizar mensurações sequenciais do mesmo animal em sua região óssea de interesse para testar a precisão da metodologia utilizada (LEAL, 2002; QUARLES; LYLES, 1992).

Esta técnica pode ser de grande utilidade para avaliação de animais com doenças que promovem osteopenia, como no raquitismo, no hiperparatireoidismo, em disfunções hormonais ou em nefropatias, para o estudo do efeito de determinadas drogas no metabolismo ósseo como no uso crônico de glicocorticóides, e para o acompanhamento da evolução do calo ósseo em fraturas (LEAL, 2002; MURAMOTO, 2003).

Nos últimos anos, alguns trabalhos foram publicados no Brasil com o intuito de avaliar a aplicabilidade e a sensibilidade da técnica da densitometria óptica radiográfica na determinação da equivalência em mmAl de estruturas ósseas.

Louzada et al. (1997) correlacionaram os valores obtidos através da densitometria óptica radiográfica com os valores percentuais de cálcio das cinzas de peças ósseas de frangos, conseguindo correlação linear de 0,999 entre os valores supracitados.

Louzada et al. (1998) estudaram a variação da densidade mineral óssea em peças ósseas de cães através da utilização de protocolos de descalcificação. Concluíram que esta técnica densitométrica demonstrou ser prática, precisa e sensível na avaliação da variação da densidade mineral óssea e que necessita de uma padronização rigorosa, visto que as análises são feitas de forma relativa, com a utilização de uma metodologia própria e uma escala de referência.

Estudos densitométricos são escassos na Medicina Veterinária Brasileira. No entanto, nos últimos anos, estudos utilizando a técnica da densitometria óptica radiográfica foram e estão sendo realizados, alcançando resultados confiáveis, interessantes e satisfatórios.

Leal (2002) obteve valores de densidade mineral óssea em mmAl da região distal da diáfise do rádio direito de cães de várias raças, e Santos (2002) de gatos, em milímetros de alumínio, e correlacionaram estes valores a outras variáveis, como peso corpóreo, idade e sexo. O peso corpóreo obteve uma forte correlação com os valores da densidade mineral óssea.

Com o intuito de se determinar valores normais de densidade mineral óssea de algumas raças caninas, visto a grande diferença de biótipos desta espécie, Muramoto (2003) estudou a raça Poodle e Vulcano et al. (1998) em um estudo piloto e Alves (2004) obtiveram os valores normais de densidade mineral óssea da extremidade distal do rádio da raça Rottweiler.

Alguns estudos foram realizados na espécie equina. Vulcano et al. determinaram os valores normais de densidade mineral óssea do carpo ulnar em potros em crescimento da raça

Quarto de Milha (1997) e do carpo acessório animais da raça Puro Sangue Inglês (P.S.I.) (2000). Prado Filho (2001) determinou os valores normais de densidade mineral óssea do carpo acessório de potros da raça Puro Sangue Inglês em início de treinamento. Sterman (2002) determinou os valores de densidade mineral óssea em eqüinos atletas, de diferentes raças, destinados ao enduro eqüestre.

Rahal et al. (2002) avaliaram o hiperparatireoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens com a técnica de densitometria óptica radiográfica. Esta técnica densitométrica foi eficiente na avaliação da desmineralização óssea, permitindo um diagnóstico anterior ao início dos sinais clínicos e às alterações bioquímicas séricas de cálcio, fósforo e fosfatase alcalina.

A técnica de densitometria óptica radiográfica permite a avaliação da densidade mineral óssea através de imagens radiográficas demonstrou ser técnica de fácil execução, rápida, de baixo custo, precisa, sensível e reprodutível (ALVES, 2004; LEAL, 2002; LOUZADA et al., 1997; LOUZADA et al., 1998; MURAMOTO, 2003; PRADO FILHO, 2001; RAHAL et al., 2002; SANTOS, 2002; STERMAN, 2001; VULCANO et al., 1997; VULCANO, 2001), além de pequeno tempo de execução e não necessidade de procedimentos anestésicos (MURAMOTO, 2003; PRADO FILHO, 2001; RAHAL et al., 2002).

MATERIAL E MÉTODO

4 MATERIAL E MÉTODO

Para a realização deste experimento, os materiais utilizados e as metodologias empregadas foram descritos a seguir.

4.1 ANIMAIS

Foram utilizados 15 cães da raça Golden Retriever, filhos de mães portadoras da GRMD e pais normais, nascidos de três ninhadas ao longo do segundo semestre do ano de 2003. Estes foram divididos em três grupos: cinco cães afetados pela DMGR (Grupo I) (Figuras 1, 2a e 2b), cinco cães portadores da DMGR (Grupo II) e cinco cães normais (Grupo III) onde os animais dos grupos I e II se encontram alojados no canil do Setor de Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e os animais do grupo III, devido a limitações logísticas, foram submetidos a um programa de adoção, no qual devem realizar retornos periódicos, a fim de que possam ser avaliados, vacinados e monitorados.

Estes cães foram divididos em grupos através da análise da enzima creatinina quinase sérica, coletada com um dia de idade, onde animais com valores da enzima considerados normais foram reunidos no grupo III, animais com valores moderadamente elevados foram reunidos no grupo II e animais com valores acentuadamente elevados foram reunidos no grupo I. Posteriormente estes resultados foram confirmados com a extração do DNA do sangue através do processamento pelo GFX Genomic Blood DNA Purification Kit (Amersham Pharmacia) realizada no Centro de Estudos do Genoma Humano, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

Figura 1 - Foto ilustrativa de um cão da raça Golden Retriever afetado pela Distrofia Muscular do Golden Retriever aos cinco meses de idade

Figura 2a e 2b - Fotos ilustrativas de um cão da raça Golden Retriever afetado pela Distrofia Muscular do Golden Retriever aos nove meses de idade

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na realização deste experimento, o período experimental, assim como as atividades realizadas, foram descritos no próximo item.

4.2.1 Tempo de avaliação

Todos estes animais foram pesados e radiografados mensalmente, a partir dos três meses de idade até o fechamento do disco epifisário proximal da tíbia direita com 9 meses de idade.

4.3 MÉTODO

A metodologia empregada na realização da Densitometria Óptica Radiográfica (DOR) foi descrita nos próximos itens.

4.3.1 Equipamentos

Para a realização da técnica de densitometria óptica radiográfica foram utilizados:

- Aparelho de raio X da marca Ray-tec modelo RT 500/125, com ampola Toshiba Rotanode Tm unit model E 7239 X;
- Penetrômetro (escala de referência) confeccionado em liga de alumínio específica (Liga de alumínio 2026, ABNT) com 25 degraus, medindo 1,8 x 0,5 cm,

sendo que o primeiro degrau possui 0,5 mm de altura, aumento 0,5 mm a cada degrau até o vigésimo quinto (Figura 3);

- Chassis de 18 x 24 cm, com écrans intensificadores Kodak Lanex X-Omatic Regular Screens (Kodak Eastman Company) (Figura 3);

- Filme radiológico no tamanho 18 x 24 cm, RP-X-OMAT (Kodak Bras. Com. E Ind. Ltda);

- Equipamentos de proteção radiológica (aventais plumbíferos, protetores de tireóide e óculos plumbíferos);

- Processadora automática, RP-X-OMAT Processor (Kodak Eastman Company);

- Microcomputador Pentium III de 450 MHz, HD de 11 Gb de memória, 128 Mb de memória RAM, Infoway (Itautec®);

- *Scanner* de mesa Hewlett-Packard, modelo Scanjet 6300C;

- Adaptador para transparências Hewlett-Packard, modelo ScanJet XPA;

- Software HP PrecisionScan Pro (Hewlett-Packard®) para a captação da imagem do *scanner*;

- Software ImageLab (Softium® Sistemas de Informática) para a análise das imagens;

- Impressora à jato de tinta Hewlett-Packard, modelo DeskJet 810C;

- Balança digital Filizola , modelo ID-X.

Figura 3 - Foto ilustrativa do penetrômetro posicionado sobre o chassis

4.3.2 Pesagem

O peso dos cães foi obtido em balança digital da marca Filizola, modelo ID-X, com precisão de 100 gramas.

4.3.3 Obtenção das imagens radiográficas

O estudo da densidade mineral óssea foi realizado através de radiografia simples da tíbia direita paralela e simultaneamente a escala de alumínio confeccionada com liga específica e padronizada internacionalmente (Liga de alumínio 2026, ABNT).

Os animais foram radiografados em decúbito lateral direito, em incidência médio-lateral, utilizando-se o aparelho de raio X da marca Ray-tec modelo RT 500/125, com chassis de 18 x 24 cm, com écrans intensificadores Kodak Lanex X-Omatic Regular Screens (Kodak Eastman Company) e filme radiológico no tamanho 18 x 24 cm, RP-X-OMAT (Kodak Bras. Com. E Ind. Ltda) (Figura 4).

Figura 4 - Foto ilustrativa do posicionamento radiográfico para a realização da incidência médio-lateral da tíbia direita do filhote paralela ao penetrômetro

A técnica radiográfica utilizada nos dois primeiros meses de estudo foi de: quilovoltagem de 40 quilovolts (kV), miliamperagem de 100 miliampères (mA), tempo de exposição de 0,025 segundos (s) e distância foco-filme de 100 cm para todos os animais. Em virtude do crescimento dos animais, a partir do terceiro mês de estudo, correspondente ao quinto mês de idade, até o seu término a técnica radiográfica foi ajustada para: quilovoltagem de 44 quilovolts (kV), miliamperagem de 100 miliampères (mA), tempo de exposição de 0,025 segundos (s) e distância foco-filme de 100 cm.

A revelação dos filmes foi feita em processadora automática, RP-X-OMAT Processor (Kodak Eastman Company).

O processo de digitalização da imagem radiográfica foi feito através do *scanner* de mesa Hewlett-Packard, modelo Scanjet 6300C, com adaptador para transparências Hewlett-Packard, modelo ScanJet XPA (Figura 5b).

Figuras 5a e 5b - Fotos ilustrativas do Laboratório de Densitometria onde se observa o microcomputador Pentium III Infoway (Itaotec[®]), o adaptador para transparências Hewlett-Packard, modelo ScanJet XPA e o *scanner* de mesa Hewlett-Packard, modelo Scanjet 6300C

As imagens foram salvas em escala de cinzas no modo bmp (bitmap) pelo software HP PrecisionScan Pro e armazenadas no disco rígido do microcomputador Pentium III de 450 MHz, HD de 11 Gb de memória, 128 Mb de memória RAM, Infoway (Itaotec[®]) (Figura 5a).

4.3.4 Técnica de Densitometria Óptica Radiográfica

As imagens radiográficas, digitalizadas e convertidas em uma escala em tons de cinzas no programa de informática HP PrecisionScan Pro (Hewlett-Packard[®]) (Figuras 6 e 7), foram processadas e analisadas com o auxílio do programa ImageLab (Softium[®], Sistemas de Informática), que compara a densidade média da região do osso selecionada com a densidade média dos degraus da escala de alumínio, determinando a equivalência em milímetros de alumínio da densidade da região selecionada.

Figura 6 - Visualização do programa HP PrecisionScan Pro mostrando a imagem adquirida por este da articulação fêmoro-tíbio-patelar e região médio-proximal da tíbia direita paralela ao penetrômetro

Figura 7 - Visualização do programa HP PrecisionScan Pro mostrando a imagem selecionada para a análise densitométrica, para posterior conversão desta em tons de cinza

Para a análise comparativa entre as diversas radiografias, foi eleita uma imagem padrão e selecionados os 25 degraus da escala de alumínio desta (Figuras 8 e 11). Após isto, filtrou-se (Figura 9) e rotacionou-se (Figura 10) a imagem a ser analisada de modo que a escala de alumínio fique posicionada com os degraus em ordem crescente horizontal sentido direita-esquerda ou vertical sentido inferior-superior para permitir leitura correta da densidade dos degraus pelo programa.

Figura 8 - Visualização do programa ImageLab mostrando a configuração do programa para a seleção de 25 degraus do penetrômetro

Figura 9 - Visualização do programa ImageLab mostrando a seleção do filtro (3) para a adequada leitura das densidades minerais ósseas

Figura10 - Visualização do programa ImageLab mostrando a rotação da imagem para a correta leitura das densidades minerais ósseas

Figura 11 - Visualização do programa ImageLab mostrando a seleção dos 25 degraus da imagem padrão do penetrômetro

As diferenças entre os degraus da escala de alumínio são convertidas em uma curva (padrão) pelo programa de informática (Figura 12). As imagens dos degraus da escala de alumínio de todas as demais imagens radiográficas devem ser selecionadas e também convertidas em curvas. Se estas curvas forem diferentes da curva eleita com padrão deve-se equalizar estas curvas, transformando todo o restante da imagem das radiografias em um mesmo padrão, permitindo que possíveis diferenças nas imagens radiográficas sejam minimizadas (Figura 13).

Figura 12 - Visualização do programa ImageLab mostrando a planilha e o gráfico dos valores de densidade óptica radiográfica dos degraus da imagem padrão do penetrômetro

Figura 13 - Visualização do programa ImageLab mostrando a planilha e o gráfico após a seleção dos degraus do penetrômetro de outra radiografia, onde se observa no gráfico uma curva em vermelho representando os valores de densidade óptica radiográfica dos degraus da imagem padrão e outra curva em azul representando os valores de densidade óptica radiográfica dos degraus de outra radiografia, anterior ao processo de equalização desta nova imagem a imagem estabelecida como padrão

4.3.5 Seleção das regiões analisadas

Neste estudo, três regiões da tíbia foram estudadas: epífise proximal da tíbia (E), metáfise proximal da tíbia (M) e diáfise da tíbia (D). Com o intuito que a densidade mineral óssea fosse a mais fidedigna possível, deve-se padronizar que a área selecionada.

Para demarcar a região epifisária proximal (E) o quadrilátero utilizado foi o trapézio, com sua base maior posicionada proximal ao disco epifisário, contemplando toda a região epifisária (Figuras 14 e 15).

Para demarcar a região metafisária proximal (M) o quadrilátero utilizado foi o trapézio, com sua base maior posicionada distal ao disco epifisário, com largura correspondente a medida entre os bordos , cranial e caudal, da região estudada e altura correspondente a metade da largura (Figuras 14 e 15).

Para demarcar a região diafisária proximal (D) o quadrilátero utilizado foi o retângulo, iniciando-se 3 centímetros distal a região metafisária, com altura correspondente a medida entre os bordos da região estudada e largura correspondente ao dobro da altura (Figuras 14 e 15).

Em todas estas demarcações inclui-se uma pequena extensão de partes moles com o intuito de se subtrair a densidade das partes moles sobrepostas.

Figura 14 - Visualização do programa ImageLab mostrando a confecção de linhas que servirão de guias para a elaboração dos três quadriláteros das regiões a serem analisadas

Figura 15 - Visualização do programa ImageLab mostrando a demarcação dos três quadriláteros correspondentes as regiões epifisária (E), metafisária (M) e diafisária (D)

Com as regiões de interesse demarcadas, foi calculado, através do programa de informática, o valor de densidade óptica em milímetros de alumínio de cada região (Figura16). Para se obter um valor mais fidedigno, a demarcação e cálculo da densidade óptica de cada região foram realizados três vezes, obtendo-se uma média dos valores obtidos nas leituras.

Figura 16 - Visualização do programa ImageLab mostrando a seleção dos três quadriláteros correspondentes as regiões epifisária (E), metafisária (M) e diafisária(D) com a leitura da densidade óptica (DO), à direita, da região metafisária (M)

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para obtenção das estatísticas descritivas para as variáveis de peso e densitometrias minerais ósseas (DMO), utilizou-se o procedimento PROC MEANS do programa *Statistical Analysis System*, versão 8.0 (SAS, 1995). Nas análises que consideraram os efeitos principais de Grupos (normais, portadores e afetados), Idades de mensurações (meses), bem como a interação entre os efeitos principais Grupos e Idades adotou-se o procedimento PROC MIXED do programa supracitado, por meio do seguinte modelo:

$$Y_{ijklm} = \mu + A_{ij} + G_k + D_l + GD_{kl} + e_{ijklm}$$

em que,

Y_{ijkl} = valor para as variáveis de peso e densidades minerais ósseas da região selecionada dos animais pertencentes ao grupo $\underline{k}$, e particulares do mês $\underline{l}$;

μ = constante inerente a todas observações;

A_{ij} = efeito aleatório do animal, com média 0 e variância σ_a^2 ;

G_k = efeito do k -ésimo grupo, sendo $i = 1$ (normais), 2 (portadores) e 3 (afetados);

D_l = efeito do l -ésimo mês de avaliação, sendo $j = 3, 4, \dots, 9$ meses de idade;

GD_{kl} = efeito da interação do grupo $\underline{k}$ com o mês de avaliação $\underline{l}$;

e_{ijklm} = efeito aleatório residual associado às variáveis de peso e densidades minerais ósseas do animal $\underline{ij}$, pertencente ao grupo $\underline{k}$, e particulares do mês $\underline{l}$, com média 0 e variância σ_e^2 .

Quando verificados efeitos significativos ($P < 0,05$) nas interações, procedeu-se o desdobramento do efeito dos grupos dentro dos diferentes meses avaliados.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos foram expostos nos próximos itens deste capítulo.

5.1 ESTATÍSTICA DESCRITIVA DAS ESTIMATIVAS MÉDIAS DAS VARIÁVEIS ANALISADAS

Do terceiro ao nono mês de idade, com frequência mensal, os cães dos três grupos foram pesados, radiografados e submetidos a avaliação densitométrica das regiões epifisária, metafisária e diafisária proximal da tíbia direita por meio da técnica da Densitometria óptica Radiográfica.

A estatística descritiva da distribuição das estimativas médias das variáveis peso corpóreo e densidade mineral óssea das regiões epifisárias, metafisária e diafisária proximais da tíbia direita dos grupos avaliados ao longo do período experimental encontram-se nas tabelas 1, 2 e 3.

Tabela 1 - Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), desvios-padrão (DP), coeficientes de variação (CV), valor mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os valores de densidade mineral óssea das regiões de epífise, metáfise e diáfise proximal da tíbia direita e de peso corpóreo avaliados ao longo do período experimental dos cães do Grupo I (animais afetados pela DMGR), São Paulo – 2003/2004

Variável	Méd.	N	DP	CV (%)	Min.	Máx.
Peso (kg)	11,68	29	6,81	58,33	2,30	25,10
DMO epifisária (mm Al)	4,49	29	1,43	31,91	1,73	7,42
DMO metafisária (mm Al)	3,63	29	1,09	30,14	1,01	5,74
DMO diafisária (mm Al)	3,28	29	1,01	30,87	0,93	4,94

Tabela 2 - Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), desvios-padrão (DP), coeficientes de variação (CV), valor mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os valores de densidade mineral óssea das regiões de epífise, metáfise e diáfise proximal da tíbia direita e de peso corpóreo avaliados ao longo do período experimental dos cães do Grupo II (animais portadores da D.M.G.R.), São Paulo, 2003/2004

Variável	Méd.	N	DP	CV (%)	Min.	Máx.
Peso (kg)	13,14	35	7,98	60,69	1,80	25,30
DMO epifisária (mm Al)	5,29	35	1,92	36,29	1,61	7,99
DMO metafisária (mm Al)	4,39	35	1,66	37,72	1,11	6,61
DMO diafisária (mm Al)	3,79	35	1,45	38,38	0,95	5,92

Tabela 3 - Estimativas de médias (Méd.), número de observações (N), desvios-padrão (DP), coeficientes de variação (CV), valor mínimo (Min.) e máximo (Máx.) para os valores de densidade mineral óssea das regiões de epífise, metáfise e diáfise proximal da tíbia direita e de peso corpóreo avaliados ao longo do período experimental dos cães do Grupo III (animais normais), São Paulo, 2003/2004

Variável	Méd.	N	DP	CV (%)	Min.	Máx.
Peso (kg)	14,33	30	9,37	65,36	1,80	26,20
DMO epifisária (mm Al)	5,83	30	2,23	38,28	2,20	8,93
DMO metafisária (mm Al)	4,58	30	1,76	38,39	1,35	6,89
DMO diafisária (mm Al)	3,96	30	1,51	38,25	1,09	6,01

5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VARIÁVEL PESO CORPÓREO

No resumo dos efeitos de grupo, idade e interação grupo-idade avaliados para o peso corpóreo, verifica-se que a fonte de variação interação grupo-idade foi altamente significativa ($P < 0,01$), indicando a dependência dos grupos avaliados frente as diferentes idades avaliadas, demonstrado na tabela 4.

Tabela 4 - Resumo dos efeitos de grupo (G), idade (I) e da interação grupo-idade (G x I) avaliados para o peso corpóreo por meio do grau de liberdade do numerador (GL) e o Teste F (F), São Paulo, 2003/2004

Efeitos	GL	F
Grupo	2	1,75 n.s.
Idade	6	1.542,05**
G x I	12	45,40**

n.s. = $P > 0,05$ (resultado não significativo); ** = $P < 0,01$ (resultado altamente significativo).

No desdobramento da interação grupo-idade, considerando os grupos dentro de cada idade avaliada verifica-se diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) em relação ao peso corpóreo na interação grupo-idade no sétimo e nono mês de vida, demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 - Desdobramento da interação grupo-idade (GxI), considerando os grupos dentro de cada idade (em meses) avaliados para o peso corpóreo por meio do grau de liberdade do numerador (GL) e o Teste F (F), São Paulo, 2003/2004

Efeitos	GL	F
GxI aos 3 meses	2	3,35 ^{n.s.}
GxI aos 4 meses	2	1,83 ^{n.s.}
GxI aos 5 meses	2	0,23 ^{n.s.}
GxI aos 6 meses	2	2,36 ^{n.s.}
GxI aos 7 meses	2	6,37 *
GxI aos 8 meses	2	3,04 ^{n.s.}
GxI aos 9 meses	2	4,56 *

n.s. = $P > 0,05$ (resultado não significativo); * = $P < 0,05$ (resultado significativo).

Nas estimativas de médias dos grupos avaliados verifica-se que não há diferença estatisticamente significante ($P > 0,05$) destas em relação ao peso corpóreo entre os grupos I e II e entre os grupos II e III, porém observa-se diferença estatisticamente significante ($P < 0,05$) entre os grupos I e III no sétimo, oitavo e nono mês de vida, demonstrado na tabela 6 e no gráfico 1. No entanto, o resultado desta tabela no oitavo mês deve ser desconsiderado em virtude do desdobramento da interação grupo-idade (Tabela 5) não ser estatisticamente significativo para este mês.

Tabela 6 - Estimativas médias do peso corpóreo (em Kg) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade, São Paulo, 2003/2004

Idade (m)	Grupo I (cães afetados DMGR) (Kg)	Grupo II (cães portadores DMGR) (Kg)	Grupo III (cães normais) (Kg)
7	15,59 ^b	19,02 ^{a,b}	22,58 ^a
8	17,17 ^b	20,10 ^{a,b}	22,47 ^a
9	19,14 ^b	22,54 ^{a,b}	24,97 ^a

Médias em uma mesma linha e com letras iguais não diferem entre si ao nível de, pelo menos 5% de probabilidade, pelo teste t.

Gráfico 1 - Representação das estimativas médias do peso corpóreo dos grupos avaliados dentro das idades consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade

5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VARIÁVEL DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DA REGIÃO EPIFISÁRIA PROXIMAL DA TÍBIA

No resumo dos efeitos de grupo, idade e interação grupo-idade para a DMO da região epifisária proximal da tíbia direita verifica-se que a fonte de variação interação grupo-idade foi altamente significativa ($P < 0,01$) para esta região, indicando a dependência dos grupos avaliados frente as diferentes idades avaliadas, demonstrado na tabela 7.

Tabela 7 - Resumo dos efeitos de grupo (G), idade (I) e da interação grupo-idade (G x I) avaliados para a densidade mineral óssea (DMO) da região epifisária proximal do tíbia direita por meio do grau de liberdade do numerador (GL) e o Teste F (F), São Paulo, 2003/2004

Efeitos	GL	F
Grupo	2	5,10 *
Idade	6	283,61**
G x I	12	11,49**

* = $P < 0,05$ (resultado significativo); ** = $P < 0,01$ (resultado altamente significativo).

No desdobramento da interação grupo-idade, considerando os grupos dentro de cada idade avaliada, verifica-se diferença estatisticamente significante ($P < 0,05$) em relação à densidade mineral óssea (DMO) da região epifisária proximal da tíbia direita na interação grupo-idade a partir quinto mês, excetuando-se o oitavo mês, onde não há diferença estatisticamente significante. Esta diferença torna-se altamente significante ($P < 0,01$) no quinto, sétimo e nono mês de idade, demonstrado na tabela 8.

Tabela 8 - Desdobramento da interação grupo-idade (GxI), considerando os grupos dentro de cada idade (em meses) avaliados para a densidade mineral óssea (DMO) da região epifisária proximal da tíbia direita por meio do grau de liberdade do numerador (GL) e o Teste F (F), São Paulo, 2003/2004

Efeitos	GL	F
GxI aos 3 meses	2	0,79 ^{n.s.}
GxI aos 4 meses	2	0,02 ^{n.s.}
GxI aos 5 meses	2	7,09 **
GxI aos 6 meses	2	5,07 *
GxI aos 7 meses	2	9,76 **
GxI aos 8 meses	2	2,75 ^{n.s.}
GxI aos 9 meses	2	19,08 **

n.s. = $P > 0,05$ (resultado não significativo); * = $P < 0,05$ (resultado significativo); ** = $P < 0,01$ (resultado altamente significativo).

Nas estimativas de médias dos grupos avaliados verifica-se que não há diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) das estimativas médias em relação à densidade mineral óssea (DMO) da região epifisária proximal da tíbia direita entre os grupos I e II, no entanto ambos diferem estatisticamente do grupo III no quinto mês de idade.

No sexto mês os valores encontrados do grupo III não diferem estatisticamente dos valores do grupo II ($P > 0,05$), que por sua vez não diferem estatisticamente do grupo I ($P > 0,05$), no entanto há diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre o grupo I e III.

No sétimo mês não há diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os grupos II e III, no entanto ambos diferem estatisticamente do grupo I ($P < 0,05$).

No oitavo mês não há diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) entre os grupos.

No nono mês há diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os três grupos analisados.

As considerações feitas nos últimos cinco parágrafos encontram-se na tabela 9 e no gráfico 2.

Tabela 9 - Estimativas médias da densidade mineral óssea (DMO) da região epifisária proximal da tíbia direita (em mm Al) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade, São Paulo, 2003/2004

Idade (m)	Grupo I (cães afetados DMGR) (mm Al)	Grupo II (cães portadores DMGR) (mm Al)	Grupo III (cães normais) (mm Al)
5	4,14 ^b	4,86 ^b	6,65 ^a
6	4,98 ^b	5,95 ^{a,b}	6,81 ^a
7	5,03 ^b	6,46 ^a	7,22 ^a
8	5,71 ^a	6,97 ^a	6,86 ^a
9	5,82 ^c	7,00 ^b	8,55 ^a

Médias em uma mesma linha e com letras iguais não diferem entre si ao nível de, pelo menos 5% de probabilidade, pelo teste t.

Gráfico 2 - Representação das estimativas médias da densidade mineral óssea (DMO) da região epifisária proximal da tíbia direita (em mm Al) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade

5.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VARIÁVEL DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DA REGIÃO METAFISÁRIA PROXIMAL DA TÍBIA DIREITA

No resumo dos efeitos de grupo, idade e interação grupo-idade avaliados para a densidade mineral óssea da região metafisária proximal da tíbia direita verifica-se que a fonte de variação interação grupo-idade foi altamente significativa ($P < 0,01$) para esta região, indicando a dependência dos grupos avaliados frente as diferentes idades avaliadas, demonstrado na tabela 10.

Tabela 10 - Resumo dos efeitos de grupo (G), idade (I) e da interação grupo-idade (G x I) avaliados para a densidade mineral óssea (DMO) da região metafisária proximal da tíbia direita por meio do grau de liberdade do numerador (GL) e o Teste F (F), São Paulo, 2003/2004

Efeitos	GL	F
Grupo	2	5,16 *
Idade	6	242,57**
G x I	12	26,10**

*= $P < 0,05$ (resultado significativo); **= $P < 0,01$ (resultado altamente significativo).

No desdobramento da interação grupo-idade, considerando os grupos dentro de cada idade avaliada, verifica-se diferença estatisticamente significante ($P < 0,05$) em relação à densidade mineral óssea (DMO) da região metafisária proximal da tíbia direita na interação grupo-idade a partir quinto mês, sendo altamente significante a partir do sétimo mês de idade, demonstrado na tabela 11.

Tabela 11 - Desdobramento da interação grupo-idade (GxI), considerando os grupos dentro de cada idade (em meses) avaliados para a densidade mineral óssea (DMO) da região metafisária proximal da tíbia direita por meio do grau de liberdade do numerador (GL) e o Teste F (F), São Paulo, 2002/2004

Efeitos	GL	F
GxI aos 3 meses	2	0,85 ^{n.s.}
GxI aos 4 meses	2	0,02 ^{n.s.}
GxI aos 5 meses	2	4,44 *
GxI aos 6 meses	2	5,13*
GxI aos 7 meses	2	7,21**
GxI aos 8 meses	2	7,89 **
GxI aos 9 meses	2	26,80 **

n.s. = $P > 0,05$ (resultado não significativo); * = $P < 0,05$ (resultado significativo); ** = $P < 0,01$ (resultado altamente significativo).

Nas estimativas de médias dos grupos avaliados verifica-se que não há diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) das estimativas médias em relação à densidade mineral óssea (DMO) da região metafisária proximal da tíbia direita entre os grupos I e II, no entanto ambos diferem estatisticamente do grupo III no quinto mês de idade.

No sexto e sétimo mês de idade, não há diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) das estimativas médias em relação à densidade mineral óssea (DMO) da região metafisária proximal da tíbia direita entre os grupos II e III, no entanto ambos diferem estatisticamente do grupo I.

A partir do oitavo mês de idade há diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os três grupos analisados.

As considerações feitas nos últimos três parágrafos encontram-se na tabela 12 e no gráfico 3.

Tabela 12 - Estimativas médias da densidade mineral óssea (DMO) da região metafisária proximal da tíbia direita (em mm Al) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade, São Paulo, 2003/2004

Idade (m)	Grupo I (cães afetados DMGR) (mm Al)	Grupo II (cães portadores DMGR) (mm Al)	Grupo III (cães normais) (mm Al)
5	3,73 ^b	4,10 ^b	5,39 ^a
6	3,99 ^b	5,11 ^a	5,41 ^a
7	4,03 ^b	5,35 ^a	5,73 ^a
8	4,67 ^c	6,01 ^b	5,25 ^a
9	4,18 ^c	5,61 ^b	6,52 ^a

Médias em uma mesma linha e com letras iguais não diferem entre si ao nível de, pelo menos 5% de probabilidade, pelo teste t.

Gráfico 3 - Representação das estimativas médias da densidade mineral óssea (DMO) da região metafisária proximal da tíbia direita (em mmAl) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade

5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DA VARIÁVEL DENSIDADE MINERAL ÓSSEA DA REGIÃO DIAFISÁRIA PROXIMAL DA TÍBIA DIREITA

No resumo dos efeitos de grupo, idade e interação grupo-idade avaliados para a densidade mineral óssea da região diafisária proximal da tíbia direita verifica-se que a fonte de variação interação grupo-idade foi altamente significativa ($P < 0,01$) para esta região, indicando a dependência dos grupos avaliados frente as diferentes idades avaliadas, demonstrado na tabela 13.

Tabela 13 - Resumo dos efeitos de grupo (G), idade (I) e da interação grupo-idade (G x I) avaliados para a densidade mineral óssea (DMO) da região diafisária proximal da tíbia direita por meio do grau de liberdade do numerador (GL) e o Teste F (F), São Paulo, 2003/2004

Efeitos	GL	F
Grupo	2	2,76 ^{n.s.}
Idade	6	1.617,85**
G x I	12	32,88**

n.s. = $P > 0,05$ (resultado não significativo); ** = $P < 0,01$ (resultado altamente significativo).

No desdobramento da interação grupo-idade, considerando os grupos dentro de cada idade avaliada, verifica-se diferença estatisticamente significante ($P < 0,05$) em relação à densidade mineral óssea (DMO) da região diafisária proximal da tíbia direita na interação grupo-idade a partir sétimo mês, sendo altamente significante no nono mês de idade, demonstrado na tabela 14.

Tabela 14 - Desdobramento da interação grupo-idade (GxI), considerando os grupos dentro de cada idade (em meses) avaliados para a densidade mineral óssea (DMO) da região diafisária proximal da tíbia direita por meio do grau de liberdade do numerador (GL) e o Teste F (F), São Paulo, 2003/2004

Efeitos	GL	F
GxI aos 3 meses	2	2,06 ^{n.s.}
GxI aos 4 meses	2	0,07 ^{n.s.}
GxI aos 5 meses	2	3,71 ^{n.s.}
GxI aos 6 meses	2	1,77 ^{n.s.}
GxI aos 7 meses	2	7,60 *
GxI aos 8 meses	2	6,25 *
GxI aos 9 meses	2	10,29 **

n.s. = $P > 0,05$ (resultado não significativo); * = $P < 0,05$ (resultado significativo); ** = $P < 0,01$ (resultado altamente significativo).

Nas estimativas de médias dos grupos avaliados verifica-se que não há diferença estatisticamente significativa ($P > 0,05$) das estimativas médias em relação à densidade mineral óssea (DMO) da região diafisária proximal da tíbia direita entre os grupos II e III, no entanto, ambos diferem estatisticamente do grupo I no sétimo, oitavo e nono mês de idade, demonstrado na tabela 15 e no gráfico 4.

Tabela 15 - Estimativas médias da densidade mineral óssea (DMO) da região diafisária proximal da tíbia direita (em mmAl) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade, São Paulo, 2003/2004

Idade (m)	Grupo I (cães afetados DMGR) (mm Al)	Grupo II (cães portadores DMGR) (mm Al)	Grupo III (cães normais) (mm Al)
7	3,81 ^b	4,69 ^a	4,88 ^a
8	4,30 ^b	5,24 ^a	5,01 ^a
9	4,47 ^b	5,25 ^a	5,70 ^a

Médias em uma mesma linha e com letras iguais não diferem entre si ao nível de, pelo menos 5% de probabilidade, pelo teste t.

Gráfico 4 - Representação das estimativas médias da densidade mineral óssea (DMO) da região diafisária proximal da tíbia direita (em mm Al) dos grupos avaliados dentro das idades (em meses) consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A realização do exame radiográfico mensal dos cães, com posicionamento radiográfico convencional para radiografia médio-lateral de tíbia direita, paralelamente ao penetrômetro, não necessitou contenção química em nenhum dos exames realizados, valendo-se apenas da contenção física, como apresentado por outros autores (MURAMOTO, 2003; PRADO FILHO, 2001; RAHAL et al., 2002).

O processamento das imagens, a possibilidade de equalização dos tons de cinzas do penetrômetro da radiografia a ser analisada com a radiografia do penetrômetro escolhido como padrão, a delimitação precisa da região escolhida, e a verificação de valores muito próximos nas três medidas de cada região permitem concluir que a técnica da Densitometria Óptica Radiográfica mostrou ser de fácil execução, rápida, de baixo custo, precisa, sensível, confiável e reprodutível, como afirmam outros autores que utilizaram o mesmo programa computacional ImageLab (ALVES, 2004; MURAMOTO, 2003; PRADO FILHO, 2001; STERMAN, 2001) e outros que utilizaram a mesma técnica densitométrica com outros programas de processamento de imagens (LEAL, 2002; LOUZADA et al., 1997; LOUZADA et al., 1998; RAHAL et al., 2002; SANTOS, 2002; VULCANO et al., 1997; VULCANO, 2001), viabilizando sua realização na Medicina Veterinária..

Os fatores que levaram a escolha da tíbia para a análise da densidade mineral óssea neste estudo, são: localização anatômica, possuir poucos tecidos moles ao seu redor e ao processo degenerativo desta doença, já que o enrijecimento e atrofia muscular dos membros pélvicos são freqüentemente observados nos cães afetados pela Distrofia Muscular do Golden Retriever, como citados por alguns autores (BERGMAN et al., 2002; KORNEGAY et al., 1988; KORNEGAY et al., 1994b; VALENTINE et al., 1986) e constatado na evolução da sintomatologia dos animais deste estudo.

Com o intuito de diminuir o número de interferências na obtenção de valores confiáveis, como recomendado por Chen e Hollender (1995) e Delaquerriere-Richardson et al. (1982), a realização da técnica de densitometria óptica radiográfica seguiu rígida padronização e, relação ao posicionamento, técnica radiográfica, revelação dos filmes, digitalização da imagem e análise densitométrica através do programa ImageLab.

A única alteração realizada no período experimental foi o aumento da quilovoltagem de 40 para 44 kV no terceiro mês de experimento (quinto mês de idade dos cães), que se manteve até o término deste, devido ao grande incremento na espessura dos membros destes animais em crescimento. Esta alteração se alicerça nas observações de Duinkerke et al. (1978) que afirmam que variações quilovoltagem, tempo de exposição, tempo de processamento e espessura dos tecidos moles circundantes não interfeririam nos valores finais obtidos e, também, ao processo de equalização dos tons de cinza, fornecido pelo programa ImageLab, no qual as imagens radiográficas a serem analisadas são equalizadas com a imagem padrão do penetrômetro anteriormente estabelecida.

Embora Barden e Mazess (1988) recomendem que as leituras sejam feitas na região diafisária, devido a menor mudança mineral, optou-se realizar leituras densitométricas nas regiões epifisária, metafisária e diafisária proximais de tíbia a fim de acompanhar a evolução e comportamento do processo de mineralização óssea ao longo do período de crescimento dos três grupos avaliados.

Nos três grupos avaliados, os valores médios de densidade mineral óssea (em mmAl) na região epifisária foram mais elevados, seguidos pela região metafisária e diafisária, respectivamente (Tabelas 1, 2 e 3). Este fato pode ser explicado segundo observações de Junqueira e Carneiro (1990), de que a epífise é constituída por osso esponjoso com uma delgada camada superficial de osso compacto já organizada em forma lamelar (ou secundária), sendo esta mais densa que a metáfise de um animal em crescimento, que possui,

predominantemente tecido ósseo imaturo (ou primário) no qual há uma menor mineralização. Embora composta quase que totalmente por osso compacto, delimitando o canal medular, a diáfise possui menor densidade mineral óssea em relação às outras porções ósseas. Isto ocorre porque quando se seleciona esta região, o programa calcula a média dos tons de cinzas na área selecionada para elaboração do valor densitométrico final incluindo o canal medular que possui menor radiopacidade.

Em virtude da diminuição dos movimentos imposta pela degeneração muscular gerada pela distrofia, a hipótese do presente estudo em determinar se há diferenças na mineralização óssea de cães ambulantes dos grupos de animais normais, portadores e afetados pela DMGR em fase de crescimento fundamenta-se por meio das conclusões obtidas por Whalen e Carter (1988), que o nível de atividade e exercícios são, principalmente para pessoas saudáveis e jovens, fatores predominantes na regulação da densidade mineral óssea, e assim como Slemenda et al. (1991), que sugerem que importante aumento da densidade óssea pode ser resultado da realização de atividades físicas durante a infância.

De forma geral houve um incremento mensal da densidade mineral óssea das três regiões estudadas dos cães afetados pela DMGR, com exceção do valor das estimativas médias da região metafisária do nono mês de idade, a qual diminuiu seu valor em relação à leitura do mês anterior.

Estes dados são parcialmente discordantes em relação a alguns autores, que estudaram o comportamento da DMO em humanos afetados pela distrofia análoga do cão (APARÍCIO et al., 2002; BIANCHI et al., 2003; CHABOT et al., 2002; LARSON; HENDERSON, 2000; PALMIERI et al., 1996), que observaram diminuição da DMO destas crianças, sendo ambulantes ou não, concluindo que somente a ambulação não é suficiente para proteger a mineralização óssea.

Embora esta comparação interespecie possa não ser muito adequada, esta diferença pode ser explicada pelo curto período de experimento deste estudo, contemplando a maior parte da fase de crescimento dos cães, com medidas com curto intervalo de tempo (mensal), com o aumento gradual da DMO. A diminuição da DMO da região metafisária no nono mês pode ser explicada por meio da superposição de alguma alteração secundária a degeneração muscular progressiva, como alterações respiratórias, de deglutição, ou até mesmo outra alteração independente desta, que promova dificuldade no ganho de peso mensal na fase de crescimento, fazendo com que o cão acometido tenha dificuldade ou ainda, um sinal de que haveria uma diminuição da DMO destes animais, semelhantes aos humanos, a qual se manifestou primeiramente na região metafisária, zona de maior atividade metabólica do osso em crescimento. Para a confirmação desta hipótese há necessidade de realização do exame densitométrico por um maior período experimental.

Observou-se valores estatisticamente significantes ($P < 0,05$) de peso corpóreo dos grupos avaliados dentro das idades na diferenciação do grupo dos cães afetados pela DMGR dos demais a partir do sétimo mês de idade. Não se observou diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) que possibilite diferenciar os três grupos avaliados até o término do período experimental (Tabela 6). Este fato pode ser explicado devido ao progresso do processo degenerativo desta doença, promovendo, entre outras, grandes alterações locomotoras, respiratórias e na deglutição, dificultando o ganho normal de peso na fase de crescimento dos cães afetados pela DMGR.

Observou-se valores estatisticamente significantes ($P < 0,05$) de DMO da região epifisária proximal da tíbia direita do grupo dos cães normais dentro das idades na diferenciação dos grupos no quinto mês de idade, e a partir do sétimo mês diferencia-se o grupo dos animais afetados pela DMGR dos demais. No nono mês observou-se diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$) entre os três grupos avaliados. Os valores de DMO não

se mostraram estatisticamente significantes ($P>0,05$) no oitavo mês de idade, graças ao déficit no ganho de peso neste mês de um animal do grupo dos cães normais, em qual foi relatado hiporexia ,devido à mudança de ração, e a menarca apresentada neste mês, tendo obtido um ganho de peso compensatório no mês seguinte (Tabela 9).

Observou-se valores estatisticamente significantes ($P<0,05$) de DMO da região metafisária proximal da tíbia direita do grupo dos cães normais dentro das idades na diferenciação dos grupos no quinto mês de idade, e a partir do sexto mês diferencia-se o grupo dos animais afetados pela DMGR dos demais. A partir do oitavo mês observou-se diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$) entre os três grupos avaliados. Nesta região analisada, não se observou alteração no oitavo mês de estudo provavelmente por ser uma região de alto metabolismo do osso em crescimento, consegue manter sua atividade regular por um maior intervalo de tempo quando submetida a alguma alteração no ganho de peso corpóreo (Tabela 12).

Observou-se valores estatisticamente significantes ($P<0,05$) de DMO da região diafisária proximal da tíbia direita dos grupos avaliados dentro das idades na diferenciação dos grupos a partir do sétimo mês de idade, sendo que a partir deste mesmo mês diferencia-se o grupo dos animais afetados pela DMGR. Não se observou diferença estatisticamente significativa ($P<0,05$) entre os três grupos avaliados até o término do período experimental, que pode ser explicado por meio das observações de Barden e Mazess (1988) que verificaram menores alterações minerais na região diafisária (Tabela 15).

Com base nos dados descritos nos três últimos parágrafos, pode-se evidenciar que a diferenciação do grupo dos cães normais, por meio de valores estatisticamente significantes, foi inicialmente observada nas regiões epifisária e metafisária proximais da tíbia aos cinco meses de idade. Estes dados demonstram que diferenciação dos valores densitométricos dos cães afetados e portadores da DMGR é tardia em relação diferenciação dos cães normais. No

entanto, este fato ocorreu somente no quinto mês de estudo, sendo assim muito discutível sua relevância clínica.

A região diafisária proximal da tíbia demonstrou ser a região que possui maior correlação com o peso corpóreo por apresentar valores das estimativas médias dos grupos dentro das idades consideradas significativas para o desdobramento da interação grupo-idade com comportamento semelhante ao longo do período experimental, como demonstram as tabelas 6 e 15 e os gráficos 1 e 4.

O dado citado no parágrafo anterior e a impossibilidade de diferenciação entre os três grupos por meio dos valores obtidos na região diafisária proximal da tíbia podem ser explicados com a afirmação de Barden e Mazess (1988) de que a diáfise é a região de menor variação mineral. Sendo assim, especula-se que a diferenciação entre os três grupos, que foi observada nas outras regiões analisadas, possa ser demonstrada com uma idade mais avançada, não contemplada no período experimental deste estudo.

Por meio destes dados, observou-se que o peso corpóreo possui grande correlação com os valores da DMO nas diferentes regiões ósseas analisadas, em concordância com outros autores (ALVES, 2004; LEAL, 2002; MURAMOTO, 2003; SANTOS, 2002).

Observou-se correlação estatística altamente significativa ($P < 0,01$) da interação grupo-idade com a DMO das regiões avaliadas, impossibilitando, neste estudo, uma correlação somente entre a idade e DMO, como feita por Muramoto (2003), que demonstrou baixa correlação entre estas.

A região metafisária demonstrou ser a região de escolha para a realização das leituras da DMO por possibilitar a diferenciação do grupo dos animais afetados, a partir do quinto mês de idade, e a diferenciação entre os três grupos avaliados por valores estatisticamente significantes ($P < 0,05$) mais cedo que as outras regiões analisadas. Além disso, esta região não

sofreu alterações estatisticamente significantes de seus valores no oitavo mês de idade, demonstrando ter uma menor correlação e interferência de variações do peso corpóreo.

O potencial de diagnóstico desta técnica densitométrica em relação a DMGR foi considerado baixo, pois diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram observadas somente nos meses finais do período experimental, quando os sinais clínicos do processo degenerativo desta doença encontram-se evidentes.

Por outro lado a avaliação densitométrica por meio da DOR, utilizada de forma longitudinal, demonstrou ter grande potencial no acompanhamento da progressão da DMGR por apresentar alta sensibilidade para detecção de variações na densidade mineral óssea, sendo uma exame complementar útil para a avaliação do prognóstico desta doença.

CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Este estudo permitiu concluir que:

- A escolha do terço proximal da tíbia mostrou ser de fácil acesso radiográfico e produziu valores confiáveis na avaliação da densidade mineral óssea (DMO).
- A região epifisária possui maior densidade mineral óssea, seguida pela região metafisária e diafisária, respectivamente, ao longo do período experimental nos três grupos avaliados.
- Os valores da densidade mineral óssea (DMO) das três regiões avaliadas, observando-se pequenas diferenças de correlação, seguiram o comportamento do peso corpóreo ao longo do período experimental.
- A região diafisária proximal da tíbia demonstrou ser a região estudada com maior correlação com o peso corpóreo.
- A região metafisária proximal de tíbia demonstrou ser a região de eleição para a leitura da densidade mineral óssea (DMO) por ser o local estudado com menor correlação com o peso corpóreo e por promover estimativas médias consideradas significativas entre grupos avaliados mais cedo que nas demais regiões.
- O potencial de diagnóstico do exame densitométrico, em relação a DMGR, foi considerado baixo, entretanto demonstrou ter grande potencial no acompanhamento do

progresso desta doença por apresentar alta sensibilidade para detecção de variações na densidade mineral óssea.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ALVES, J. D. S. **Estudo da densidade mineral óssea na extremidade distal do rádio de cães da raça Rottweiler, por meio da densitometria óptica radiográfica**, 2004. 70 f. Dissertação (Mestrado em Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.
- AMANN, J. F. Congenital and acquired neuromuscular diseases of young dogs and cats. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 17, n. 3, p. 617-637, 1987.
- APARÍCIO, L. F.; JURKOVIC, M.; DEJULLO, J. Decrease bone density in ambulatory patients with Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Pediatric Orthopaedics**, v. 22, n. 2, p. 179-181, 2002.
- BARDEN, H. S.; MAZESS, R. B. Bone densitometry in infants. **Journal of Pediatrics**, v. 113, n. 1, p. 172-177, 1988.
- BERGMAN, R. L.; INZANA, K. D.; MONROE, W. E.; SHELL, L. G.; LIU, L. A.; ENGVALL, E.; SHELTON, G. D.; Dystrophin-deficient muscular dystrophy in a labrador retriever. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 38, p. 255-261, 2002.
- BIANCHI, M. L.; MAZZANTI, A.; GALBIATI, E.; SARAIFOGER, S.; DUBINI, A.; CORNELIO, F.; MORANDI, L. Bone mineral density and bone metabolism in Duchenne muscular dystrophy. **Osteoporos International**, v. 14, p. 761-767, 2003.
- BOONEN, S.; CHENG, X.; NICHOLSON, P. H. F.; VERBEKE, G.; BROOS, P.; DEQUERER, J. The accuracy of peripheral skeletal assessment at radius in estimating femoral bone density as measured by dual-energy X-ray absorptiometry: a comparative study of single-photon and computed tomography. **Journal of Internal Medicine**, v. 242, p. 323-328, 1997.
- CHABOT, G.; ALOS, N.; BROUSSEAU, Y.; DUBÉ, J.; DELVIN, E.; FILIATREULT, M.; VANASSE, M. Osteoporosis and fractures in children with Duchenne muscular dystrophy treated with glucocorticoids. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 17, p. S213, 2002.
- CHEN, S. K.; HOLLENDER, L. Digitalizing of radiographs with a flatbed scanner. **Journal of Dentistry**, v. 23, p. 205-208, 1995.
- COOPER, B. J.; WINAND, N. J.; STEDMAN, H. The homologue of the Duchenne locus in defective in X-linked muscular dystrophy in dogs. **Nature**, v. 334, p. 154-156, 1988.
- DELAQUERRIERE-RICHARDSON, L.; ANDERSON, C.; JORCH, U. M.; COOK, M. Radiographic morphometric and radiographic photodensitometry of the femur in the Beagle at 13 and 21 months. **American Journal of Veterinary Research**, v. 43, p. 2255-2258, 1982.

DUBREZ, B.; JACOT-DESCOMBESA J.; PUN, T.; CIMASONI, G. Comparison of photodesitometric with high-resolution digital analysis of bone density from serial dental radiographs. **Dentomaxillofacial Radiology**, v. 21, p. 40-44, 1992.

DUINKERKE, A. S. H.; VAN DE POEL, A. C. M.; VAN DER LINDEN, F. P. G. M.; DOESBURG, W. H.; LEMMENS, W. A. J. G. Compensation of differences in density of radiographs by densitometry. **Oral Surgery**, v. 45, n. 4, p. 637-642, 1978.

FLETCHER, S.; CARVILLE, K. S.; HOWELL, J. M.; MANN, C. J.; WILTON, S.D. Evaluation of a short interspersed nucleotide element in the 3' untranslated region of the defective dystrophin gene of dogs with muscular dystrophy. **American Journal of Veterinary Research**, v. 62, n. 12, p. 1964-1968, 2001.

GARTON, M. J.; ROBERTSON, E. M.; GILBERT, F. J.; GOMERSSAL, L.; REID, D. M. Can radiologist detect osteopenia on plain radiographs ?. **Clinical Radiology**, v. 49, p. 118-122, 1994.

GOROSPE, J. R.; THARP, M. D.; HINCKLEY, J.; KORNEGAY, J. N.; HOFFMAN, E. P. A role for mast cells in the progression of Duchenne muscular dystrophy? Correlations in dystrophin-deficient humans, dogs, and mice. **Journal of Neurological Science**, v. 122, n. 1, p. 44-56, 1994.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1997. p. 895-910.

HAYASHI, T.; SATOH, H.; SOGA, T.; TANAKA, D.; ITABASHI, K.; OKUYAMA, K. Evaluation of bone density in newborn infants by computed X-ray densitometry. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 23, p. 130-134, 1996.

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

HUI, S. L.; GAO, S.; ZHOU, X.; JOHNSTON JR., C. C.; LU, Y.; GLUER, C. C.; GRAMP, S.; GENANT, H. Universal standardization of bone density measurements: a method with optimal properties for calibration among several instruments. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 12, n. 9, p. 1463-1470, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido ósseo. In: JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1990. p. 101-119.

KORNEGAY, J. N.; TULER, S. M.; MILLER, D. M.; LEVESQUE, D. C. Muscular dystrophy in a litter of golden retriever dogs. **Muscle Nerve**, v. 11, n. 10, p. 1056-1064, 1988.

KORNEGAY, J. N.; SHARP, N. J. H.; BARTLETT, R. J.; VAN CAMP, S. D.; BURT, C. T.; HUNG, W. Y.; KWOCK, L.; ROSES, A. D. Golden retriever muscular dystrophy: monitoring for success. In: GRIGGS, R. C.; KARPATI, G. **Myoblast Transfer Therapy**. 1. ed. New York: Plenum, 1990. p. 267-272.

KORNEGAY, J. N.; SHARP, N. J. H.; BOGAN, D. J.; VAN CAMP, S. D.; METCALF, J. R.; SCHUELER, R. O. Contraction tension and kinetics of peroneus longus muscle in golden retriever muscular dystrophy. **Journal of Neurological Sciences**, v. 123, p. 100-107, 1994a.

KORNEGAY, J. N.; SHARP, N. J. H.; SCHUELER, R. O.; BETTS, C. W. Tarsal joint contracture in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Laboratory Animal Science**, v. 44, n. 4, p. 331-333, 1994b.

KORNEGAY, J. N.; CUNDIFF, D. D.; BOGAN, D. J.; BOGAN, J. R.; OKAMURA, C.S. The cranial sartorius muscle undergoes true hypertrophy in dogs with golden retriever muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, p. 493-500, 2003.

LARSON, C. M.; HENDERSON, R. C. Bone mineral density and fractures in boys with Duchenne muscular dystrophy. **Journal of Pediatric Orthopaedics**, v. 20, n. 1, p. 71-74, 2000.

LEAL, A. C. R. **Determinação dos valores normais da densidade mineral óssea (DMO) da extremidade distal do rádio em cães por meio da técnica de densitometria óptica radiográfica em imagens radiográficas: correlação entre o peso, sexo e idade.** 2002. 43 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

LOUZADA, M. J. Q.; PELÁ, C. A.; BELANGERO, W. D.; SANTOS-PINTO, R. Densidade de peças ósseas de frangos. Estudo pela densitometria óptica radiográfica. **Veterinária e Zootecnia**, v. 9, p. 95-109, 1997.

LOUZADA, M. J. Q.; PELÁ, C. A.; BELANGERO, W. D.; SANTOS-PINTO, R. Avaliações de densidade óssea em imagens radiográficas: estudo em peças ósseas de cães. **RBE – Caderno de Engenharia Biomédica**, v. 14, n. 1, p. 47-64, 1998a.

LOUZADA, M. J. Q.; PELÁ, C.A.; BELANGERO, W. D.; SANTOS-PINTO, R. Metodologia para a avaliação de densidade em imagem radiográfica. **RBE – Caderno de Engenharia Biomédica**, v. 14, n. 2, p. 37-47, 1998b.

MACK, P. B.; VOSE, G. P.; NELSON, J. D. New development in equipment for the roentgenographic measurement of bone density. **American Journal of Roentnology**, v. 82, n. 2, p. 303-310, 1959.

MURAMOTO, C. **Estabelecimento de valores de densidade mineral óssea (DMO) das regiões diafisárias do rádio em cães da raça Poodle por meio da densitometria óptica radiográfica.** 2003. 125 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

OWEN, M. Measurements of the variations in calcification in normal rabbit bone. **Journal of Bone Joint Surgery**, v. 388, n. 3, p. 762-769, 1956.

PALMIERI, G.; BERTORINI, T. E.; GRIFFIN, J. W.; IGARASHI, M.; KARAS, J. G. Assessment of whole body composition with dual energy X-ray absorptiometry in Duchenne muscular dystrophy: correlation of lean body mass with muscle function. **Muscle Nerve**, v. 19, p. 777-779, 1996.

PRADO FILHO, J. R. C. **Avaliação da densidade mineral óssea em potros da raça Puro Sangue Inglês em início de treinamento**. 2001. 43 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

QUARLES, L. D.; LYLES, K. W. Spinal and femoral bone density in the Beagle: use of dual energy X-ray absorptiometry to assess experimental osseous disorders. **Hological Technical Paper**, p. 1-4, 1992.

RAHAL, S. C.; MORTARI, A. C.; CAPORALI, E. H. G.; VULCANO, L. C.; SANTOS, F. A. M.; TAKAHIRA, R. K.; CROCCI, A. J. Densitometria óptica radiográfica na avaliação do hiperparateoidismo secundário nutricional induzido em gatos jovens. **Ciência Rural**, v. 32, n. 3, p. 421-425, 2002.

SANTOS, F. A. M. **Determinação dos valores normais da densidade mineral óssea (DMO) da extremidade distal do rádio-ulna em gatos, por meio da técnica de densitometria óptica radiográfica em imagens radiográficas: correlação entre o peso, sexo e idade**. 2002. 49 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

SAS. **User's guide: basic and statistic**. Cary, 1995. 1.686 p.

SCHATZBERG, S. J.; ANDERSON, L. V. B.; WILTON, S. D.; KORNEGAY, J. N.; MANN, C. J.; SOLOMON, G.; SHARP, N. J. H. Alternative dystrophin gene transcripts in Golden Retriever Muscular Dystrophy. **Muscle Nerve**, v. 21, p. 991-998, 1998.

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 of Veterinary Internal Medicine**, v. 15, p. 240-244, 2001.

SLEMENDA, C. W.; MILLER, J. Z.; HUI, S. L.; REISTER, T. K.; JOHNSTON JR., C. C. Role of physical activity in development of skeletal mass in children. **Journal of Bone Mineral Research**, v. 6, n. 11, p. 1227-1233, 1991.

STERMAN, F. A. **Avaliação da densidade mineral óssea em eqüinos atletas destinados ao enduro eqüestre**. 47 f. 2002. Tese (Livre Docência) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2002.

SWEZEY, R. L.; DRAPER, D.; SWEZEY, A. M. Bone densitometry: comparison of dual energy X-ray absorptiometry to radiographic absorptiometry. **The Journal of Rheumatology**, v. 23, p. 1734-1738, 1996.

TALBOTT, S. M.; CIFUENTES, M.; DUNN, M. G.; SHAPSES, S. A. Energy restriction reduces bone density and biomechanical properties in aged females rats. **Journal of Nutrition**, v. 128, p. 2382-2387, 2001.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; CUMMINGS, J. F.; DELAHUNTA, A. Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months. **Acta Neuropathology**, v. 71, p. 301-310, 1986.

VALENTINE, B. A.; COOPER, B. J.; DELAHUNTA, A.; O'QUINN, R.; BLUE, J. T. Canine X-linked muscular dystrophy. An animal model of Duchenne muscular dystrophy: clinical studies. **Journal of Neurological Sciences**, v. 88, n. 3, p. 69-81, 1988.

VOSE, G. P. Estimation of changes in bone calcium content by radiographic densitometry. **Radiology**, v. 93, p. 841-844, 1969.

VULCANO, L. C.; CIARLINI, L. D. R. P.; LOUZADA, M. J. Q.; CALDAS, E. L. C.; Valores normais da densidade óssea do carpo ulnar em potros em crescimento da raça Quarto de Milha através da densitometria óptica radiográfica. **A Hora Veterinária**, v. 17, n. 100, p. 52-54, 1997.

VULCANO, L. C.; LEAL, A. C. R.; LOUZADA, M. J. Q.; MUNIZ, L. M. R.; MAMPRIM, M. J. Determination of normal values of density of the radius in Rottweilers, using radiographic optical densitometry (an experimental study). In: CONGRESS OF THE WORLD SMALL ANIMAL VETERINARY ASSOCIATION, 23., 1998, Buenos Aires. **Anais...** Buenos Aires: WSAVA, 1998. p. 767.

VULCANO, L. C.; SANTOS, F. A. M.; MUNIZ, L. M. R.; MAMPRIM, M. J. Determinación de los valores normales de la densidad mineral ósea del carpo accesorio de equinos de la raza Puro Sangre Inglés (P.S.I.) por medio de la densitometria óptica em imagen radiográfica. **Imagen Veterinaria**, v. 3, n. 6, p. 237-240, 2000.

WHALEN, R. T.; CARTER, D. R. Influence of physical activity on regulation of bone density. **Journal of Biomechanics**, v. 21, n. 10, p. 825-837, 1988.

YANG, S.; HARIWARG, S.; ENGELKE, K.; DHILLON, M. S.; GUGLIELMI, G.; BENDAVID, E. J.; SOEJIMA, O.; NELSON, D. L.; GENANT, H. K. Radiographic absorptiometry for bone mineral measurements of the phalanges: precision and accuracy study. **Radiology**, v. 192, p. 857-859, 1994.

ZATZ, M.; RAPAPORT, D.; VAINZOF, M.; ROCHA, J. M.; PAVANELLO, R. C.; COLLETO, G. M.; PERES, C. A. Relation between height and clinical course in Duchenne Muscular Dystrophy. **American Journal of Medical Genetics**, v. 29, n. 2, p. 405-410, 1988.