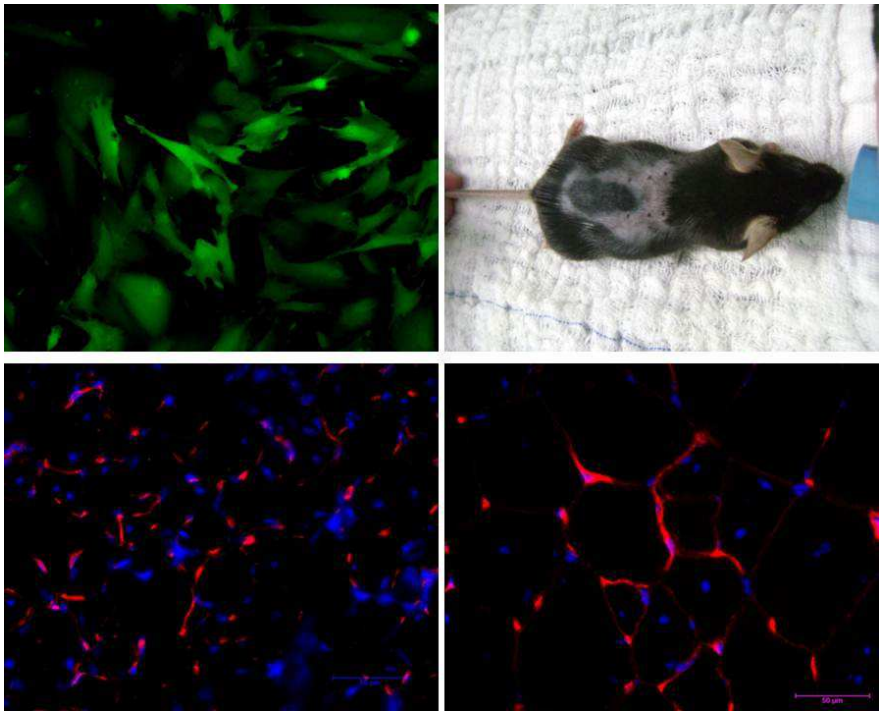
GREYSON VITOR ZANATTA ESPER

Terapia celular sob aquapuntura em modelos murinos para distrofia muscular de Duchenne



São Paulo

2012

GREYSON VITOR ZANATTA ESPER

Terapia celular sob aquapuntura em modelos murinos para distrofia muscular de Duchenne

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

Departamento:
Cirurgia

Área de concentração:
Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres

Orientadora:
Profa. Dra. Maria Angelica Miglino

Co-orientadora:
Profa. Dra. Angela Maria Florencio Tabosa

São Paulo

2012

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
22/11/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2712
FMVZ

Esper, Greyson Vitor Zanatta
Terapia celular sob aquapuntura em modelos murinos para distrofia muscular de Duchenne / Greyson Vitor Zanatta Esper. -- 2012.
85 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Cirurgia, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Anatomia dos Animais Domésticos e Silvestres.

Orientador: Profa. Dra. Maria Angelica Miglino.
Co-orientador: Profa. Dra. Angela Maria Florencio Tabosa.

1. *mdx*. 2. Acupuntura. 3. Distrofina. 4. Células-tronco. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Terapia celular sob aquapuntura em modelos murinos para distrofia muscular", protocolado sob o nº 2431/2011, utilizando 28 (vinte e oito) camundongos, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/10/2011.

We certify that the Research "Cellular therapy under aquapuncture in murine models for Duchenne", protocol number 2431/2011, utilizing 28 (twenty eight) mice, under the responsibility Profa. Dra. Maria Angélica Miglino, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/26/2011.

São Paulo, 10 de abril de 2012.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP - Brasil

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
E-mail: ftiver@usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: ESPER, Greyson Vitor Zanatta
Título: Terapia celular sob aquapuntura em modelos murinos para distrofia muscular de Duchenne

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Prof. Dr. _____

Instituição:_____ Julgamento:_____

Dedico...

Luiz Gilson Esper e Regina Maria Zanatta,

Pai e Mãe,

Pelos ensinamentos e amor incondicional que fizeram uma grande diferença na minha vida, pois refletiu na minha formação como filho e agora como pai dos meus filhos. Por me apoiarem em todos os momentos difíceis e assim me orientar no caminho correto.

Heloisa Godoi Bertagnon,

Minha esposa e companheira,

Pela amizade que me estimulou nas horas difíceis e nas atitudes para não me esmorecer; pela mulher forte e decidida; pela mãe da minha filha, educadora e amorosa; pela esposa que doa o amor sem cobranças.

Maria Sol L. Esper e Gabriela M.Bertagnon Esper,

Minhas amadas filhas,

Que são as princesinhas do papai, digo isso pois não passo um só dia sem pensar no amor, no carinho que sinto por elas.

Gilson Paulo Zanatta Esper, Robson Luiz Zanatta Esper, Gilsianne Regina Zanatta Esper,

Meus irmãos,

Pelos ensinamentos, conselhos, amor e a amizade. A união dessa família que nos dá força a cada fase da minha vida.

José Ricardo Dias Bertagnon e Vania Maria Bertagnon,

Sogro e Sogra,

Pelos esforços constantes de ajudar nesta fase de estudo, por me acolherem em sua casa e dividir suas vidas como se fosse um dos seus filhos.

Mario William Esper e Dulce Helena D. P. Esper

Tio e Tia

Pela forma que me acolheram em São Paulo e me ajudaram nos momentos difíceis

Agradeço...

A minha orientadora Profa. Dra. Maria Angelica Miglino, por todos os ensinamentos que demonstrou durante os 3 anos e 10 meses de convivência. A visão, ética e força de vontade de trabalhar, que mostra como e quanto podemos produzir e nos valorizar. A esta pessoa, que se propôs a me ajudar nos meus momentos difíceis. A esta educadora que abriu a minha mente para inúmeras possibilidades como utilizar meus conhecimentos na pesquisa e na didática.

A Dra. Graciela C. Pignatari, pelos incentivos e inúmeras correções para que o projeto caminhasse de forma tranquila. Pelos seus ensinamentos no uso das células-tronco, pois ao chegar a este departamento tinha uma noção muito vaga sobre o assunto.

A Profa. Dra. Angela M. F. Tabosa, que me recebeu de portas abertas para discutirmos o tema e assim analisarmos os acupontos utilizados. Pelas correções sugeridas na qualificação, e orientações para o melhor desenvolvimento do projeto.

A Profa. Dra. Patricia C. B. Beltrão-Braga, pelos ensinamentos sobre terapia celular. Por ceder as células-tronco de polpa dentária humana para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Carlos Eduardo Ambrósio e sua esposa Profa. Dra. Daniela Martins, que me incentivaram e procuraram me ajudar na aquisição dos camundongos mdx.

Aos Professores (Pedro Primo Bombonato, Paula de Carvalho Papa, José Roberto Kfoury Jr.) que tive contato com as aulas ministradas durante o doutoramento.

A Profa. Dra. Nanci e Neide Maria Mascarenhas do Nascimento, funcionárias do IPEN que cederam os camundongos mdx e me auxiliaram de forma que tivesse todo o suporte para albergar e cuidar destes animais.

A Médica Veterinária Claudia do Biotério da FMVZ, me ensinou alguns procedimentos de coleta de material de camundongos. Por ceder o uso do Biotério da FMVZ-USP para o desenvolvimento do piloto deste projeto.

Aos Funcionários (Ronaldo, Jaque, Maicon, Rose Eli, Rose, André, Índio) que me auxiliaram para o melhor desenvolvimento do projeto.

Aos amigos que me ajudaram de forma concreta ou por incentivos. Em especial ao Márcio, Isabela, Fabiele, Thiago, Caroline, André, Érica, Álvaro, Dilaila, Sarmento, Rafael, Dayane, Phelipe, Sônia, Renata, Bruno (mineiro) e Fernanda.

RESUMO

ESPER, G. V. Z. **Terapia celular sob aquapuntura em modelos murinos para distrofia muscular de Duchenne**. [Cellular therapy under aquapuncture in murine models for Duchenne]. 2012, 85 f. Tese (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O camundongo mdx é um modelo animal muito utilizado para estudar a distrofia muscular degenerativa de Duchenne (DMD) e apesar de o modelo apresentar uma degeneração mais branda, inúmeras pesquisas com este animal são realizadas devido à alta reprodutibilidade de fenótipos, obtenção comercial de várias linhagens e baixo custo de manutenção. A degeneração muscular progressiva ocorre devido a uma mutação genética que culmina na ausência ou diminuição da produção da proteína distrofina. Esta alteração gera uma cascata de eventos que pioram a degeneração muscular. Atualmente, a terapia preconizada é o uso de corticóide, que visa modular a inflamação muscular e possui uma série de efeitos colaterais, por isso uma série de estudos propondo outras formas de tratamento vem sendo desenvolvidos. Um tratamento promissor parece ser a terapia celular com células-tronco mesenquimais, a qual pode interferir no processo degenerativo por imunomodulação celular. Como a acupuntura pode controlar o processo inflamatório de doenças degenerativas, tal qual na doença de Parkinson, acredita-se que o uso consorciado das duas terapias possa diminuir o efeito degenerativo da DMD. Nesta pesquisa foram avaliados 22 camundongos mdx, machos, 4 a 6 semanas de idade. As células-tronco utilizadas para a aplicação foram de polpa dentária humana carregando a proteína verde fluorescente (EGFP) e a quantidade aplicada em cada acuponto foi de $1x10^4$ células. Os acupontos selecionados foram B47 (Hunmen), B49 (Yishe) e B52 (Zhishi). Os animais foram distribuídos aleatoriamente em quatro tratamentos (A) células-tronco em acupontos falsos, (B) solução fisiológica em acupontos verdadeiros, (C) células-tronco em acupontos verdadeiros e (D) controle, sem nenhum tratamento. No total três injeções foram realizados em um período de 56 dias de estudo. As avaliações do tratamento foram feitas através das análises da força de tração dos músculos, da creatinofosfoquinase sérica (CPK), histológica através da estruturação das miofibrilas e morfometria do colágeno e imuno-histoquímica pela expressão da proteína distrofina. Ao décimo dia após a terceira aplicação de células-tronco observa-se uma diferença somente no grupo controle, a qual manifestou um aumento da CPK em relação aos outros tratamentos e sem diferença estatística para força de tração pelos membros torácicos. Na histologia dos músculos tibial cranial e diafragma foram observou-se infiltrados inflamatórios, regeneração tecidual e diminuição do colágeno nos grupos tratados $p<0,05$. Na imuno-histoquímica verificou-se uma melhora da

quantidade de distrofina nos animais tratados principalmente no tratamento células-tronco em acupontos verdadeiros $p < 0,05$ e, pela análise do rastreamento das células-tronco com EGFP não se pode determinar o seu caminho uma vez que não observamos imunorreatividade nas análises utilizando o anti-GFP. Conclui-se que os tratamentos com terapia celular nos acupontos verdadeiros, acupontos falsos e solução fisiológica nos acupontos podem melhorar a doença degenerativa muscular no mdx pelo aumento da expressão da proteína distrofina.

Palavras-chave: mdx. acupuntura. distrofina. células-tronco.

ABSTRACT

ESPER, G. V. Z. Cellular therapy under aquapuncture in murine models for Duchenne. [Terapia celular sob aquapuntura em modelos murinos para distrofia muscular de Duchenne]. 2012. 85 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculty of Veterinary Medicine, University of São Paulo. São Paulo, 2012.

Muscular dystrophy in mdx mouse is an animal model used to study Duchenne muscular dystrophy (DMD) in humans. Although this model presents a milder degeneration, there are several studies with this animal due to the high reproducibility of phenotypes, obtaining various lines available and low maintenance cost. It is known that progressive muscle degeneration occurs due to a genetic mutation that culminates in the absence or decreased production of dystrophin protein. This change generates a cascade of events which aggravate the muscle degeneration. Currently, the recommended therapy is the use of corticosteroids to modulate muscle inflammation; however, there are a number of collateral effects, so a series of studies suggesting other forms of treatment have been developed. A promising treatment seems to be a therapy with mesenchymal stem cells, which can interfere with the degenerative process by cellular immunomodulation. As acupuncture can control the inflammatory process of degenerative diseases such as Parkinson's disease, the use of both syndication therapies may reduce the DMD degenerative effect. In this study 22 mdx mice, males, 4-6 weeks of age were evaluated. Stem cells were used for the application of human dental pulp carrying the green fluorescent protein (EGFP) and the quantity applied to each acupoint was $1x10^4$ cells. The acupoints selected were B47 (Hunmen), B49 (Yishe) and B52 (Zhishi). The animals were randomly assigned to four treatments groups: (A) stem cells in false acupoints, (B) saline in true acupoints, (C) stem cells in true acupoints and (D) control without any treatment. In total, three injections were performed over a period of 56 days of study. Evaluations of treatment were made by analyzing the tensile strength of muscles, measuring the serum creatine phosphokinase (CPK), structuring of myofibrils by histology and morphometry of collagen immunohistochemistry and by the amount of dystrophin protein. At day ten after the third application of stem cells there is a difference only in the control group, which manifests an increase in CPK compared to other treatments and no statistical difference in tensile strength. In the histology of cranial tibial muscles and diaphragm, inflammatory infiltrates were observed, as well as tissue regeneration and decreased collagen in the treated groups ($p < 0.05$). On immunohistochemistry there was an improvement in the amount of dystrophin in animals treated mainly in acupoints true ($p < 0.05$) and through analysis and tracking of stem cells with EGFP it was not possible to determine its path once immunoreactivity was not

observed in analyzes using anti-GFP. We conclude that treatment with stem cell therapy on true and false acupoints and with saline solution on acupoints can improve muscular degenerative disease in mdx by increased expression of dystrophin protein.

Keywords: mdx. acupuncture. dystrophin. stem cells.

Lista de Figuras

Figura 1 - Esquema ilustrativo do complexo glicoproteína-distrofina na membrana da célula muscular e etiologia da distrofia muscular 21
Figura 2- Esquema ilustrativo da cascata de eventos da morte celular muscular na doença da distrofia muscular de Duchenne 23
Figura 3 - Esquema ilustrativo da tradução do RNAm da distrofina em proteína e ação do Ataluren. 29
Figura 4- Camundongo *mdx* anestesiado por máscara com isofluorano 37
Figura 5- Camundongo *mdx* submetido ao teste do fio para analise da força dos seus membros torácicos 39
Figura 6- Fotomicrografia das células-tronco de polpa dentária humana 45
Figura 7 - Fotomicrografia do fígado de camundongo *mdx*, após tratamento. 53
Figura 8- Fotomicrografia do rim de camundongo *mdx* submetidos aos diferentes tratamentos. 54
Figura 9 - Fotomicrografia do baço de camundongo *mdx*, após tratamentos. 55
Figura 10 - Fotomicrografia do músculo tibial cranial de camundongo *mdx*, após tratamentos. 56
Figura 11 - Fotomicrografia do diafragma de camundongo *mdx*, após tratamentos. 57
Figura 12- Fotomicrografia de imuno-histoquímica para antidistrofina do músculo tibial cranial de camundongo *mdx* após tratamento. 60
Figura 13 - Fotomicrografia de imuno-histoquímica antidistrofina do diafragma de camundongo *mdx*, após tratamentos. 61
Figura 14 - Fotomicrografia de imuno-histoquímica antidistrofina do diafragma e do músculo tibial cranial de camundongo *mdx*, após tratamentos. 63

Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Frequência da força de tração dos membros torácicos dos camundongos *mdx*, no momento 0, com sete dias antes do transplante de CTPD.....48
Gráfico 2 - Frequência da força de tração dos membros torácicos dos camundongos *mdx* no momento 1, após 10 dias do primeiro transplante de CTPD.....49
Gráfico 3 - Frequência da força de tração dos membros torácicos dos camundongos *mdx* no momento 2, após 10 dias do segundo transplante de CTPD. 49
Gráfico 4 - Frequência da força de tração dos membros torácicos dos camundongos *mdx*, no momento 3 após 10 dias do terceiro transplante de CTPD. 50
Gráfico 5 – Média da avaliação sorológica da creatinofosfoquinase nos camundongos *mdx* sob os tratamentos.....51

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Escala de avaliação da força dos membros torácicos para os camundongos *mdx* tratados submetidos ao teste do fio, São Paulo, 2012 40
Tabela 2 - Qualificação de força com o intervalo de pontos para os camundongos *mdx*, São Paulo, 2012 40
Tabela 3 - Avaliação da qualidade da força muscular comparando os tratamentos A) ponto falso, B) placebo, C) ponto verdadeiro, D) controle e entre os momentos 1) sete dias antes do tratamento, 2) 10 dias após o primeiro transplante de células-tronco (CT), 3) 10 dias após o segundo transplante de CT, 4) 10 dias após o terceiro transplante de CT nos camundongos *mdx* – São Paulo – 2012. 47
Tabela 4 - Valores da creatinofosfoquinase sérica (U/L) comparando os diferentes tratamentos em camundongos *mdx* – São Paulo – 2012. 52
Tabela 5 - Valores médios (%) e desvio-padrão da regeneração muscular dos músculos tibial cranial e diafragma comparando com os diferentes tratamentos em camundongos *mdx* – São Paulo – 2012. 58
Tabela 6 - Valores médios (μm^2) e desvio-padrão da morfometria do colágeno presente nos músculos tibial cranial e no diafragma comparando com os diferentes tratamentos em camundongos *mdx* – São Paulo – 2012. 58
Tabela 7 - Valores médios e desvio-padrão da expressão da fluorescência do anticorpo antidistrofina no músculo tibial cranial e diafragma comparando com os diferentes tratamentos em camundongos *mdx* – São Paulo – 2012. 62

Lista de Abreviaturas

a.C.	Antes de Cristo
CPK	Creatinofosfoquinase sérica
CO_2	Gás carbônico
CTMs	Células-tronco mesenquimais
CTPD	Células-tronco de polpa dentária humana
CTPDhi	Células-tronco de polpa de dente humana imatura
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
E	Estômago
EGFP	*Enhanced Green Fluorescent Protein*
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GRMD	*Golden Retriever Muscular Dystrophy*
IG	Intestino grosso
L	Litro
Mg	Miligrama
mL	Mililitro
pH	Potencial hidrogeniônico
SFBd	Soro fetal bovino definido
U/L	Unidade por litro
VG	Vaso governador

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
1.1 JUSTIFICATIVA 17
2 OBJETIVO GERAL 19
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 19
3 REVISÃO DE LITERATURA 20
3.1 DISTROFIA MUSCULAR 20
3.2 MODELOS DE ANIMAIS PARA DMD 25
3.4 ACUPUNTURA 31
4 MATERIAL E MÉTODO 35
4.1 ANIMAIS 35
4.2 CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA 35
4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL 36
4.4 AVALIAÇÃO DOS CAMUNDONGOS *MDX* SOB A TERAPIA CELULAR 38
4.4.1 Avaliação de força da tração dos membros torácicos 38
4.4.2 Avaliação da creatinofosfoquinase sérica 41
4.4.3 Análise histológica 41
4.4.4 Análise imuno-histoquímica 42
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA 44
5 RESULTADOS 45
5.1 CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA 45
5.2 AVALIAÇÃO DA FORÇA DE TRAÇÃO DOS MEMBROS TORÁCICOS 46
5.3 AVALIAÇÃO DA CREATINOFOSFOQUINASE 50
5.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA 53
5.5 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA 59
6 DISCUSSÃO 65
7 CONCLUSÃO 72
REFERÊNCIAS 73

1 INTRODUÇÃO

A Distrofia Muscular de Duchenne (DMD) é uma doença degenerativa dos músculos esqueléticos e cardíacos que atinge o homem e os animais, causada por uma mutação genética transmitida pelo cromossomo X, que afeta principalmente indivíduos do sexo masculino numa proporção de 1:3500 crianças nascidas (BUSHBY et al., 2009; LUZ; NETO; MARQUES, 2003; WILLMANN et al., 2009).

Em humanos, os sintomas desta doença começam a aparecer a partir dos três anos de idade manifestando fraqueza nas pernas, aumento da curvatura convexa da coluna vertebral e dificuldade de deambulação. Com o passar do tempo, a degeneração progressiva muscular afeta o coração e os músculos responsáveis pela respiração, resultando na morte prematura do paciente geralmente na segunda ou terceira década de vida (WILLMANN et al., 2009).

Mediante a identificação da mutação genética desta doença e o conhecimento da importância deste gene, responsável por produzir a proteína distrofina foi possível tentar algumas formas alternativas para o tratamento (PASTERNAK; WONG; ELSON, 1995; LUZ; NETO; MARQUES, 2003; BUSHBY et al., 2009).

A terapia para a DMD é baseada principalmente no uso de glicocorticóides como deflazacort e prednisona, mas existem inúmeras pesquisas com tratamentos não convencionais, que analisam a eficácia de antibióticos, bloqueadores dos canais de cálcio, terapia gênica e terapia celular (KHUARANA; DAVIES, 2003; CHAKKALAKAL et al., 2005; WHITEHEAD et al., 2008).

Entre os diferentes tratamentos, a terapia celular com células-tronco tem ganhado destaque por melhorar a deficiência da distrofina, todavia há algumas controvérsias quanto à via de administração e a escolha da melhor célula-tronco para regeneração muscular (CHAKKALAKAL et al., 2005; KERKIS et al., 2008).

Uma forma alternativa de tratamento que vem sendo utilizada com sucesso para algumas doenças, que visa a melhora da qualidade de vida do paciente e reestabelecimento do equilíbrio do paciente é a acupuntura e suas diferentes técnicas adjuvantes de aplicação. Dentro das diversas técnicas adjuvantes temos a aquapuntura, que consiste na aplicação de fármaco em acupontos, com efeito de aumentar a sua ação, utilizando dosagens menores do

que a recomendada (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1997; PESSOA et al., 2004; CEROYSKY et al., 2008).

Considerando que a acupuntura melhora a qualidade de vida do paciente com doença degenerativa (URTIZBEREA et al., 2003; MARCUCCI, 2007) e ainda pode restaurar a massa muscular através da ação nos controles dos canais de Ca^{2+}, oxido nítrico, ação inibitória de miostatina, anti-inflamatória na diminuição de TGF-β, NFκ-β, assim como o controle da dor (TABOSA et al., 2002; XING, 2003; TABOSA et al., 2004; LIU et al., 2004; TAKAOKA et al., 2007; GAO et al., 2008), o uso da acupuntura associada à terapia celular pode ser uma alternativa promissora para o tratamento de pacientes com DMD.

Dessa forma, realizamos no modelo murino para distrofia muscular a aplicação das células-tronco de origem de polpa de dentária humana em acupontos visando potencializar os efeitos desta terapia celular, o qual aliado aos efeitos benéficos da acupuntura pode constituir uma forma alternativa de compensar os efeitos degenerativos em camundongos *mdx*, gerando assim possibilidades de ser este modelo de tratamento aplicado para a DMD em humanos.

1.1 JUSTIFICATIVA

A acupuntura é uma técnica que insere agulhas em determinados pontos com menor resistência elétrica, denominados acupontos. Estes quando estimulados promovem a liberação de neurotransmissores, opióides endógenos ou ainda promovem uma ação maior do sistema nervoso autônomo, simpático ou parassimpático (TABOSA et al., 2002; TABOSA et al., 2004; LIU et al., 2004; YAN, 2007).

Gama (1999) utilizou acupuntura e verificou aumento da resposta imunológica em vários experimentos, o que lhe possibilitou selecionar uma variedade de acupontos (IG4, IG11, E36, VG14, F11, B25, B20), pois não existe um ponto de acupuntura especifico para aumentar a resposta imunológica específica, mas sim vários deles tonificam o potencial de produção destes, de uma forma inespecífica. Além disso, Scognamillo-Szabó e Bechara (2001) citaram a utilização da acupuntura para alteração da resposta imune, cicatrização, neovascularização e regeneração de tecidos lesionados experimentalmente.

Alguns trabalhos que utilizaram baixas doses de fármacos aplicados nos acupontos mostraram uma potencialização na ação dos medicamentos quando comparados com a via de administração rotineira preconizada pelo fabricante (PESSOA et al., 2004; CEROYSKY et al., 2008).

Já, a terapia celular utilizando células-tronco parece ser uma alternativa promissora para o tratamento de pacientes com DMD, pois tem a capacidade de imunomodular e melhorar a progressão da distrofia muscular, possui atividade anti-inflamatória e ainda produz efeito trófico que aumenta a atividade de reparo endógeno (ICHIM et al., 2010). Porém, ainda não foi encontrada qual a melhor célula-tronco, via de aplicação, bem como a melhor dosagem e o intervalo de aplicação destas células.

Levando em consideração os estudos acima citados pode-se inferir que a utilização concomitante de terapia celular utilizando células-tronco e acupuntura pode acarretar em uma potencialização da sua ação. Com isso, a hipótese desse trabalho consiste no fato de que as células-tronco, quando injetadas em pontos de acupuntura, podem melhorar o efeito regenerativo muscular e a força de tração nos membros dos camundongos *mdx*.

2 OBJETIVO GERAL

O objetivo desta tese de doutoramento foi comparar os efeitos terapêuticos de células-tronco de polpa dentária humana (CTPD) aplicadas em acupontos (aquapuntura) em camundongos *mdx*.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cultivar as células-tronco de polpa dentária humana
- Comparar as vias de transplante das células-tronco nos acupontos verdadeiros e falsos em camundongos *mdx*
- Verificar a eficiência da aquapuntura com a aplicação de solução fisiológica em acupontos em camundongos *mdx*
- Avaliar o efeito terapêutico dos diferentes tratamentos na musculatura dos camundongos *mdx* mediante a análise da creatinofosfoquinase sérica, avaliações da força dos membros torácicos, histológica do músculo tibial cranial, rins, fígado, diafragma e baço e imuno-histoquímica do músculo tibial cranial e do diafragma.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 DISTROFIA MUSCULAR

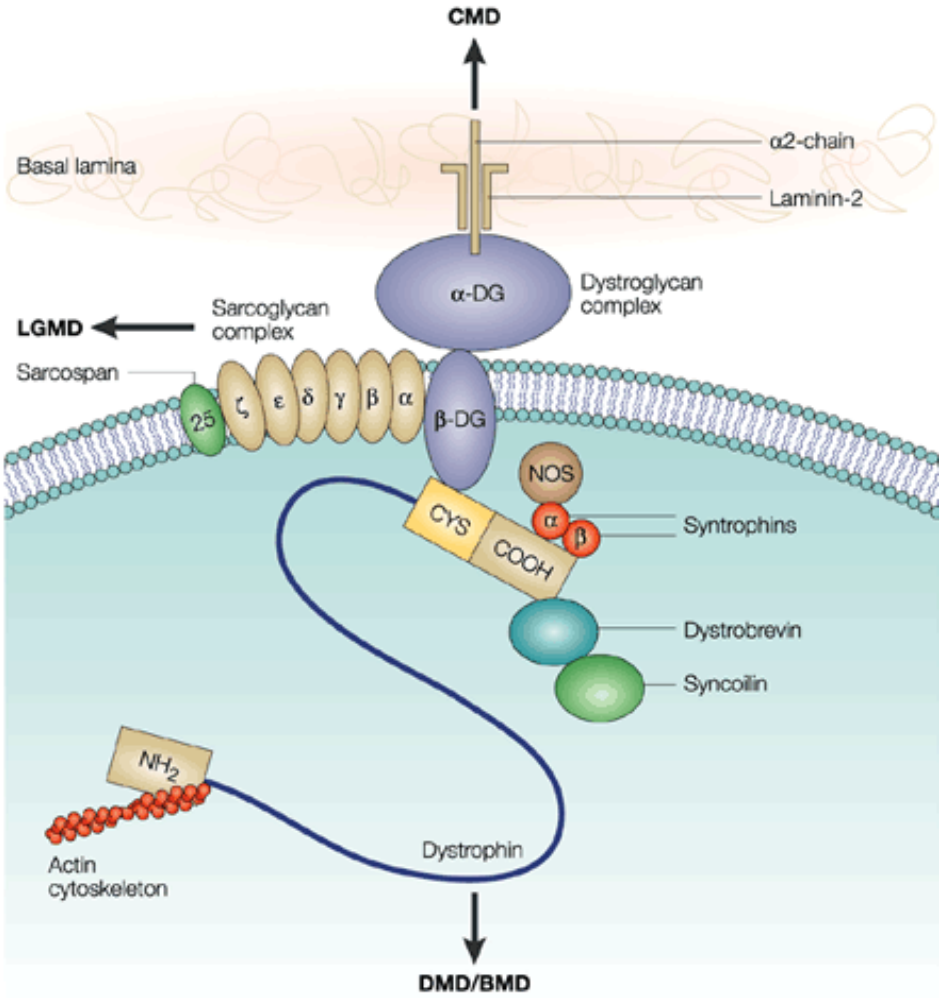
As distrofias musculares são doenças neuromusculares de evolução clínica progressiva, com origem genética, que comprometem a musculatura esquelética. Uma delas é a distrofia muscular de Duchenne (DMD), cuja etiologia está ligada ao cromossomo Xp21, num padrão de herança recessivo, onde a mãe, quase sempre assintomática, transmite a doença ao filho. Tem incidência aproximada de 1 a cada 3500 crianças do sexo masculino, surgindo os primeiros sintomas na idade de 3 a 6 anos e, apesar de muitos estudos, ainda não existe uma terapia efetiva (LUZ; NETO; MARQUES, 2003; VAINZOF et. al, 2005; BUSHBY et. al, 2009; WILLMANN et. al, 2009).

Na DMD ocorrem mutações do tipo pontuais, duplicações e deleções em algumas regiões do cromossomo X, responsável pela codificação da proteína distrofina (LUZ; NETO; MARQUES, 2003; BUSHBY et al., 2009), no qual dois terços dos pacientes produzem a proteína com ausência da sua porção central, mantendo a região C terminal íntegra, o que garante uma função parcial da proteína. Os demais pacientes possuem uma parada pontual no gene, produzindo pouca ou nenhuma proteína devido à mutação pontual no gene da distrofina (HOFFMAN; BROWN; KUNKEL, 1987).

A função desta proteína é estrutural uma vez que ela age estabilizando o sarcolema muscular, conectando o citoesqueleto da actina à matriz extracelular e a matriz extracelular ao citoesqueleto como pode ser observado na Figura 1 (PASTERNAK; WONG; ELSON, 1995) (Figura 1). Dessa forma, a deficiência desta proteína causa uma fragilidade da membrana da célula muscular, por uma contração induzida lesionando o sarcolema e levando à morte celular (DECONINCK; DAN, 2007; WALLACE, MACNALLY, 2009). Esta mesma proteína

também pode ser encontrada em populações neurais (BLAKE et al., 2002; EHMSEN et al., 2002).

Figura 1 - Esquema ilustrativo do complexo glicoproteína-distrofina na membrana da célula muscular e etiologia da distrofia muscular



Fonte: (KHUARANA, DAVIES, 2003)

Legenda: Interação da distrofina com o citoplasma, transmembrana e proteínas extra celulares no músculo esquelético da célula muscular. DMD= distrofia muscular de Duchenne, BMD= distrofia muscular de Becker, CYS= cisteína, DG= distroglicano, NOS= oxido nítrico sintase e LGMD distrofia muscular de cintura.

A patofisiologia da lesão muscular não está completamente elucidada e uma das hipóteses é a de que a fragilidade celular promova acúmulo de cálcio intracelular, ativando proteases como a calpaína que resulta na morte celular (LUZ; NETO; MARQUES, 2003; DECONINCK; DAN, 2007). Sugere-se ainda que o mecanismo da irrigação vascular contribua para o agravamento da lesão muscular nos pacientes com DMD.

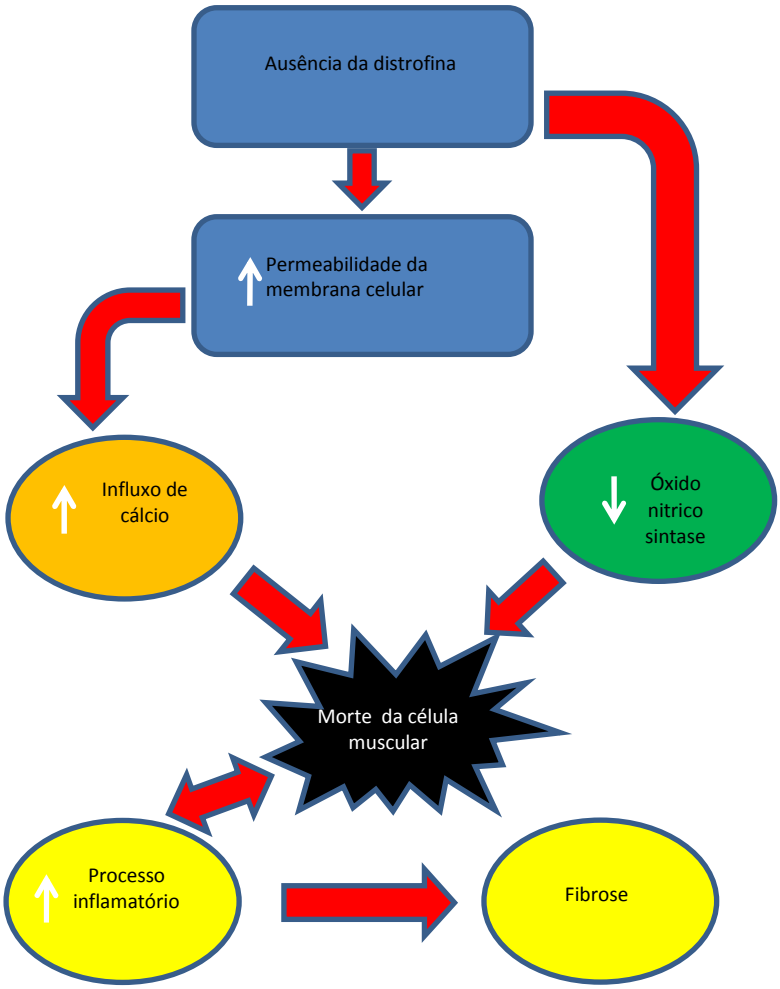
Além disso, a deficiência da distrofina pode interferir na produção da enzima óxido nítrico sintase (NOS), que resulta diminuição do óxido nítrico, por conseguinte limita a

vasodilatação e aumenta o estresse oxidativo. Este processo de limitar a vasodilatação pode facilitar o processo isquêmico durante o exercício, já que é necessário um maior aporte de oxigênio, conseguido pela ação do oxido nítrico, um vasodilatador produzido fisiologicamente pelas células musculares (DECONINCK; DAN, 2007; TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2007).

Outro fator que deve ser considerado para a problematização da doença é a massa muscular. Indivíduos com DMD e maior massa muscular apresentam uma progressão da doença mais lenta, inferindo que anabolizantes possam ser uma terapia auxiliar promissora, embora com efeitos colaterais indesejáveis. Nesta mesma ideia, a própria necrose celular pode induzir uma resposta inflamatória que agravará a lesão muscular. Sendo os corticóides úteis na preservação desta massa, é o único grupo farmacológico atualmente preconizado para o tratamento desta afecção (DECONINCK; DAN, 2007).

Todos estes eventos desencadeiam uma ação em cascata, que se inicia pelo aumento da permeabilidade celular, seguido do maior influxo de cálcio, que associado à alteração do óxido nítrico, favorece a diminuição da função mitocondrial. Isto promove um aumento do estresse oxidativo que perpetua a atividade inflamatória levando à progressão da degeneração muscular na DMD (TIDBALL; WEHLING-HENRICKS, 2007; WALLACE; McNALLY, 2009) (Figura 2).

Figura 2- Esquema ilustrativo da cascata de eventos da morte celular muscular na doença da distrofia muscular de Duchenne



Fonte: (DECONINCK; DAN, 2007), modificado.

Legenda: A ausência da proteína distrofina na célula muscular acarreta em uma cascata de eventos tais como: aumento da permeabilidade celular e conseqüente aumento do influxo de cálcio para o interior da célula. Além disso, a a falta da distrofina acarreta na diminuição do óxido nítrico sintase, limitando o tônus vascular e o processo final é a degeneração, morte da fibra celular, seguido de processo inflamatório, que perpetua a degeneração muscular e fibrose muscular.

As células musculares lesionadas são constantemente reparadas por meio das células satélites ou precursoras miogênicas. Estas células satélites são mononucleadas e estão localizadas na periferia do miotubo, entre o sarcolema e a lâmina basal das fibras musculares. Mediante estímulos tais como os miotraumas, estas células tornam-se ativas, proliferam e expressam marcadores miogênicos. No entanto, quando não solicitadas, elas permanecem em estado quiescente, não proliferativo (HAWKE; GARRY, 2001).

Durante a fase inicial do período fetal, as células satélites são abundantes para contribuir com o desenvolvimento muscular no período pós-natal, diminuindo abruptamente

em poucos meses, o que torna o potencial proliferativo destas células limitado (SCHAMALBRUCH; HELLHAMMER, 1976)

Durante a progressão da DMD, ocorrem ciclos repetidos de degeneração e regeneração, o que esgota a capacidade regenerativa das células satélites e inicia a substituição do tecido muscular contrátil por tecido fibroso (LUZ; NETO; MARQUES, 2003; COLLINS; MORGAN, 2003; WALLACE; McNALLY, 2009; SEWRY, 2010).

A degeneração pode ser visualizada pela histologia do músculo distrófico no início da doença com inúmeros focos de mionecrose, intenso infiltrado inflamatório, miofibras hipertróficas e de tamanhos variados de fibras musculares (COLLINS; MORGAN, 2003; WALLACE; McNALLY, 2009).

Como dito anteriormente, os sintomas da DMD, geralmente se iniciam entre 3 a 6 anos de idade, com atraso na função motora principalmente na cintura pélvica e posteriormente na cintura escapular e, em alguns casos, retardo mental. A perda da capacidade de deambular ocorre entre 8 a 10 anos de idade, por isso essas pessoas necessitam do uso da cadeira de rodas (WILLMANN et. al, 2009, BUSHBY et. al, 2009). Este processo de degeneração muscular é evidente pelas substituições do tecido muscular por tecido conjuntivo e adiposo, que causa pseudo-hipertrofia dos músculos afetados, com a evolução para o óbito, que ocorre em torno da segunda década de vida, por motivo de insuficiência cardíaca ou respiratória (BUSHBY et. al, 2009).

As avaliações para verificar a extensão da lesão muscular são testes funcionais musculares (força, extensão, deambulação, coordenação), dosagem sérica de creatinofosfoquinase, histologia muscular e imuno-histoquímica (antidistrofina) (De LUCA et al., 2008; WHITEHEAD et al., 2008)

A creatinofosfoquinase (CPK) é uma enzima que catalisa a transferência do fosfato entre a adenosina trifosfato (ATP) e a creatina fosfato. Esta enzima encontra-se em grandes concentrações no músculo esquelético e miocárdio, presente também na circulação sanguínea após a injúria destes tecidos em teores proporcionais a lesão. Como a CPK possui uma meia-vida curta ela também é utilizada para teste de diagnóstico de lesões musculares (HOFFMANN; SOLTER, 1989). Por ser considerada uma medida laboratorial clínica fidedigna para o monitoramento da DMD e avaliar a melhora degenerativa muscular, este teste é amplamente utilizado em humanos e modelos animais, como em camundongos *mdx* (De LUCA et al., 2008; BURDI et al., 2009).

Pacientes com DMD geralmente parecem normais ao nascimento, mas mostram níveis elevados de creatinofosfoquinase no sangue, devido à lesão muscular (WILLMANN et. al, 2009, BUSHBY et. al, 2009).

Além dessa avaliação, existe também o teste funcional muscular que analisa o uso máximo da força do membro ao puxar uma haste conectada a um dinamômetro (*grip-strength tests*). Ainda temos outra forma de avaliação que é a suspensão dos membros torácicos ou os quatro membros em permanência máxima de tempo sobre um fio de aço revestido. Apesar do exercício extenuante favorecer o desenvolvimento de lesões musculares (DECONINCK; DAN, 2007), o uso destes testes em camundongos *mdx* não acelera a progressão da doença, como confirmado pela análise da CPK sérica e histológica do músculo diafragma (Van PUTTEN et al., 2010).

Os cortes histológicos do tecido muscular esquelético identificam com determinadas colorações (hematoxilina-eosina e tricrômio de Masson ou picrosírius) a necrose e os índices de regeneração muscular e facilitam a quantificação do colágeno. Já, a técnica de imuno-histoquímica deste mesmo tecido detecta as proteínas mutadas, sendo sua eficácia de diagnóstico melhor do que a reação de polimerização em cadeia (*Polymerase Chain Reaction*-PCR) multiplex, devido à velocidade de execução, precisão e alta disponibilidade de anticorpos antidistrofina e proteínas associadas (SHERIFFS; RAMPLING; SMITH, 2002).

3.2 MODELOS DE ANIMAIS PARA DMD

A distrofia muscular também afeta os animais, porém com algumas variações de comprometimento clínico como perda da função motora, atrofia muscular, cardiomiopatia dilatada, disfagia, megaesôfago entre outros sinais (COSSU; SAMPAOLESI, 2007).

Esta doença possui caráter progressivo e letal em humanos e animais, o que motivou o estudo de modelos em várias espécies como: cães, gatos, peixes e camundongos. No entanto nenhum dos modelos utilizados representa fidedignamente a doença em humanos.

Existe ainda uma busca constante de forma a mimetizar os efeitos da doença, para aplicar a estratégia apropriada para o estudo do tratamento (WILLMANN et al., 2009; DUAN, 2010).

Dos modelos caninos, as raças de cães que possuem esta doença são *Goldens Retriever, Rottweilers, Cavalier Kings Charles Spaniel* e *Beagles*.

A distrofia muscular nestas raças está ligada ao cromossomo X, com mutação pontual no códon do exon 8. A progressão da doença tem início geralmente com 3 meses de idade e a morte em qualquer período neonatal até a idade adulta. Os sinais clínicos apresentados são fraqueza muscular, hiperglossia, disfagia, emagrecimento, contratura muscular, problemas cardíacos, digestórios e respiratórios (KERKIS et al., 2008; WALMSLEY et al., 2010). Para este modelo canino, a indicação para tratamento pré-clínico sugerido é referente principalmente para as lesões cardíacas, pois suas alterações funcionais de deambulação ficam extremamente variadas quanto à idade e fenótipo dos diferentes pacientes (WILLMANN et al., 2009).

Para os modelos felinos há uma deleção em códon codificador da distrofina, que causa a conservação da massa muscular mesmo com a progressão da doença, mas também pode demonstrar rigidez muscular esquelética e considerável comprometimento cardíaco, o que não se assemelha a doença no homem, já que não há generalizada fraqueza muscular (WILLMANN et al., 2009).

A DMD também é estudada nos peixes como o Zebrafish, sendo um modelo atraente, pois seus corpos são compostos predominantes de músculos esqueléticos e o comportamento do complexo glicoproteína distrofina semelhante ao humano (GUYON et al., 2003). Estudos mais recentes sobre este modelo verificaram uma eficiência da vitamina B3, precursor do dinucleotídeo nicotinamida e adenina, na melhora da organização da laminina na lâmina basal favorecendo a resistência das fibras musculares distróficas (GOODY et al., 2012).

Para os modelos murinos, o *mdx* é o modelo natural para Distrofia Muscular de Duchenne, e foi descrito por Bulfield et al. (1984). Estes animais foram originados de uma colônia de animais C57BL/10, na qual houve uma mutação pontual do exon 23 da distrofina, que resulta em um códon de parada (WILLMANN et al., 2009). Entretanto, o *mdx* apresenta um quadro clínico mais brando que nos humanos, mas com degeneração e necrose muscular semelhantes (PASTORET; SEBILLE, 1995).

A degeneração e regeneração muscular nos camundongos *mdx* iniciam-se por volta dos 20 dias de idade e a necrose atinge o seu ápice entre 35 a 90 dias (TANABE et al., 1986).

A degeneração muscular destes animais é mais evidente no diafragma do que outro grupo muscular (Van PUTTEN et al., 2010).

Um aspecto que favorece a evolução clínica dos camundongos *mdx* é que eles possuem um maior número de fibras revertentes (2-3%), que passam a sintetizar novamente de forma espontânea a distrofina, por isso não apresentam sinal clínico evidente (VAINZOF et al., 2005). Verifica-se ainda que entre 2 e 4 semanas de idade ocorre uma vigorosa degeneração e regeneração das fibras musculares nestes animais, o que resulta em um aumento do número de diferenciação de novas miofibrilas, caracterizando estas células com núcleos centralizados e um aumento heterogeneidade do tamanho. Em paralelo, observa-se necrose dos músculos nesta fase inicial da doença (WILLMANN et al., 2009).

Por causa destas alterações, estes camundongos apresentam algumas características histológicas e bioquímicas séricas muito semelhantes aos humanos e, devido a esta similaridade, estes modelos são utilizados experimentalmente para investigação de diversos aspectos da DMD (De LUCA et al., 2008; BURDI et al., 2009, KAYALI et al., 2012), o que permite elucidar aspectos básicos da patofisiologia permitindo ainda testar a eficácia de estratégias terapêuticas emergentes (WILLMANN et al., 2009).

Além disto, os modelos murinos têm outras consideráveis vantagens como seu uso em diversos estudos publicados, alta reprodutibilidade de fenótipos, obtenção comercial de várias linhagens e baixo custo de manutenção (WILLMANN et al., 2009).

3.3 TERAPIAS PARA DMD

O tratamento preconizado para a DMD é baseado na corticoterapia e demais fármacos sintomáticos, mas a partir do momento que se identificou o erro genético causador da doença, inúmeros trabalhos se propuseram a pesquisar outras formas para corrigir ou amenizar a degeneração muscular (RANDO, 2012).

Entre estes fármacos estão os imunomoduladores, antioxidantes (n-acetilcisteína), antibióticos e bloqueadores de canais de cálcio, as terapias celulares e gênicas, entretanto, até o momento, nenhum deles se mostrou eficiente para a cura desta doença (KHUARANA; DAVIES, 2003; WHITEHEAD et al., 2008; KEMALADEWI et al., 2011).

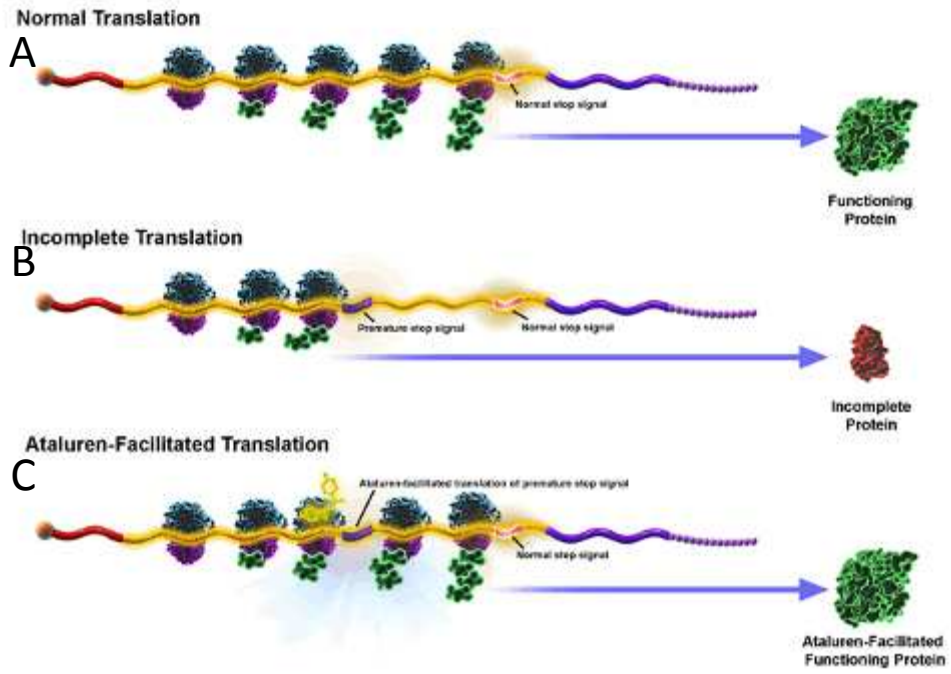
A corticoterapia como escolha para o tratamento da DMD consiste na resposta de não progressão da doença, pois seu modo de ação envolve propriedades anti-inflamatórias, anabolizante muscular e estabiliza a mitocôndria, favorecendo a predominância de fibras musculares do tipo-1 (KHAN, 1993; REITTER, 1995). Este grupo farmacológico produz efeitos colaterais como imunossupressão, desmineralização óssea, excessivo ganho de peso, anormalidade de comportamento, aparência de síndrome de Cushing, excessivo crescimento de pêlos e não aumenta a produção da distrofina (MANZUR et al., 2008).

As pesquisas com antibióticos, principalmente os aminoglicosídeos, tais como a gentamicina, mostra que provocam alterações da tradução ribossomal e na leitura gênica a qual substituirá um aminoácido diferente do códon prosseguindo a leitura que formará a proteína. Porém, existem efeitos colaterais deste fármaco como ototoxicidade e nefrotoxicidade (KAYALI et al., 2012).

Em camundongos *mdx*, a gentamicina resultou em aumento de 20% da produção da distrofina (BARTON-DAVIS et al., 1999) e melhora no aspecto da degeneração do músculo gastrocnêmio, mesmo após exercício (De LUCA et al., 2008). Em estudo clínico em humanos houve diminuição da creatinofosfoquinase sérica, sem melhora clínica, quando este fármaco foi administrado por 14 dias consecutivos, não sendo observados efeitos tóxicos (MALIK et al., 2010).

A mesma ação foi vista pelo fármaco Ataluren (PTC 124®), que foi desenvolvido para realizar a mudança nos códons defeituosos UAA, UAG e UGA, pela ação de determinados elementos químicos que alteraram a leitura do RNAm como mostra a Figura 3 (WELCH et al., 2007).

Figura 3 - Esquema ilustrativo da tradução do RNAm da distrofina em proteína e ação do Ataluren.



Fonte: ©2012 PTC – Therapeutics
Legenda: A) Tradução do RNAm de uma proteína normal; B)Tradução incompleta do RNAm da distrofina devido a presença de um códon de parada ,de leitura; C) Tradução facilitada do RNAm da distrofina com ação do ataluren.
.

A mesma resposta foi obtida por Kayali et al. (2012) quando utilizaram um fármaco RTC13, que possui o princípio da ação da gentamicina e verificaram melhora clínica nestes animais, além de aumento da área positiva para distrofina, sendo maior que o controle por análise imuno-histoquímica.

Burdi et al. (2009) analisaram o tratamento com pentoxifilina em murino *mdx* submetidos ao exercício com uma esteira e verificaram diminuição da CPK sérica. A ação deste fármaco suprime a inflamação pela inibição da síntese do fator de necrose tumoral α e outras citocinas pró e anti-inflamatória, inibidor não específico da fosfodiesterase e os efeitos colaterais do uso crônico deste fármaco são os problemas digestórios e imunológico (ZIMMERMAN et al., 2011).

A acetilcisteína é um fármaco mucolítico usado para amenizar os efeitos deletério e progressivo da DMD, com ação na diminuição dos radicais livres e produtos pró inflamatórios. WHITEHEAD et al. (2008) demonstraram que o tratamento de animais *mdx* com este fármaco aumentou as concentrações da utrofina e β-distroglicana, que indica uma melhora na degeneração muscular, por um efeito compensatório da distrofina.

Outra categoria de tratamento não convencional são os feitos com as células-tronco mesenquimais (CTMs). Estas células têm características de aderência em placa quando cultivadas, capacidade de diferenciação de pelo menos três linhagens (cartilagem, tecido ósseo e tecido adiposo) e expressam marcadores celulares específicos. Estudos recentes têm demonstrado que este tipo celular tem a capacidade de diferenciar também em outras linhagens celulares tais como: neuronais e cardiomiogênicas (CAPLAN, 2009; RASTEGAR et al., 2010). Por isso, o uso de CTMs na DMD pode produzir uma maior regeneração muscular e diminuir os efeitos deletérios desta doença como descrito por Pinheiro et al. (2012), que utilizaram células-tronco de tecido adiposo e verificaram uma menor quantidade de mediadores inflamatórios e maior quantidade de vasos sanguíneos nos animais *mdx* tratados.

Em 1999, Gussoni e colaboradores realizaram um transplante de células-tronco de medula óssea de camundongos no reparo da distrofina em animais da mesma espécie de linhagem *mdx* e demonstraram resultados promissores com aumento da distrofina muscular nestes animais.

Ichim et al. (2010) citam que as terapias com CTMs têm três vantagens frente a outras terapias: capacidade de se ligar geneticamente para modificar o músculo distrófico, atividade anti-inflamatória e produção de efeito trófico que aumenta a atividade de reparo endógeno.

Outro tratamento não convencional pesquisado é a terapia gênica, que é baseada em vetores, geralmente virais, que carregam em seu material nucleico, regiões codificadoras da distrofina de diferentes tamanhos. Entretanto há desconhecimento sobre a habilidade da persistência desses vetores de uma forma inócua no hospedeiro, bem como o comprimento ideal da distrofina a ser transplantada por esse vetor (PICHAVANT et al., 2011; KEMALADEWI et al., 2011).

3.4 ACUPUNTURA

Os primeiros indícios de uso da acupuntura datam de 5 mil anos e pesquisadores têm relatado referências à acupuntura no campo da Veterinária por volta do ano de 900 a.C., na China, quando esta medicina era realizada em cavalos.

No ocidente, ela foi introduzida somente no século XVIII pelos jesuítas e, a partir do século XX, entre as décadas de 20 e 30, foi difundida na França, por Souliet de Morant e seus discípulos e no Brasil, a acupuntura foi introduzida em 1950 por Frederico Spaeth (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1997; LUNA, 2002).

A palavra acupuntura origina-se do latim: *acus* - agulha; *pungare* – perfurar (IAMAGUTI et al., 1981; DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1997; LUNA, 2002). Esta terapia é, por definição, a arte de introduzir agulhas sobre pontos com resistência elétrica reduzida, os quais se encontram espalhados na região da musculatura esquelética. São denominados de acupontos e se inter-relacionam, formando os meridianos. Os meridianos mais utilizados na prática da acupuntura são quatorze sendo doze bilaterais e simétricos e os outros dois distribuídos na linha média ventral e dorsal nos animais.

No homem, cada membro possui três meridianos anteriores e três posteriores, os quais promovem conexões energéticas internas entre órgão e vísceras. Estes meridianos são denominados: pulmão (P), intestino grosso (IG), rim (R), bexiga (B), fígado (F), vesícula-biliar (VB), coração (C), triplo-aquecedor (TA), intestino delgado (ID), pericárdio (Pc), estômago (E) e baço-pâncreas (BP) (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1997; YAMAMURA, 1998; LUNA, 2002, SHOEN, 2006).

As indicações para o uso da acupuntura são inúmeras e segundo Draehmpaehl e Zohmann (1997) algumas indicações para tratamento em animais, principalmente no caso de doenças referentes ao aparelho locomotor, enterites, cistites, retenção de placenta, metrite, doenças da pele. Além disso, outros autores citam doenças degenerativas tais como; Parkinson, Distrofias Musculares, como possíveis candidatas para o tratamento com auxílio da Medicina Tradicional Chinesa e resultados animadores já foram obtidos, apesar dos dados ainda serem inconclusivos (URTIZBEREA et al., 2003; MARCUCCI, 2007).

A acupuntura possui algumas técnicas adjuvantes como: eletroacupuntura, moxabustão, aquapuntura (acuinjeção) e laser (DRAEHMPAEHL; ZOHMANN, 1997). A acuinjeção ou aquapuntura é o procedimento realizado através de aplicação de substâncias como vitamina B12, progestágenos, solução fisiológica, fármacos nos pontos de acupuntura promovendo uma estimulação conforme a especificidade do acuponto e da substância aplicada (CARNEIRO, 2007; COSTA; BOTTECCHIA; SILVA, 2008).

Em 2004, Pessoa et al. verificaram que a administração de microdoses de prostaglandina F2α (PGF2α) no acuponto Bai Hui induziu a luteólise em uma das 25 vacas, as quais receberam quantidades equivalentes a 10% da dose recomendada do fármaco pela via intramuscular (IM), e em 5 das 24 vacas, que receberam 25% da dose recomendada no mesmo acuponto.

Em outro experimento conduzido por Ceroysky et al. (2008) demonstraram a eficácia do tratamento na diminuição do anestro pós-parto, induzindo o cio em porcas pela estimulação dos acupontos Bai Hui e Weiken (localizado na linha média do espaço sacrococcígeo), por meio de moxabustão ou aquapuntura (2ml de solução de glicose a 20%), obtendo 70,3% de manifestação de estro, sendo a manifestação de estro no tratamento-controle de 57,5%.

A administração de IgG humana em ratos (2,54g/L) nos acupontos VG-1, Bai Hui e acupontos falsos, demonstrou que a titulação deste anticorpo após 30 dias foi maior no ponto Bai Hui do que os outros tratamentos (SHOEN, 2001).

O equilíbrio dado pela função da acupuntura é alcançado pela liberação de opióides endógenos, cortisol plasmático, dopamina, ocitocina, serotonina; estimulação parassimpaticomimética ou simpaticomimética; inibição da substância pain, citocinas e radicais livres (TABOSA et al., 2002; TABOSA et al., 2004; LIU et al., 2004; YAN, 2007; WANG et al., 2011). Há diferença da resposta fisiológica entre o uso das diferentes técnicas adjuvantes, como a estimulação do óxido nítrico pela ação da acupuntura (moxabustão, eletroacupuntura e agulha seca). Ben et al. (2010) observaram uma maior concentração desse metabólito na pele, principalmente, com o uso da moxabustão nos acupontos Pc 5 e B57.

A eletroacupuntura, que utiliza uma determinada frequência (hertz) e intensidade (volts) acoplados à agulha de acupuntura, segundo Takaoka et al. (2007) pode alterar a

liberação de miostatina, o que leva a uma reação proliferativa das células satélites, com reparação no músculo esquelético.

O uso de somente agulhas nos acupontos também é descrito por Liu, Chen, Chiu (2009), que citam o uso do acuponto B52 para amenisar a escoliose degenerativa, com 31° de ângulo de Cobb na radiografia lombar de uma mulher com 74 anos de idade. Após 6 semanas de tratamento com acupuntura houve uma diminuição para 10° de ângulo de Cobb e, em seguida, se fez a correção cirúrgica.

Sabe-se que a acupuntura é uma técnica que consegue liberar opióides endógenos e beneficiar o controle da dor, mas há também o aspecto de melhorar a regeneração muscular: Ameis et al. (2008) onde verificaram um aumento na quantidade de células satélites no músculo tibial cranial, após agulhamento do acuponto E36, em camundongos C57BL/6, comparado com o grupo controle.

Em outro trabalho citam que a utilização desta terapia para diminuir os efeitos da atrofia, doença que impossibilita os pacientes de realizar exercícios físicos, foi realizada com sucesso, onde camundongos após sessões de acupuntura melhoraram a síntese da proteína e a diminuição da degradação desta na musculatura esquelética (ONDA et al., 2011).

Apesar da associação da acupuntura com a terapia celular ser uma novidade, existem alguns estudos nesse sentido principalmente com trauma de medula espinal em animais. Nestes trabalhos foram utilizadas células-tronco originadas de medula óssea, adicionando-se a técnica de eletroacupuntura e os resultados obtidos foram otimistas para a sobrevivência destas células após o transplante, diferenciação da mesma no tecido, bem como a recuperação física dos animais pelo teste de locomoção de Basso, Beattie, Bresnahan (BBB), sendo os resultados melhores no grupo em que houve associação das duas técnicas (DING et al., 2009; DING et al., 2011; YAN et al., 2011; LIU et al., 2012).

A utilização da acupuntura pela teoria energética tem função terapêutica preventiva e curativa nos desequilíbrios da Energia Interna (YAMAMURA, 1998). É utilizada geralmente no tratamento de lombalgia, ciatalgia e miastenias. Faz-se geralmente nestes casos a utilização do meridiano da bexiga (YAMAMURA, 1998).

A localização deste meridiano está na região dorsal dos animais, sendo chamados de Pontos Shu Dorsais, ou de Transporte Dorsais, uma vez que Shu significa transportar. Eles transportam o Qi (energia) para os órgãos correspondentes, pois tem uma comunicação direta,

causando efeitos significativos sobre esses órgãos. Para a medicina ocidental esses efeitos (físicos, emocionais ou mentais) são explicados baseando-se na organização neural dos segmentos espinais e teoria da circulação energética (ROSS, 2003).

Os pontos Shu dorsais, além de tratar os aspectos emocionais e mentais relacionados ao órgão com os quais se comunicam, podem também ser utilizados para o tratamento de tecidos e suas funções. Assim, o ponto bexiga (B)18 trata afecções do fígado, tais como cefaleias, gastrites, entre outras. Na esfera emocional, atua na raiva e a depressão. Tratam distúrbios de músculos e tecidos associados aos órgãos dos sentidos, como os olhos, já que "o Fígado abre nos olhos" (HE e NE, 1999).

Os músculos são controlados pelo meridiano baço/pâncreas, mas o fígado também pode exercer este controle em músculos de constituição fibrocarnosa e tendões. Enquanto o fígado regula o aspecto contrátil dos músculos, as funções dos tendões e ligamentos, o baço/pâncreas controla a massa muscular e a força destes músculos. Assim, nos tratamentos de sequelas de acidentes vasculares cerebrais, como paralisia espástica dos músculos e retrações dos tendões, utilizam-se os pontos do fígado (ROSS, 1994). De acordo com Ross (1994), quando há atrofia dos músculos e tendões e miastenias trata-se dos meridianos do fígado, vesícula biliar e baço/pâncreas.

A literatura para indicação dos ac de acupuntura é extensa e descrita em vários livros. Yamamura (1998) traz os pontos B49, B50, B51 e B52 para o tratamento da lombo-ciatalgia e da paralisia dos membros inferiores. O acuponto B47 no homem tonifica o Qi do meridiano do fígado, que possui ação nas contraturas, dor na região lombar e paralisia dos membros inferiores.

Os efeitos da acupuntura também foram avaliados pela ação oxidativa do fármaco 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), que é utilizado para modelo da doença de Parkinson, em camundongos C57BL/6. Verificaram que os pontos F3 e VB34 diminuíram o aumento do ferro férrico, evitando a alteração do metabolismo deletério do ferro neste modelo (CHOI; PARK; LIM, 2009).

Dessa forma, podemos dizer que o tratamento dos camundongos *mdx* neste projeto com pontos de acupuntura associados à célula-tronco pode nos abrir novas perspectiva para o tratamento desta doença, visando à melhora da qualidade de vida dos mesmos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 ANIMAIS

Este projeto de doutorado foi aprovado pelo comitê de ética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, conforme o documento em anexo.

Os camundongos *mdx* foram mantidos no Biotério do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) em gaiolas plásticas forradas com maravalha de pinus autoclavadas, em ambientes climatizados com temperatura controlada a 21ºC e ciclo de iluminação de 12 em 12 horas. Em cada gaiola havia no máximo 6 animais da mesma idade. Os animais receberam ração[1] e água filtrada em bebedouros com canudo longo.

4.2 CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA

As células-tronco de polpa dentária humana (CTPD) obtidas de acordo com protocolo descrito em Kerkis et al., (2006) foram cultivadas em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium/F12* (DMEM/F12 – LGC Biotecnologia, SP, Brasil) contendo 15% de soro fetal bovino definido (SFBd – Hyclone), 1100 U/mL /estreptomicina 100 μg/mL de Penicilina/Estreptomicina (LGC Biotecnologia), 1% de L-glutamina (Invitrogen, CA, USA) e 1% de aminoácidos não essenciais (MEM NEAA – Invitrogen). Este meio foi chamado de DMEM completo (DMEMc).

As células foram mantidas em estufa a 37° C com atmosfera úmida contendo 5% de gás carbônico (CO_2).

Para facilitar o rastreamento destas células após o transplante, as mesmas foram transduzidas com retrovírus recombinante carregando o gene repórter, *Enhanced Green*

[1] Nuvital, Estrada da Ribeira, 3001, km 03, Colombo-PR, Brasil

Fluorescent Protein (EGFP) gentilmente doados pela Profa. Dra. Patrícia Cristina Baleeiro Beltrão Braga.

4.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Para o desenvolvimento do protocolo de terapia celular sob aquapuntura foram utilizados 22 camundongos *mdx*, machos, com idade de 4 a 6 semanas. Para tanto, os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os tratamentos:

A) Aquapuntura associada a células-tronco injeção em ponto falso (n=6);

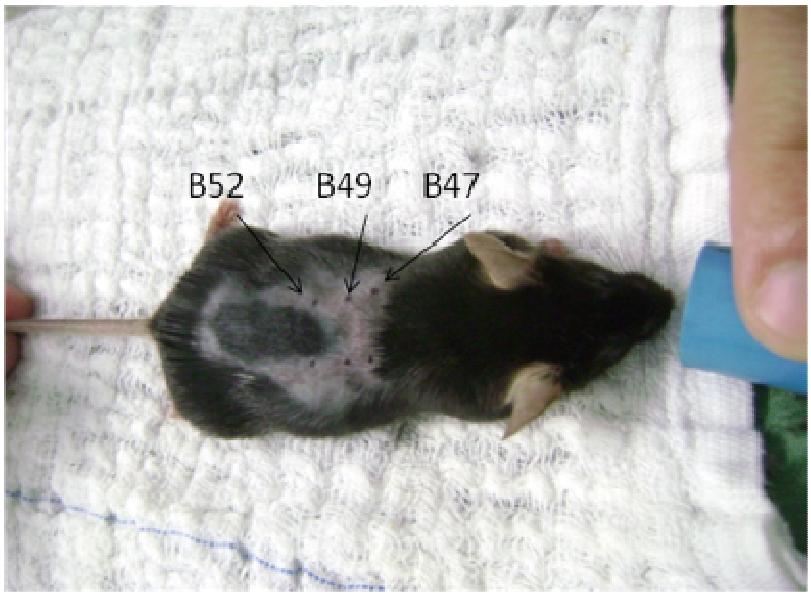
B) Aquapuntura placebo injeção de solução fisiológica (n=5);

C) Aquapuntura associada a células-tronco injeção em ponto verdadeiro (n=6);

D) Controle, sem tratamento (n=5).

O transplante no tratamento por aquapuntura em acupontos verdadeiros realizou-se pela administração de células-tronco nos pontos bexiga 47 (Hunmen), bexiga 49 (Yishe) e bexiga 52 (Zhishi), a cada três semanas (21 dias), com contenção química e anestesia inalatória através do halogenado Isofluorano a 3% (Cristália, São Paulo, Brasil), utilizando o sistema aberto com máscara de inalatória, favorecendo a contenção e auxiliando para a identificação do local de aplicação do transplante (Figura 4).

Figura 4- Camundongo *mdx* anestesiado por máscara com isofluorano



Fonte: (ESPER, G.V.Z, 2012).

Legenda: Camundongo *mdx* anestesiado com máscara com isofluorano. As setas pretas indicam os acupontos utilizados neste trabalho (B47, B49, B52) em área tricotomizada (setas pretas).

No tratamento A, a administração de $1x10^4$ células-tronco de polpa dentária na sétima passagem, por aquapuntura foi realizada em acupontos falsos, situados a 0,5 cm lateral dos verdadeiros.

No tratamento B, conhecido como placebo aplicou-se 0,02 mL de solução fisiológica nos acupontos verdadeiros após anestesia do animal.

No tratamento C, aplicou-se 0,02 mL de solução contendo $1x10^4$ células-tronco de polpa dentária nos acupontos verdadeiros, anatomicamente situados conforme Yin et al. (2008) em camundongo e Han et al. (2011) em rato.

O ponto Bexiga 47 está localizado na depressão lateral à borda caudal do processo espinhoso da décima vértebra torácica com aproximadamente 0,6 cm lateral no camundongo em relação ao processo espinhoso da vertebra.

Já, o ponto Bexiga 49 situa-se na depressão lateral do processo espinhoso da décima segunda vértebra torácica, também com aproximadamente 0,6 cm lateral no camundongo adulto em relação ao processo espinhoso da vértebra. A localização do acuponto Bexiga 52 é na depressão lateral do processo espinhoso da segunda vértebra lombar também com

aproximadamente 0,6 cm lateral no camundongo adulto em relação ao processo espinhoso da vértebra.

No tratamento D nada foi aplicado para a verificação da progressão da distrofia muscular com o passar da idade destes animais até completarem os 56 dias do experimento.

Convém ressaltar que tanto a injeção de células como os outros tratamentos foram feitos com intervalo de 21 dias em um total de 56 dias.

4.4 AVALIAÇÃO DOS CAMUNDONGOS *MDX* SOB A TERAPIA CELULAR

Os animais foram avaliados em quatro momentos: momento inicial (M1) uma semana antes de começar os tratamentos, primeiro momento (M2) 10 dias após a primeira aplicação das células-tronco ou solução fisiológica, segundo momento (M3) 10 dias após a segunda aplicação das células-tronco ou solução fisiológica, terceiro momento (M4) 10 dias após a terceira aplicação das células-tronco ou solução fisiológica.

As avaliações da eficiência do tratamento relacionadas ao grau das lesões musculares dos camundongos *mdx* dos diferentes grupos foram aferidas pela força de tração dos membros torácicos, avaliação clínica do parâmetro bioquímico sérico da creatinofosfoquinase, por análise do padrão histológico do músculo tibial cranial, rim, fígado, baço e diafragma e ensaios imuno-histoquímicos do músculo tibial cranial e do diafragma.

4.4.1 Avaliação de força da tração dos membros torácicos

Para a avaliação de força dos membros torácicos dos animais submetidos aos diferentes tratamentos foi realizado o teste do fio. Para tanto, um aparato foi construído onde uma corda de metal revestida de plástico foi suspendida por uma haste com uma altura de 35

cm da base e os camundongos foram suspensos neste fio individualmente, conforme mostra figura 5 (Van PUTTEN et al., 2011). Os animais foram analisados até a queda por 4 vezes consecutivas e, para uma maior acurácia destas análises o teste foi gravado por meio de filmagem.

Figura 5- Camundongo *mdx* submetido ao teste do fio para análise da força dos seus membros torácicos

Fonte: ESPER, G. V. Z. (2012)

Legenda: No teste de força representado, o camundongo fica suspenso em um fio de aço revestido pelos membros torácicos e a força que ele empenha para deslizar sobre o fio é monitorada com o objetivo de avaliar os tratamentos utilizados neste trabalho.

Além disso, para melhorar ainda mais os parâmetros a serem analisados, foi desenvolvida uma escala de avaliação para a quantificação da força do membro torácico destes animais através dos seguintes itens:

- Quantidade de vezes que o animal ergue o corpo sobre o fio.
- Número de vezes que caminha sobre o fio com os membros torácicos.
- Número de vezes que coloca o membro pélvico sobre o fio.
- Quantidade de tempo que fica suspenso sobre o fio.

Visando à quantificação dos itens acima foram atribuídos os pontos para cada item com a avaliação por três pessoas que desconheciam os tratamentos aos quais os camundongos foram submetidos (Tabela 1).

Tabela 1 – Escala de avaliação da força dos membros torácicos para os camundongos *mdx* tratados submetidos ao teste do fio, São Paulo, 2012

Quantidade/Tempo	0 – 0 / 9 s	1 a 3 vezes/ 10–20s	4 ou > vezes/ 21 s >
Barra	0 ponto	1 ponto	2 pontos
Caminha sobre o fio	0 ponto	1 ponto	2 pontos
Coloca o membro pélvico no fio	0 ponto	1 ponto	2 pontos
Tempo sobre o fio	0 ponto	1 ponto	2 pontos

Fonte: Adaptado de Van PUTTEN et al., 2011

Em seguida, a força foi qualificada e essa qualificação dos resultados está descrita na tabela 2. Os resultados obtidos nos diferentes tratamentos e nos momentos 0 (M0), 1 (M1), 2 (M2) e 3(M3) foram plotados em um gráfico utilizando o programa Graphpad®.

Tabela 2 - Qualificação de força com o intervalo de pontos para os camundongos *mdx*, São Paulo, 2012

Análise de força	Fraco (1)	Mediano (2)	Forte (3)
Intervalo de classificação em pontos	0-2	3-5	6-8

Fonte: ESPER, GVZ (2012)

4.4.2 Avaliação da creatinofosfoquinase sérica

Para a avaliação do desgaste muscular dos animais tratados, foi realizada a dosagem sérica da enzima creatinofosfoquinase (CPK). Para tanto, realizou-se a coleta de sangue com agulha hipodérmica de 0,45 mm x 13 mm, procedeu-se a perfuração da veia facial seguida de coleta de gotas de sangue com a pipeta Pasteur. O sangue foi acondicionado em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos, posteriormente o plasma foi separado e mantido em freezer – 20ºC até o momento da realização do exame.

As amostras foram diluídas numa proporção de 1:100 e analisadas cineticamente pelo kit CK-NAC (Randox Laboratories, Londres, Inglaterra) e em analisador bioquímico (Biotek Powerwave espectrofotômetro XS; o programa o KC4 (v 3,4)) no Laboratório da Clínica do Hospital Veterinário da FMVZ-USP.

4.4.3 Análise histológica

Os camundongos foram eutanasiados, para a realização da biópsia por câmera de gás de CO_2 no 56° dia de tratamento, seguindo recomendações do Comitê de Ética em Pesquisa

Após eutanásia, baço, fígado, diafragma, músculo tibial cranial e rim foram congelados e fixados em paraformaldeído a 4%. As amostras fixadas no paraformaldeído foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, posteriormente diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. Em seguida, realizou-se secções de aproximadamente 5 µm de espessura com o uso de micrótomo (Leica RM-2065). As secções foram coradas com as colorações convencionais hematoxilina-eosina (HE), tricrômio de Masson para fotos ilustrativas e picrosírius para morfometria do colágeno.

Foi avaliada a presença de fibras musculares regenerativas e degenerativas após coloração com HE. Para a quantificação do processo regenerativo foi contado 300 células, com aspecto degenerativo e regenerativo em 10 cortes não sequenciais, utilizou-se microscopia de luz com objetiva de 20x.

Para a avaliação da morfometria do colágeno 10 cortes não sequenciais corados com Picrosirius sem fundo foram realizados e as amostra foram analisadas e fotomicrografadas pela microscopia de luz (microscópio Olympus BX60, Tókio, Japão) acoplada a uma câmera (Axio Cam HRc).

Na quantificação do colágeno, foram padronizadas 6 fotos de cada corte, na lente objetiva de 40x. As fotos foram tiradas em forma de cruz, sendo 3 verticais (V1 a V3), 2 horizontais (H1 e H2) e 1 foto central, de maneira que uma foto não sobrepusesse o campo da outra foto. Após isso, a imagem foi tratada e analisada em um programa específico do software Zeiss® KS 400 (Carl Zeiss Microscopy**,** NY, USA).

A quantidade de colágeno em cada campo foi medida em unidade de área (μm^2). O valor obtido nos treze campos de cada corte foi somado e, posteriormente foi encontrada a média e o desvio padrão, visando uma análise mais acurada deste experimento.

4.4.4 Análise imuno-histoquímica

A análise pela técnica de imuno-histoquímica foi realizada com amostras parafinizadas. Para tanto, o material parafinizado foi cortado com aproximadamente 5 µm, no sentido transversal dos músculos e afixados em lâminas silanizadas para microscopia. Primeiramente, os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em série decrescente de etanol. Posteriormente, foram fervidos em tampão citrato (0,384g de ácido cítrico mono-hidratado; 2,352g de citrato de sódio tribásico di-hidratado; 1L de água destilada, pH 6,0) em forno micro-ondas por 3 vezes de 5 minutos para desmascaramento de antígenos. Após esfriar em temperatura ambiente, foi adicionada solução de peróxido de hidrogênio a 3% em álcool etílico para bloquear as reações inespecíficas. Em seguida, as lâminas foram lavadas, por 3 vezes a cada 5 minutos, com PBS a 1M. Foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas com *Protein Block* ((DAKO®, Glostrup, Denmark) por 45 minutos em câmara úmida, e na sequência foram lavadas com PBS. O anticorpo primário específico (ab3149-abcam®, cidade, pais) ou (ab290-abcam®, cidade, pais) foi incubado, de acordo com a diluição recomendada pelo fabricante, em um dos cortes da lâmina. Na mesma lâmina, em

outro corte, adicionou-se PBS para assegurar um controle de marcação. Estas lâminas permaneceram *overnight* em câmera úmida à 4°C na geladeira. No dia seguinte, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS, e o anticorpo secundário biotina estreptavidina ($LSAB^+$ - DAKO®) foi adicionado nos dois cortes de cada lâmina, por 45 minutos à temperatura ambiente. A revelação foi realizada pelo Kit DAB^+ (DAKO®), e as lâminas contra coradas com hematoxilina e novamente desidratadas com uma sequência de álcoois e xilol.

Já para a imunofluorescência foram utilizadas as amostras congeladas dos músculos tibial cranial e diafragma, cortadas transversalmente no criostato (Leica) com aproximadamente 10 µm e em seguidas afixadas em lâminas silanizadas para microscopia. As amostras foram fixadas com acetona a 100% por 20 minutos e em seguida lavadas com PBS por 3 vezes de 5 minutos cada. Posteriormente, o anticorpo primário antidistrofina (ab3149-abcam®, Cambridge, Reino Unido) foi diluído (1:100) em albumina de soro bovino à 1% (BSA) e adicionado sobre os cortes que foram acondicionados em câmera úmida *overnight* na geladeira à 4ºC. Após esse tempo foram lavados com PBS por 3 vezes 5 minutos cada e o anticorpo secundário fluorescente anti-rabbit IgG-NL557 (NorthernLights™ - R&d-Systems, Minneapolis, USA) (1:200) diluído em BSA à 1% foi adicionado e mantido em câmara escura por 60 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram lavadas com PBS por 5 vezes 5 minutos cada e montadas em Vectashield com DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA). Está mesma técnica foi utilizada para o eGFP (ab290-abcam®) nas diluições (1:200;1:500; 1:1000 e 1:3000) diluídas em BSA à 1%.

A imuno-histoquímica foi avaliada de maneira quantitativa, contando-se por microscopia, microscópio de epifluorescência Eclipse 80i (Nikon, Tókio, Japão), 300 células num campo de aumento de 200x, em 10 cortes não sequenciais, com a análise de 3 campos por corte. As células musculares que apresentavas fluorescência eram ditas como positivas e as não fluorescentes, negativas, levando em consideração a presença somente do núcleo centralizado, seguindo protocolo descrito por Kayali et al. (2012).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software estatístico GraphPad InStat®, versão 3.01 para Windows 9537, CA, USA.

A normalidade da distribuição dos resultados foi verificada, utilizando-se teste de Kolmogorov e Smirnov para os testes de força e creatinofosfoquinase. Para a avaliação das diferenças entre as medianas, foi realizado o teste não paramétrico de Kruskall Wallis para amostras dependentes e para comparação de cada variável utilizou-se o teste de Dunn. Já, para a avaliação entre as médias para variáveis dependentes foi realizado o teste estatístico Anova, em seguida, a comparação de cada variável pelo teste de Tukey. Em todos os resultados foram consideradas significantes as análises que apresentaram $p \leq 0,05$ e foram consideradas como significância biológica as amostras que apresentaram o p entre 0,05 e 0,10.

Para a análise da expressão da distrofina e do colágeno, utilizou-se múltiplas comparações estatísticas entre grupos foram realizadas por ANOVA, com Bonferroni *t* -teste correção pós-hoc para permitir uma melhor avaliação da variabilidade intra e intergrupal e evitar falso positivo, forma consideradas as análises que apresentaram $p \leq 0,05$ e $p \leq 0,001$.

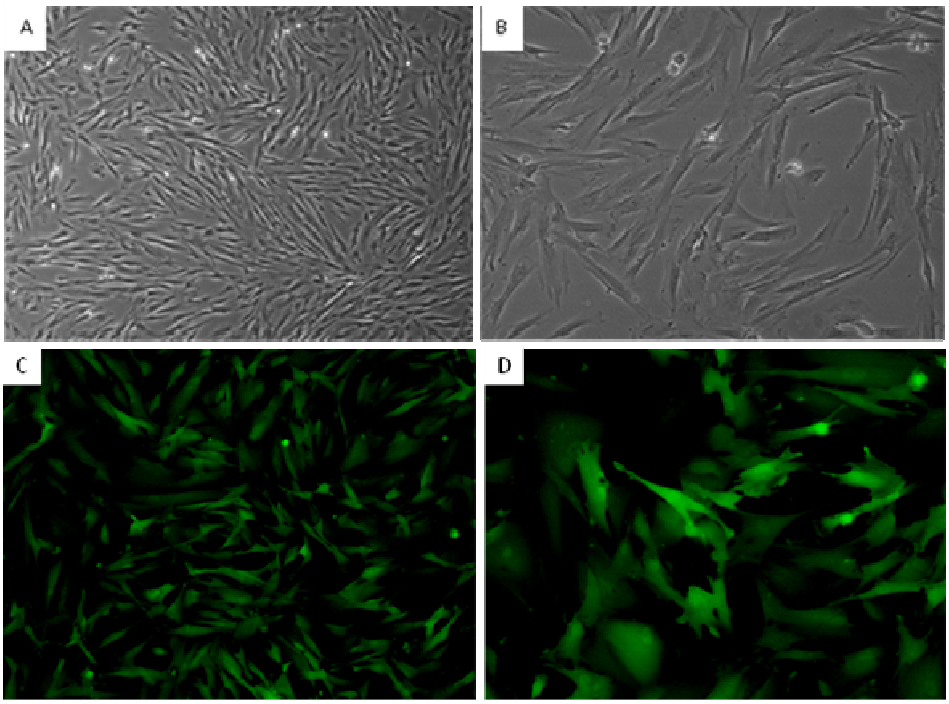
5 RESULTADOS

5.1 CULTIVO DAS CÉLULAS-TRONCO DE POLPA DENTÁRIA HUMANA

As células foram expandidas e o tratamento foi realizado com as células na passagem 7 (P7). Observa-se na figura 1 a morfologia fibroblastóides, alongadas, fusiformes, pontiagudas e com núcleo grande central das CTPD (Figura 6A e B), condizentes com a morfologia de células-tronco mesenquimais. Neste projeto não houve necessidade de caracterização destas células uma vez que estes resultados já foram bem descritos em Kerkis et al., 2006 e Beltrão-Braga et al., 2011.

As células-tronco foram tranduzidas com EGFP e o resultado da expressão da proteína fluorescente verde pode ser visualizado nas figuras 6C e D.

Figura 6- Fotomicrografia das células-tronco de polpa dentária humana



Fonte: (ESPER, G.V.Z, 2012)

Legenda: Em (A) notar células bem aderidas e com boa confluência. Em (B) notar a morfologia fibroblastóide das células. Em C e D observam-se a fluorescência por EGFP. A) aumento de 4x; B, C) 10x; D) 20x.

5.2 AVALIAÇÃO DA FORÇA DE TRAÇÃO DOS MEMBROS TORÁCICOS

Para a avaliação de força de tração dos membros torácicos fez-se a análise por vídeo em cego, na qual três pessoas que não tinham conhecimento dos tratamentos somaram as características, conforme mostrado na Tabela 1, onde se qualificou a força conforme a Tabela 2, previamente descritas no item material e método. Em seguida, os dados foram obtidos para os diferentes tratamentos e fez-se a análise estatística (Tabela 3) Além disso, a frequência da força foi plotada nos gráficos abaixo pelo programa *Graphpad* em quatro momentos (Gráfico 1, 2, 3, 4).

Segundo a análise estatística, os resultados dos momentos 0 (sete dias antes de começar as aplicações dos tratamentos), 1 (10 dias após a primeira aplicação dos tratamentos), 2 (10 dias após a segunda aplicação dos tratamentos), 3 (10 dias após a terceira aplicação dos tratamentos), não demonstraram análise estatística significativa para a qualidade de força em relação aos tratamentos, mas no momento 4 os tratamentos placebo e acupontos verdadeiros obtiveram uma significância biológica ($p<0,1$).

Tabela 3 - Avaliação da qualidade da força muscular comparando os tratamentos A) ponto falso, B) placebo, C) ponto verdadeiro, D) controle e entre os momentos 1) sete dias antes do tratamento, 2) 10 dias após o primeiro transplante de células-tronco (CT), 3) 10 dias após o segundo transplante de CT, 4) 10 dias após o terceiro transplante de CT nos camundongos *mdx* – São Paulo – 2012.

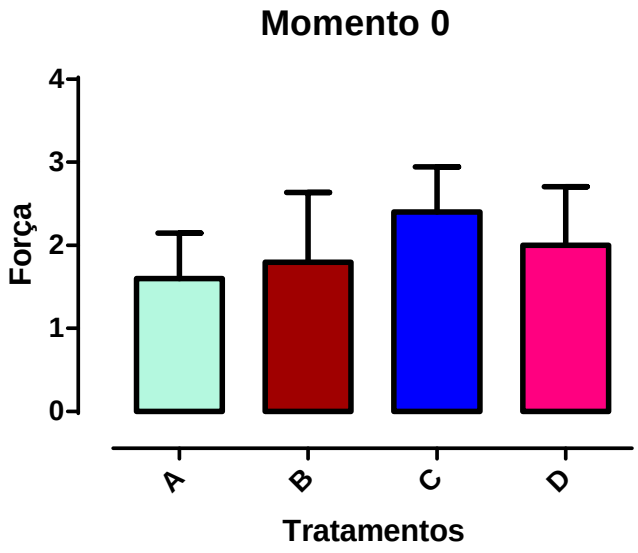
Momentos		Tratamentos				
		A (n=6)	B (n=5)	C (n=6)	D (n=5)	p
0	Mediana	1,5aA	2aA	2aA	2aA	0,19
	Mín-Máx	(1-2)	(1-3)	(2-3)	(1-3)	
1	Mediana	1,5aA	1 aA	3aA	2aA	0,10
	Mín-Máx	(1-3)	(1-3)	(2-3)	(1-3)	
2	Mediana	2aA	2aA	3aA	2aA	0,21
	Mín-Máx	(1-3)	(1-3)	(2-3)	(2-3)	
3	Mediana	2aA	3aA	3aA	2aA	0,08
	Mín-Máx	(1-3)	(2-3)	(2-3)	(2-2)	
	p	0,63	0,13	0,39	0,94	

Fonte: (ESPER, G. V. Z, 2012)

Legenda: Letras minúsculas não coincidentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos, num mesmo momento. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna não indicam diferença significativa entre os momentos dentro de cada grupo ($p<0,05$). Qualidade da força (1) fraco, (2) mediano, (3) forte.

No Gráfico 1 demonstrou-se os resultados da avaliação de força de tração dos membros torácicos no momento 0. Observou-se certa homogeneidade nos tratamentos e a análise estatística não foi significativa entre os tratamentos com $p<0,05$.

Gráfico 1 - Frequência da força de tração dos membros torácicos dos camundongos *mdx*, no momento 0, com sete dias antes do transplante de CTPD

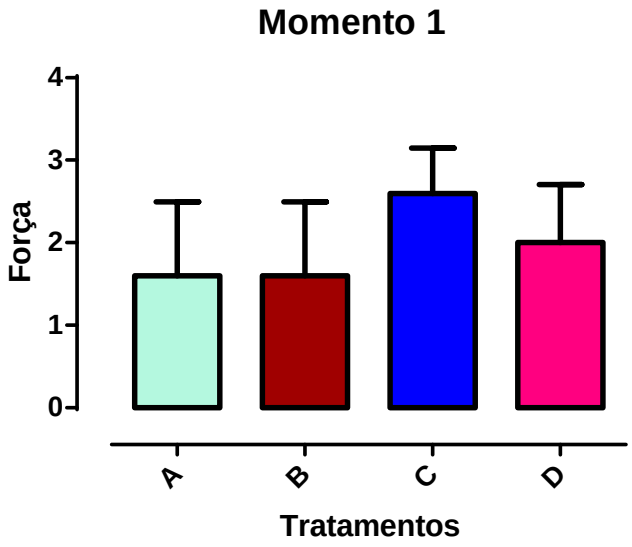


Fonte: (ESPER, G. V. Z., 2012)

Legenda: Em A) células-tronco em acupontos falsos, B) solução fisiológica em acupontos, C) células-tronco em acupontos verdadeiros, D) controle.

No decorrer dos momentos 1 e 2, que caracterizam 10 dias após a primeira e a segunda aplicação de CTPD, respectivamente, observamos um maior aumento da força de tração no tratamento ponto verdadeiro, evidenciado nos Gráficos 2 e 3 e não se comprovou uma diferença estatística.

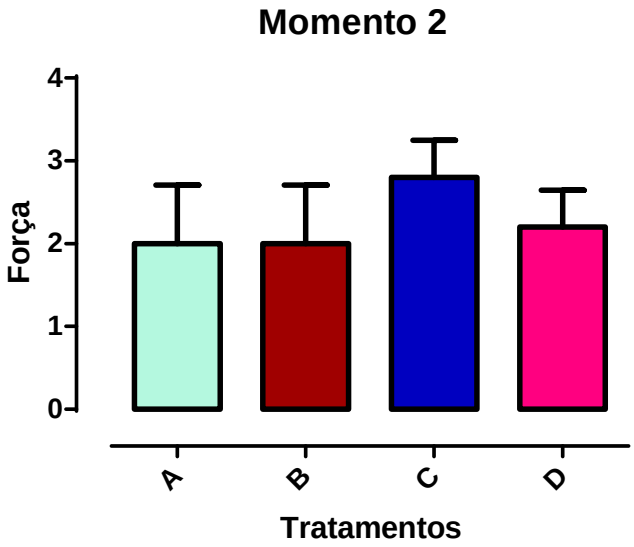
Gráfico 2 - Frequência da força de tração dos membros torácicos dos camundongos *mdx* no momento 1, após 10 dias do primeiro transplante de CTPD.



Fonte: (ESPER, G. V. Z, 2012)

Legenda: A) células-tronco em acupontos falsos, B) solução fisiológica em acupontos, C) células-tronco em acupontos verdadeiros, D) controle.

Gráfico 3 - Frequência da força de tração dos membros torácicos dos camundongos *mdx* no momento 2, após 10 dias do segundo transplante de CTPD.

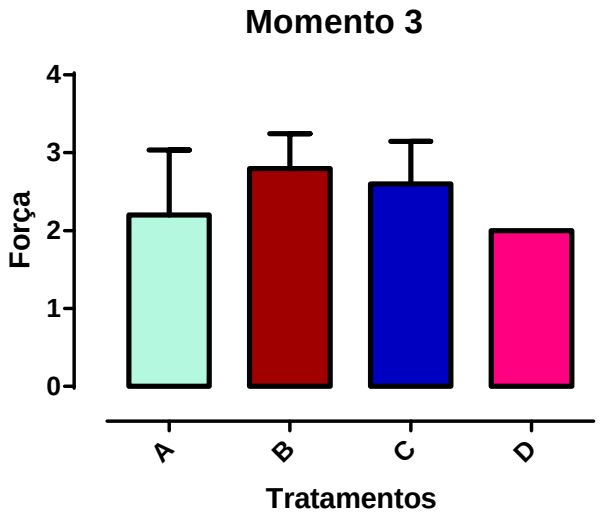


Fonte: (ESPER, G. V. Z, 2012)

Legenda: A) células-tronco em acupontos falsos, B) solução fisiológica em acupontos, C) células-tronco em acupontos verdadeiros, D) controle.

E, finalmente, no momento 3 (Gráfico 4) após 10 dias da terceira aplicação de CTPD, os tratamentos B e C assemelham-se na força de tração e na significância biológica apresentando $p<0,1$, conforme Tabela 3.

Gráfico 4 - Frequência da força de tração dos membros torácicos dos camundongos *mdx*, no momento 3 após 10 dias do terceiro transplante de CTPD.



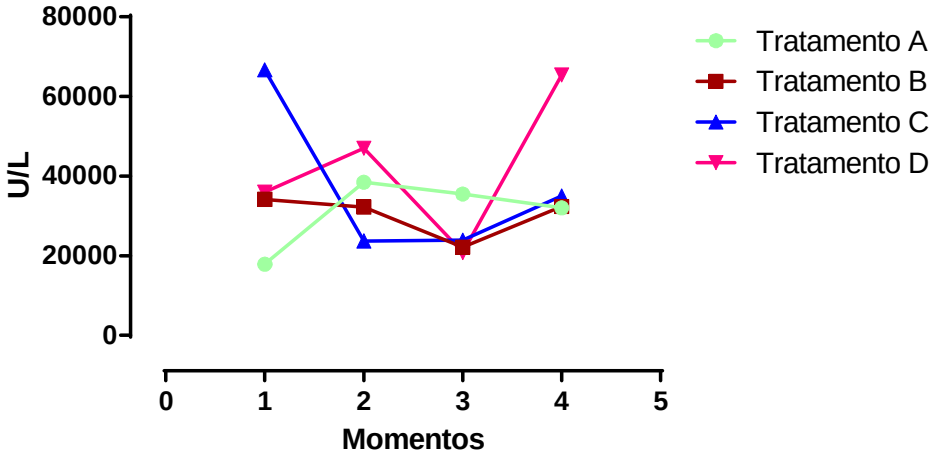
Fonte: (ESPER, G. V. Z, 2012)

Legenda: Em A) células-tronco em acupontos falsos, B) solução fisiológica em acupontos, C) células-tronco em acupontos verdadeiros, D) controle.

5.3 AVALIAÇÃO DA CREATINOFOSFOQUINASE

Na avaliação da creatinofosfoquinase (CPK) verificou-se um aumento gradativo dos tratamentos controle e ponto falso, mas o ponto falso diminuiu seus teores sorológicos na quarta avaliação. Para o tratamento placebo, houve uma diminuição até a terceira avaliação, o que não foi observado no tratamento ponto verdadeiro, pois continuou com níveis mais baixos da CPK (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Média da avaliação sorológica da creatinofosfoquinase nos camundongos *mdx* sob os tratamentos.



Fonte: (ESPER, G. V. Z, 2012)

Legenda: Nos momentos (1) sete dias antes do experimento, (2) 10 dias após primeiro transplante de células-tronco (CT), (3) 10 dias após o segundo transplante de CT, (4) 10 dias após o terceiro transplante de CT.

Na análise estatística pode-se comprovar uma significância ($p \leq 0,05$) no momento 4, entre o tratamento controle que assumiu um aumento da creatinofosfoquinase em relação aos outros tratamentos (Tabela 4).

Na diferença entre os momentos há uma significância biológica no tratamento acupontos verdadeiros ($p < 0,1$), mostrando diminuição da creatinofosfoquinase sérica no decorrer do período dos tratamentos e posterior equilíbrio entre eles.

Tabela 4 - Valores da creatinofosfoquinase sérica (U/L) comparando os diferentes tratamentos em camundongos *mdx* – São Paulo – 2012.

Momentos		Grupos				
		A (n=6)	B (n=5)	C (n=6)	D (n=5)	p
1	Média	1640,3aA	3437,8aA	3246,7aA	2920,8aA	0,22
	Desv pad	(±301,6)	(±1779,9)	(±1513,4)	(±1162,8)	
2	Média	3420,8aA	3224,2aA	2215,2aA	3237,6aA	0,10
	Desv pad	(±2755,8)	(±1533,6)	(±396,98)	(±993,75)	
3	Média	5707,3aA	2156,3aA	2203,7aA	3204,3aA	0,16
	Desv pad	(±4989,5)	(±812,92)	(±826,45)	(±1366,5)	
4	Média	3595aA	4698aA	2085,8aA	6545bA	0,006
	Desv pad	(±2717,3)	(±2031,7)	(±401,63)	(±2659,4)	
	p	0,93	0,52	0,06	0,20	

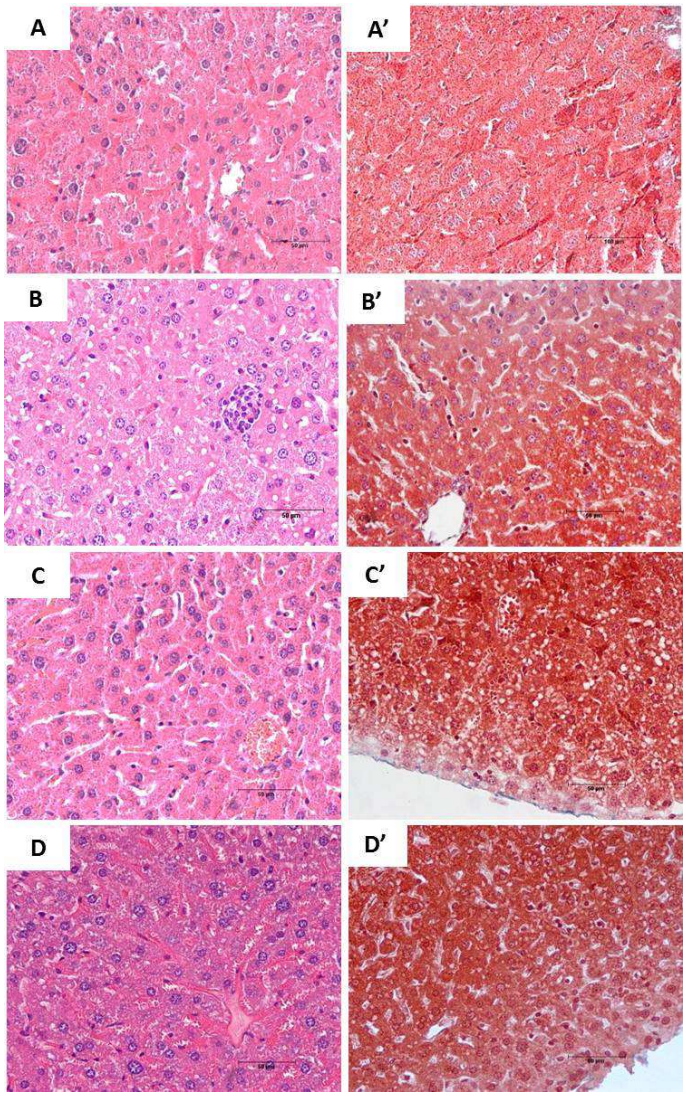
Fonte: (ESPER, G. V. Z, 2012)

Legenda: Momentos: 1) sete dias antes do experimento, 2) 10 dias após o primeiro transplante de células-tronco (CT), 3) 10 dias após o segundo transplante de CT, 4) 10 dias após o terceiro transplante de CT. Tratamentos: A) ponto falso, B) placebo, C) ponto verdadeiro e D) controle. Letras minúsculas não coincidentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos, num mesmo momento. Letras maiúsculas iguais na mesma coluna, não indicam diferença significativa entre os momentos dentro de cada grupo.

5.4 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Na avaliação histológica do parênquima hepático não foram observadas diferenças microscópicas dos seus componentes histológicos nos tratamentos realizados dos camundongos *mdx* (Figura 7).

Figura 7 - Fotomicrografia do fígado de camundongo *mdx*, após tratamento.

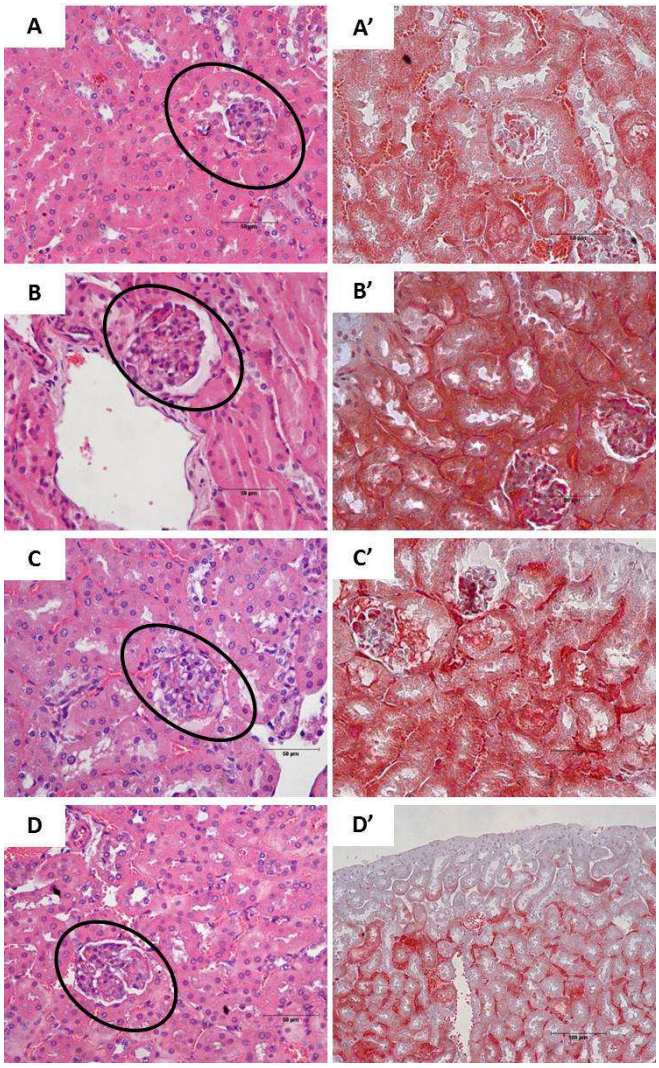


Fonte: (ESPER, G. V. Z, 2012)

Legenda: Os animais submetidos aos diferentes tratamentos foram eutanasiados após o período de 56 dias de experimento e com 3 transplantes de CTPD. A) ponto falso, B) tratamento placebo, C) ponto verdadeiro, D) controle. (A, B, C, D) coloração hematoxilina-eosina, (A', B', C', D') coloração tricrômio de Masson. Notar que não existem diferenças histológicas entre os tratamentos avaliados.

Na figura 8 observou-se que a organização renal nos tratamentos não demonstrou alteração estrutural na camada cortical e medular.

Figura 8- Fotomicrografia do rim de camundongo *mdx* submetidos aos diferentes tratamentos.

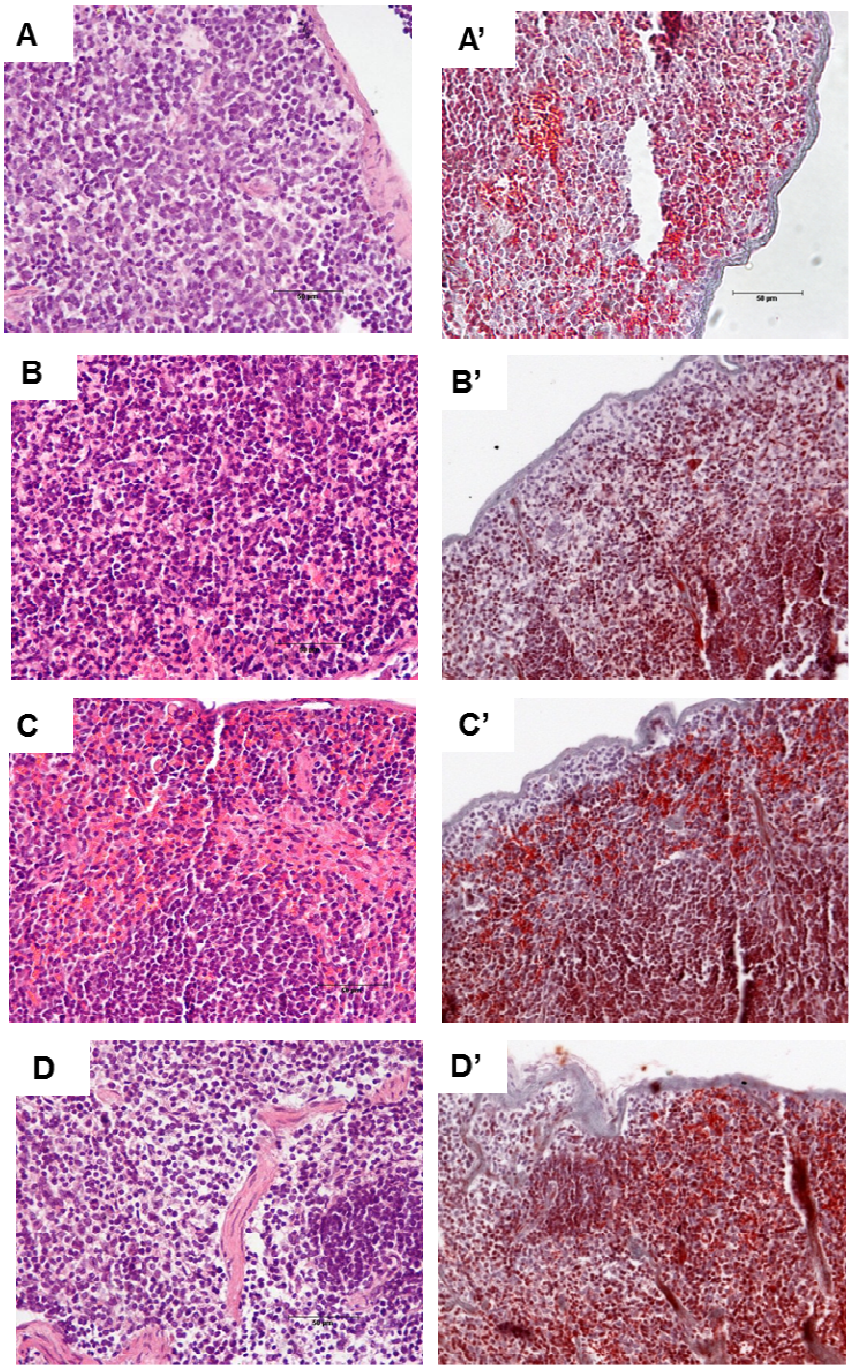


Fonte: (ESPER, G. V. Z, 2012)

Legenda: Os animais submetidos aos diferentes tratamentos foram eutanasiados após o período de 56 dias de experimento e com 3 transplantes de CTPD. A) ponto falso, B) placebo, C) ponto verdadeiro, (D) controle. (A, B, C, D) coloração hematoxilina-eosina, (A', B', C', D') coloração tricrômio de Masson. Os círculos em preto indicam os glomérulos renais. Observe que não houve nenhuma alteração morfológica deste órgão em todos os animais avaliados.

A Figura 9 mostra a avaliação histológica do parênquima esplênico que não apresentou alteração microscópica evidente entre os tratamentos.

Figura 9 - Fotomicrografia do baço de camundongo *mdx*, após tratamentos.

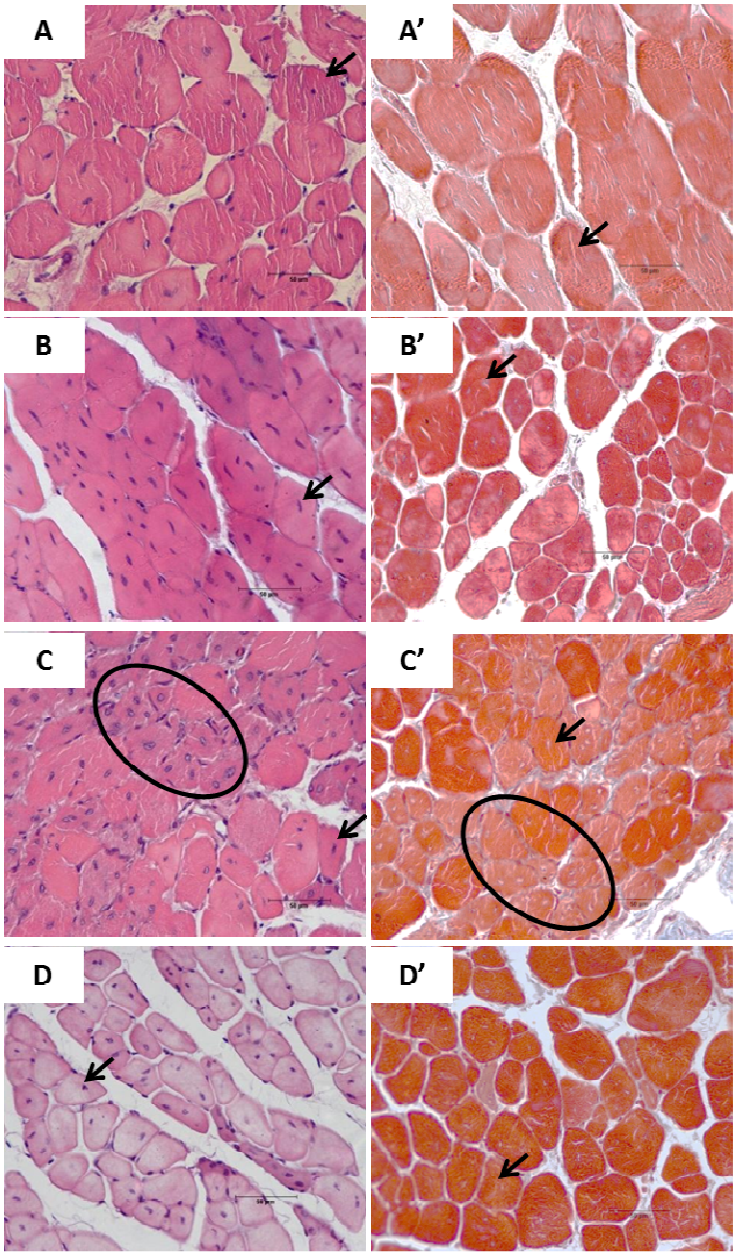


Fonte: (ESPER, G. V. Z, 2012)

Legenda: Os animais submetidos aos diferentes tratamentos foram eutanasiados após o período de 56 dias de experimento e com 3 transplantes de CTPD. A) ponto falso, B) placebo, C) ponto verdadeiro e D) controle. (A, B, C, D) coloração hematoxilina-eosina, (A', B', C', D') coloração tricrômio de Masson.

Já, nas Figuras 10 e 11 temos a avaliação histológica dos músculos tibial cranial e diafragma em todos os tratamentos. Foram observados núcleos das miofibrilas centralizados e processo de regeneração com núcleos periféricos, com diferença de tamanho entre as células.

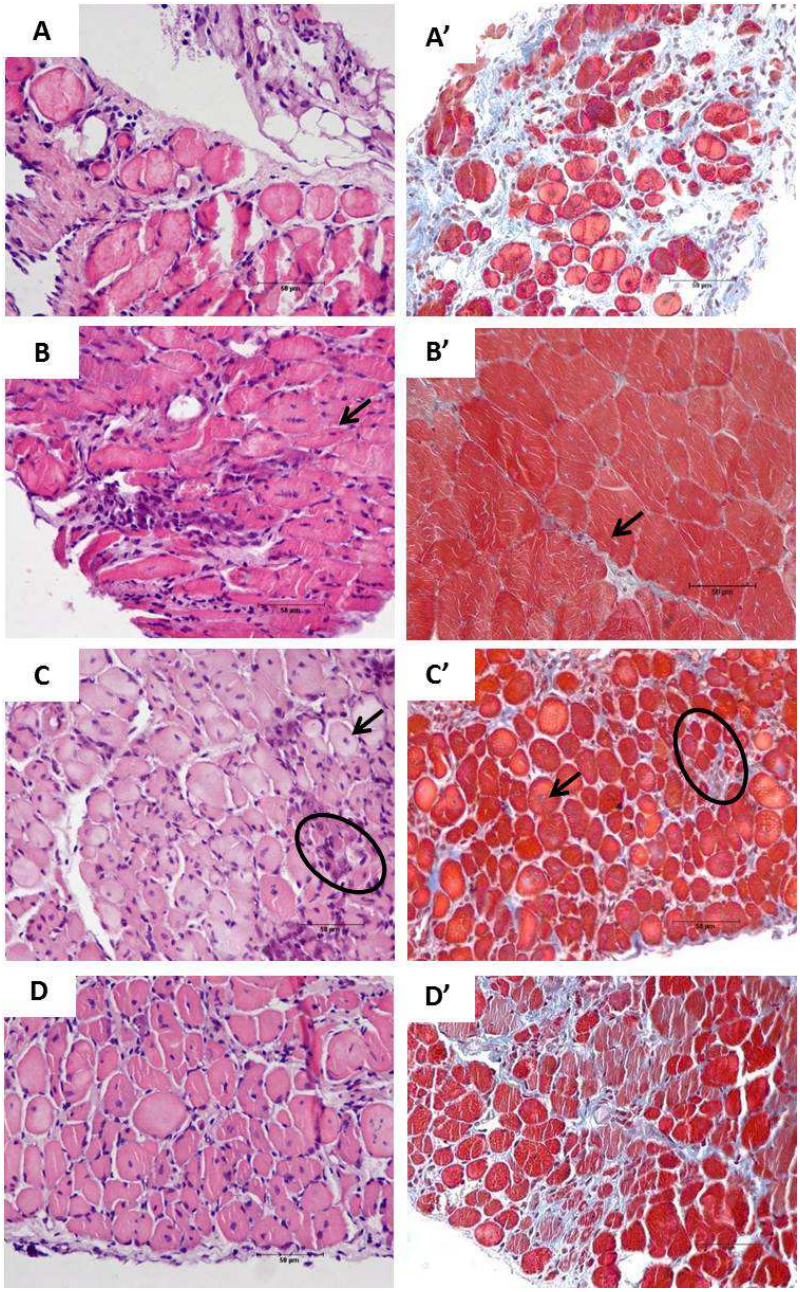
Figura 10 - Fotomicrografia do músculo tibial cranial de camundongo *mdx*, após tratamentos.



Fonte: (ESPER, G. V. Z, 2012)

Legenda: Os animais submetidos aos diferentes tratamentos foram eutanasiados após o período de 56 dias de experimento e com 3 transplantes de CTPD. A) ponto falso, B) placebo, C) ponto verdadeiro e D) controle. (A, B, C, D) coloração hematoxilina-eosina, (A', B', C', D') coloração tricrômio de Masson. Período de 56 dias de experimento. As setas pretas indicam os núcleos das miofibrilas cetralizados e os círculos pretos mostram as células com tamanhos diferentes.

Figura 11 - Fotomicrografia do diafragma de camundongo *mdx*, após tratamentos.



Fonte: (ESPER, G. V. Z,2012)

Legenda: Os animais submetidos aos diferentes tratamentos foram eutanasiados após o período de 56 dias de experimento e com 3 transplantes de CTPD. A) ponto falso, B) placebo, C) ponto verdadeiro e D) controle. (A, B, C, D) coloração hematoxilina-eosina, (A', B', C', D') coloração tricrômio de Masson. Período de 56 dias de experimento e com 3 tratamentos. Setas pretas indicam o núcleo da miofibrila centralizado e os círculos pretos mostram células com tamanhos diferentes.

Para a avaliação da concentração da regeneração das miofibrilas nos músculos tibial cranial e no diafragma dos camundongos *mdx* pode-se verificar uma diferença significativa somente no grupo tratado com células-tronco nos acupontos verdadeiros em relação ao controle, sem tratamento conforme a tabela 5.

Tabela 5 - Valores médios (%) e desvio-padrão da regeneração muscular dos músculos tibial cranial e diafragma comparando com os diferentes tratamentos em camundongos *mdx* – São Paulo – 2012.

Tratamentos	A (n=2)	B (n=2)	C (n=2)	D (n=2)
Músculo tibial cranial	7959,17 (±3906,63)a	4312,13 (±2377,2)a	6458,39 (±1598,82)a	32478,30 (±20550)b
Músculo diafragma	20409,80 (±12233.9)a	11449,81 (±11321,01)a	10563,9 (±9489.95)a	19487,26 (±12913.46)a

Fonte☹ ESPER, G. V. Z,2012)

Legenda: A) células-tronco em acupontos falso, B) solução fisiológica em acupontos verdadeiros, C) células-tronco em acupontos verdadeiro e D) controle, e entre os momentos Letras minúsculas não coincidentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos. $p<0,05$

As avaliações da morfometria dos músculos tibial cranial e diafragma foram realizados em dois camundongos *mdx*. Na análise estatística, pode-se verificar diferença estatística no tratamento D do músculo tibial cranial, com aumento significativo do colágeno em comparação aos outros tratamentos como mostrado na tabela 6.

Tabela 6 - Valores médios (μm^2) e desvio-padrão da morfometria do colágeno presente nos músculos tibial cranial e no diafragma, comparando com os diferentes tratamentos em camundongos *mdx* – São Paulo – 2012.

Tratamentos	A (n=2)	B (n=2)	C (n=2)	D (n=2)
Músculo tibial cranial	7959,17 (±3906,63)a	4312,13 (±2377,2)a	6458,39 (±1598,82)a	25629,51 (±18248,13)b
Músculo diafragma	20409.80 (±12233.9)a	11449.81 (±11240.9)a	10563.9 (±9489.95)a	19487.26 (±12913.46)a

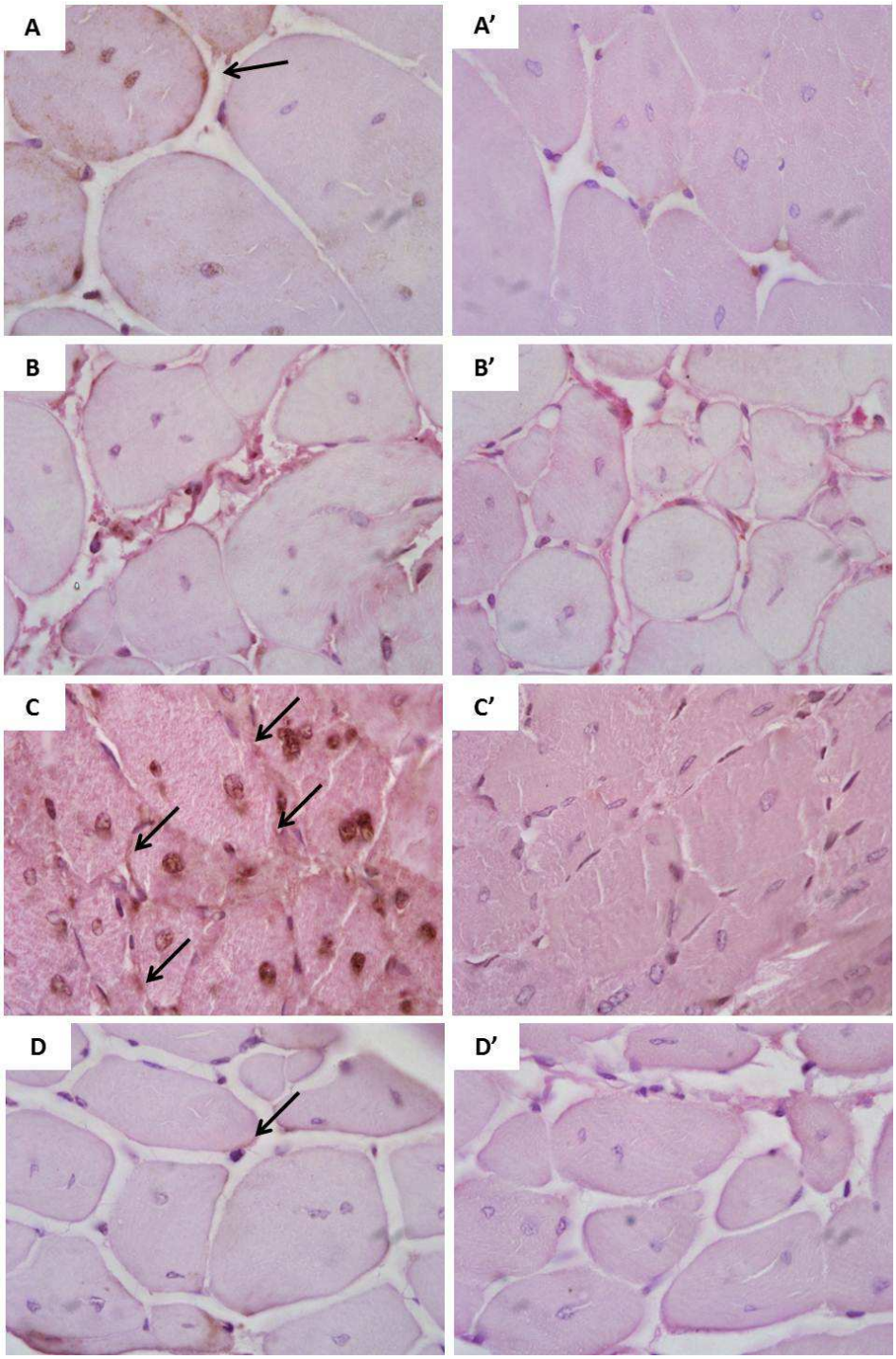
Fonte: (ESPER, G. V. Z,2012)

Legenda: Área total da objetiva de 40x: 149.774,611 μm^2. Legenda: A) células-tronco em acupontos falso, B) solução fisiológica em acupontos verdadeiros, C) células-tronco em acupontos verdadeiro e D) controle, e entre os momentos. Letras minúsculas não coincidentes na mesma linha indicam diferença estatística entre os grupos. $p<0,001$

5.5 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Na avaliação imuno-histoquímica em tecido parafinizado, utilizando o anticorpo antidistrofina, observou-se uma imunorreatividade ao anticorpo nos cortes histológicos do músculo tibial cranial dos camundongos *mdx* de forma menos intensa nos tratamentos com ponto falso e controle (Figura 12A e D), com maior intensidade no ponto verdadeiro (Figura 12C). No entanto, não se observou marcação positiva no tratamento placebo (Figura 12B).

Figura 12- Fotomicrografia de imuno-histoquímica para antidistrofina do músculo tibial cranial de camundongo *mdx* após tratamento.

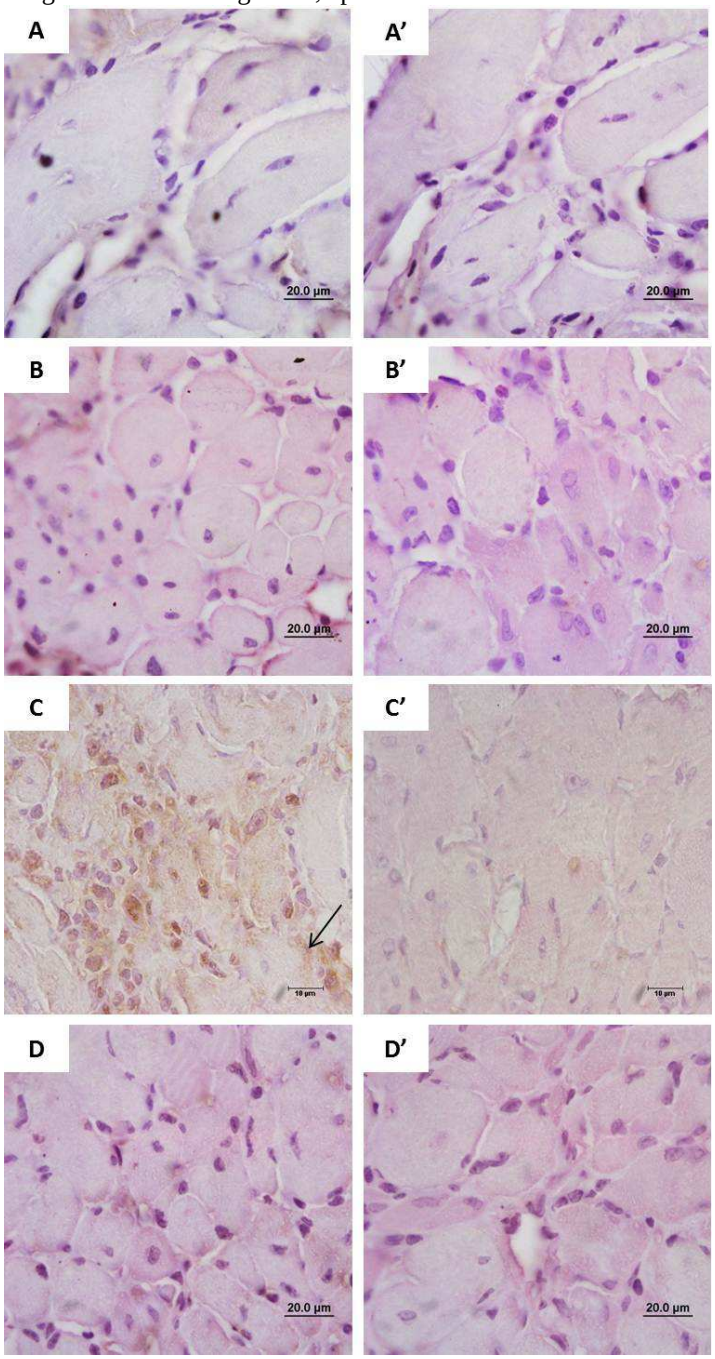


Fonte: (ESPER, G. V. Z,2012)

Legenda: Os animais submetidos aos diferentes tratamentos foram eutanasiados após o período de 56 dias de experimento e com 3 transplantes de CTPD. O músculo tibial dos camundongos foi removido, parafinizado e submetidos a protocolos de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo antidistrofina. A) ponto falso, B) placebo, C) ponto verdadeiro e D) controle. (A, B, C, D) positivo, (A', B', C', D') controle negativo da reação. Verificar setas apontando a marcação positiva para distrofina em A e com maior intensidade em C.

A figura 13 representa os resultados obtidos para o diafragma. Observou-se imunorreatividade somente no tratamento C.

Figura 13 - Fotomicrografia de imuno-histoquímica antidistrofina do diafragma de camundongo *mdx*, após tratamentos.



Fonte: ESPER, G. V. Z. (2012)

Legenda: Os animais submetidos aos diferentes tratamentos foram eutanasiados após o período de 56 dias de experimento e com 3 transplantes de CTPD. O diafragma dos camundongos foi removido, parafinizado e submetidos a protocolos de imuno-histoquímica utilizando o anticorpo antidistrofina. A) ponto falso, B) placebo, C) ponto verdadeiro e D) controle. (A, B, C, D) positivo, (A', B', C', D') controle negativo da reação. Período de 56 dias de experimento e com três tratamentos. As setas indicam a marcação positiva para distrofina em C.

Na imunofluorescência pode-se observar marcação antidistrofina em todos os grupos (Figura 14A-D), mas com maior concentração no músculo tibial cranial e nos tratamentos placebo (B) e células-tronco no acuponto verdadeiro (C) e sem diferença estatística ($p<0,05$) para o diafragma, conforme tabela 7.

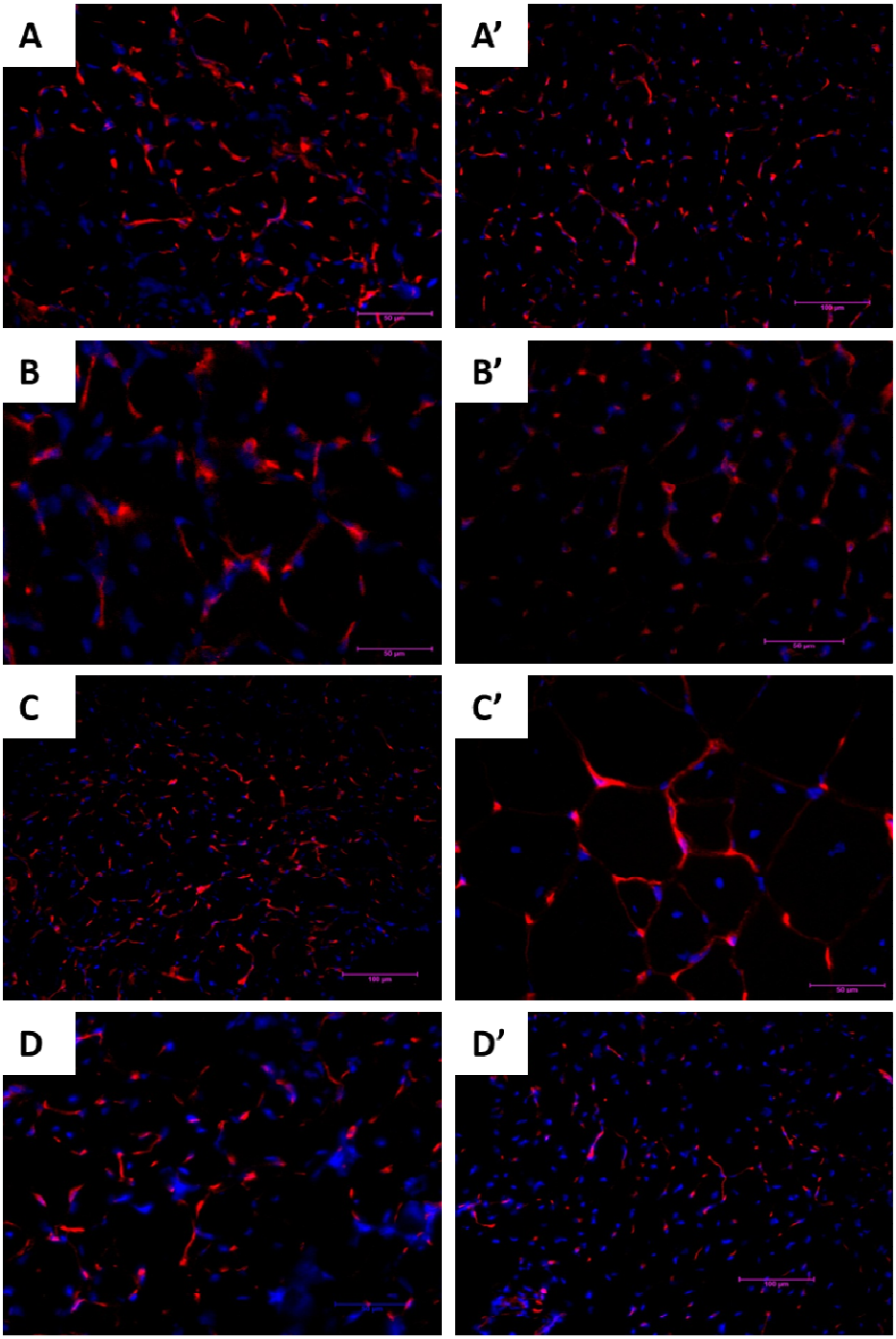
Tabela 7 - Valores médios e desvio-padrão da expressão da fluorescência do anticorpo antidistrofina no músculo tibial cranial e diafragma comparando com os diferentes tratamentos em camundongos *mdx* – São Paulo – 2012.

Tratamentos	A	B	C	D
Expressão da distrofina	(n=2)	(n=2)	(n=2)	(n=2)
Músculo tibial cranial	0,64(±0,014) a	0,705(±0,021) ab	0,77(±0,021) b	0,305(±0,021) c**
Diafragma	0,3675(±0,045)a	0,415(±0,091)a	0,495(±0,021)a	0,355(±0,049)a

Fonte: (ESPER, G. V. Z,2012)

Legenda: ** $p<0,001$

Figura 14 - Fotomicrografia de imuno-histoquímica antidistrofina do diafragma e do músculo tibial cranial de camundongo *mdx*, após tratamentos.



Fonte: (ESPER, G. V. Z, 2012)

Legenda: A) células-tronco em acupontos falsos, B) solução fisiológica em acupontos, C) células-tronco em acupontos verdadeiros, D) controle. (A, B, C, D) do músculo diafragma, (A', B', C', D') do músculo tibial cranial. Período de 56 dias de experimento e com três tratamentos. As setas em branco mostram a fluorescência em vermelho para distrofina. Em A, B, B', C'e D objetiva de 200x, em A', C e D' objetiva de 400x.

Na imunofluorescência com o anticorpo anti-GFP nos tecidos, não foi encontrada uma diluição correta, pois o tecido apresentava-se em todas as diluições (1:200, 1:500, 1:1000 e 1:3000) com uma autofluorescência, não detectando o rastreamento das células-tronco de polpa de polpa dentária humana aplicadas nos camundongos *mdx*.

6 DISCUSSÃO

Os camundongos *mdx* foram escolhidos por apresentarem semelhança com DMD em humanos, principalmente no que tange aos aspectos histológicos e bioquímicos (De LUCA et al., 2008; BURDI et al., 2009; KAYALI et al., 2012), parâmetros que foram avaliados durante os tratamentos propostos neste projeto. Vários trabalhos já foram publicados utilizando este modelo (De LUCA et al., 2008; WILLMANN et al., 2009; BURDI et al., 2009; KAYALI et al., 2012), o que possibilita um melhor entendimento da melhora clínica e laboratorial frente aos tratamentos.

Além disso, estes animais possuem uma pequena variabilidade fenotípica segundo Willmann et al. (2009), o que favorece uma melhor exatidão dos resultados entre os diferentes grupos estudados.

Até o momento, infelizmente não existe um modelo pré-clínico ideal para esta doença, pois o modelo *mdx* não manifesta um quadro sintomático tão intenso como a DMD em humanos (PASTORET; SEBILLE, 1995), entretanto ele facilita o entendimento da ação das terapias e proporciona uma possibilidade de estudo clínico em humanos.

A presente pesquisa estudou os efeitos dos tratamentos na musculatura do camundongo *mdx* de aproximadamente 30 dias de vida por um período experimental de 56 dias, para avaliar. Este período foi escolhido porque, de acordo com Tanabe et al. (1986), é o que corresponde à maior degeneração muscular no curso natural da doença e qualquer efeito regenerativo maior poderia ser atribuído aos tratamentos propostos.

Uma das terapias de escolha foi o uso das células-tronco de polpa dentária humana, pois de acordo com Kerkis et al. (2008) estas células possibilitaram uma possível fusão ao músculo em cães GRMD, com a expressão da distrofina em apenas um dos quatro animais tratados (KERKIS et al., 2008). Possivelmente este baixo resultado deve-se a um animal com alteração fenotípica mais branda que os demais cães (DUAN, 2011). Por isso, neste trabalho resolveu-se testar esta mesma terapia celular em um modelo mais homogêneo para a doença.

Além disso, a escolha deste tipo celular se deve também aos dados da literatura que mostram que estas células são fontes excelentes para o tratamento de doença, aliado ao fato da

mesma já ter sido bem caracterizada (KERKIS et al., 2008; KERKIS et al., 2006; GOMES et al., 2010 BELTRÃO-BRAGA et al., 2011, YANG et al., 2010).

A administração das células-tronco depende do local que o pesquisador tem a preferência de melhorar a região que está acometida pela doença (KERKIS et al., 2008; GOMES et al., 2009). Por isso, a acupuntura pode levar estas células ou o efeito benéfico destas para uma distribuição maior no corpo pelo auxílio da interligação entre os meridianos. Outro mecanismo é a potencialização da ação dos fármacos administrados em determinados acupontos (CARNEIRO, 2007; COSTA; BOTTECHIA; SILVA, 2008), fato esse que pode ser comprovado pelo o uso da eletroacupuntura, que pode levar a fusão de células-tronco ao tecido que pode gerar um efeito sinérgico na doença (DING et al., 2009; DING et al., 2011; YAN et al., 2011; LIU et al., 2012), .

Fatores psicológicos também podem influenciar o eixo neuroendócrino afetando a resposta fisiológica, mesmo em camundongos (MOYNIHAN; ADER, 1996) tornando imprescindível o uso de métodos placebos que mimetizam a acupuntura (KARST et al., 2003), além do que realizamos anestesia para evitar ao máximo o estresse dos camundongos e a aplicação ser feita em ambiente sem agitação. Por isso neste trabalho, fez-se o uso de grupos de tratamentos em acupontos falsos e o uso de solução fisiológica em acupontos de acupuntura com intuito de isolar e comparar especificamente a qual terapia o melhor resultado foi atribuído.

A seleção dos acupontos da Bexiga 47, 49 e 52 bilateralmente neste projeto foi após uma acurada avaliação da DMD, associado aos benefícios que poderiam trazer pela Medicina Tradicional Chinesa. Como nesta doença observamos uma deficiência principalmente nos meridianos do fígado, baço-pâncreas e rim, a escolha desses pontos, também se deu ao fato de que estes pontos poderiam nutrir os meridianos da primeira coluna que são pontos Shu do fígado, baço-pâncreas e rim, como já previamente relatado na revisão de literatura deste trabalho (ROSS, 1994; YAMAMURA, 1998; HE e NE, 1999; URTIZBEREA et al., 2003).

Como método de avaliação clinica, o teste de força tem a função de graduar o nível de força máxima exercido por um grupo muscular (RAFAEL; BROWN, 2000; DECONINCK; DAN, 2007; Van PUTTEN et al., 2010) e inicialmente foi proposto com base no modelo de Van Puten et al. (2012) que descreve um teste em fio de aço, onde os camundongos devem permanecem agarrados pelos membros torácicos a uma altura de no máximo 35 cm da base. O que este autor relata é que esses camundongos *mdx* devem permanecer por agarrados ao fio

apenas pelos membros torácicos, sendo aferidos o número de quedas durante 10 minutos perfazendo um total de cinco experimentos, com intervalo de dois minutos entre eles para cada animal. Entretanto, nesta pesquisa necessitou-se adaptar o teste de força devido ao reduzido tempo que estes animais ficavam agarrados no fio de aço e também pelo cansaço extremo encontrado nestes animais. Notou-se que apenas o tempo de permanência agarrados ao fio de aço não foi suficiente para graduar a força funcional, sendo que alguns deles apresentavam comportamentos que deveriam ser considerados como: erguimento do corpo sobre o fio, caminhada sobre a corda e colocação do membro pélvico sobre o fio. Por isso, instituiu-se as escalas para pontuar estes comportamentos e uma classificação da qualidade de força em fraca, mediana e forte foi atribuída a estes itens.

Antes do início dos tratamentos, os camundongos *mdx* foram submetidos ao teste de força e observou-se uma dificuldade destes animais em se manterem dependurados no fio de aço e depois de pouco tempo era visível o comportamento de exaustão após este exercício, comprovando assim sua fragilidade muscular. Estes mesmos resultados foram encontrados por Rafael, Brown (2000), os quais citam dificuldade de permanência agarrados ao fio e cansaço extremo destes camundongos após o teste do fio.

Neste trabalho observou-se que após os tratamentos, os animais que suportaram por mais tempo sua permanência no fio pelos membros torácicos e que demostraram outros comportamentos de força, foram os que receberam células-tronco ou solução fisiológica em acupontos verdadeiros. Porém, este tipo de teste se trata de uma análise subjetiva e visando diminuir este tipo de problema as avaliações foram realizadas em triplo cego.

Hübscher et al. (2010) demonstraram que acupuntura sozinha leva a melhora da força muscular quando utilizaram os pontos E36, BP6 e ponto auricular Shenmen e observaram melhor desempenho da força isométrica muscular do quadríceps em atletas submetidos ao tratamento de acupuntura por seis semanas. Pinheiro et al. (2012) demonstraram que a terapia celular utilizando células-tronco provenientes de tecido adiposo pode aumentar a força muscular e a resistência a fadiga muscular em camundongos *mdx*. Sendo assim, a associação destas duas terapias poderia somar os seus efeitos para um melhor desempenho muscular funcional, que é o objetivo deste trabalho, analisar se a associação das duas terapias pode ser benéfica ou não a estes pacientes.

Como o teste do fio é qualitativo, ele não deve ser analisado isoladamente e sim em conjunto com as demais variáveis discutidas nesta pesquisa para representar melhor os efeitos dos tratamentos realizados para esta doença.

A análise da creatinofosfoquinase sérica é uma medida fidedigna para identificação e quantificação de lesões musculares em humanos e animais, como em camundongos *mdx* utilizados neste trabalho, o que valida esta análise, e gradua a melhora ou piora durante todo o experimento (HOFFMANN; SOLTER, 19989; De LUCA et al., 2008; BURDI et al., 2009).

A dinâmica da análise da creatinofosfoquinase sérica foi semelhante aos resultados encontrados por de De Luca et al. (2008), Burdi et al. (2009), Van Putten et al. (2010) e Kayali et al.(2012).

Convém ressaltar que no primeiro momento, antes de começar qualquer tratamento nenhuma diferença estatística foi encontrada entre os grupos indicando uma homogeneidade no grau da lesão muscular. Constatou-se pela análise da CPK nos diferentes grupos o tratamento acupontos verdadeiros com células-tronco gerou uma queda gradativa dos valores da CPK, com significância biológica apenas no momento 4, indicando que apenas este tratamento foi efetivo em diminuir a lesão muscular.

No fim das três sessões de tratamento encontrou-se uma diferença estatística entre os grupos tratados e o controle, indicando que o grupo controle apresentou uma progressão da degeneração muscular, pois segundo Tanabe et al. (1986), o pico de degeneração muscular nestes animais é de 35 a 90 dias de idade. Além disso, todos os tratamentos foram benéficos aos camundongos *mdx*, sendo que os tratamentos com células-tronco em acupontos falsos e o uso da acupuntura com solução fisiológica (placebo) foram eficientes em retardar a progressão da lesão muscular. O tratamento com células-tronco aplicados em acupontos verdadeiros mostrou uma ação maior, diminuindo o grau da lesão muscular encontrada antes do tratamento, mas não reverteu a degeneração, uma vez que os valores normais de CPK sérica para camundongos normais, sem alteração muscular, é cerca de 33 vezes menor em como demostrando por Ely et al. (2000). Neste trabalho, a CPK sérica foi cerca de 1,5 vezes menor que o controle, este mesmo resultado foi encontrado por De Luca et al. (2008) quando trataram camundongos *mdx* com gentamicina e controle sedentário, o que pode indicar uma similaridade da melhora da lesão muscular. Convém ressaltar que a gentamicina quando utilizada continuamente possui efeitos colaterais como ototoxicidade e nefrotoxicidade (KAYALI et al., 2012).

Quando o exercício foi aliado à utilização de fármacos, observou-se uma melhora acima do esperado da degeneração muscular, visto pela CPK sérica que reduziu-se pela metade, mostrando que a realização de exercício pode ser benéfica para o tratamento desta doença (De LUCA et al., 2008; BURDI et al., 2009). A associação de exercício não foi proposta neste trabalho, mas possivelmente poderia trazer resultados mais expressivos aos tratamentos. Contudo, estes autores realizaram estudos com fármacos que podem alterar a fisiologia do animal e não fazem alusão à utilização de células-tronco e/ou acupuntura como em nosso trabalho.

As causas da perpetuação da degeneração muscular são inúmeras como: a liberação dos radicais livres e a falta da proteína distrofina (TIDBALL; WEHLING-HENRICKS 2007). Segundo Wang et al. (2011) que utilizaram modelo de camundongo para doença de Parkinson e trataram com eletroacupuntura este tratamento causou a diminuição dos radicais livres. Por isso, ação da aquapuntura em acupontos verdadeiros e placebos poderia resultar no mesmo mecanismo de ação, explicando a redução da CPK plasmática, conforme Tabela 4, entre os tratamentos no momento 4 com diferença estatística. Outra possibilidade é da ação da terapia celular na diminuição do estresse oxidativo, TNF-α e interleucina-6 (PINHEIRO et al., 2012).

Existem estudos com a utilização de células-tronco para tratamento de distrofia muscular em camundongos *mdx* (GUSSONI et al., 1999; TORRENT et al. 2000), porém os referidos autores não realizaram avaliação da creatinofosfoquinase o que não nos permite uma maior comparação dos nossos dados com os dados encontrados na literatura. Entretanto, Kerkis et al. (2008), quando submeteram cães GRMD a terapia celular, pelas vias arterial e intramuscular, utilizando estas mesmas células-tronco, não conseguiram chegar a uma conclusão quanto à diminuição da creatinofosfoquinase sérica e verificaram essa diminuição em apenas em um animal com diminuição da progressão da doença.

Na análise histológica dos camundongos *mdx*, os núcleos das células musculares encontram-se na periferia ou centralizados, com tamanhos diferentes e mionecrose como já descrito por Collins e Morgan (2003) e Wallace e Mcnally (2009).

Para quantificar a melhora histológica frente ao tratamento, vários autores citam a análise morfométrica destas células (De LUCA et al., 2008; BURDI et al., 2009). Com base nestes autores a análise morfométrica foi realizada e resultados semelhantes ao de Burdi et al. (2009) foram encontrados onde verificou-se que os músculos apresentavam os achados de degeneração e regeneração, mas com uma maior área de dano muscular no diafragma em

comparação ao músculo tibial cranial dos camundongos mesmo sob tratamento com pentoxifilina. Entretanto, este mesmo autor cita que os músculos dos animais tratados apresentavam uma melhor homogeneidade da arquitetura, o que foi observado neste trabalho pela avaliação da qualidade das células em regeneração, mais evidente e com diferença estatística, nos grupos acupuntura com solução fisiológica e células-tronco em acupontos verdadeiros, somente no músculo tibial cranial.

A avaliação da quantificação do colágeno mostrou-se muito superior nos animais não tratados e segundo (MARSHALL; WILLIANS, GOLDSINK, 1989) o tecido conjuntivo nesses animais podem chegar 250-375% superior em endomísio e perimísio quando comparado aos animais normais.

Nos ensaios imunohistoquímicos utilizando anticorpo antidistrofina no tratamento ponto verdadeiro verificou-se marcação intensa quando comparado aos outros tratamentos. Além disso, a ausência da distrofina está associada à presença de necrose e processo inflamatório nas fibras musculares do músculo tibial cranial e diafragma em todos os tratamentos na histologia pela coloração hematoxilina-eosina, mas com maior intensidade no grupo controle. Este fato também foi observado por Grounds e McGeachie (1992), Itagaki et al., (1995) e Rafael et al., (1998), os quais relataram que a necrose de fibras musculares está associada a ausência da distrofina, mas a perda da capacidade regenerativa de fibras musculares não necessariamente está ligada a este fator. Por isso, este fator não melhora a atividade regenerativa. O mesmo foi observado neste trabalho quando analisa a quantidade de células regenerativas em menor concentração no tratamento terapia celular com acupontos verdadeiros, entretanto demonstrando uma maior expressão de células fluorescentes para distrofina na imuno-histoquímica.

Um fato importante foi o de que por análise imuno-histoquímica em tecido parafinizado resultado não tão expressivos para a distrofina, nos animais tratados, mas após a pesquisa em cortes congelados o resultado da imunorreatividade foi mais evidente e, assim as células foram quantificadas. Como nos cortes congelados a imunorreatividade para distrofina foi mais evidente do que no tecido parafinizado nos animais tratados estes foram utilizados para contagem celular. Pode-se verificar uma resposta semelhante com De Luca et al. (2008) com uso de gentamicina e de Burdi et al. (2009) com a pentoxifilina levando a restauração da distrofina com maior expressão no tratado do que nos camundongos sedentários (controle).

Esse mesmo aspecto foi obsevado por nós em nossos resultados onde observamos a maior expressão de distrofina nos animais tratados que no controle.

Houve também uma melhor expressão desta proteína no músculo tibial cranial dos animais tratados com células-tronco, solução fisiológica em acupontos e somente células-tronco, diferentemente de Pinheiro (2008) o qual não encontrou resultados tão promissores com o uso de células-tronco de medula óssea para o tratamento de camundongos *mdx*. A importância desta quantificação da distrofina em *mdx* também foi observada por Kayali et al. (2012) em seus estudos dos efeitos terapêuticos comparativos entre dois fármacos RTC13 e RTC14.

Segundo De Luca et al. (2008), Kayali et al. (2012) alguns fármacos podem corrigir o defeito da leitura da tradução do RNAm e formar a proteína distrofina de uma maneira incompleta, quando a DMD for uma parada pontual no códon. Sugere-se que as células-tronco facilitem também esta leitura no códon defeituoso. Ainda analisando o efeito maior do tratamento acupuntura, com melhor quantidade da proteína distrofina, alguns autores justificam sua ação pelo aumento do óxido nítrico sintase, diminuição da miostatina e mediadores inflamatórios que perpetuam a degeneração muscular, e por isso manifesta um maior número de células com distrofina, lembrando que estes animais possuem de 1 a 2% de fibras revertentes (VAINZOF et al., 2005; TAKAOKA et al. 2007; BEN et al., 2010; WANG et al, 2011).

As pesquisas para rastrear células-tronco utilizando um anticorpo anti-GFP nos músculos tibial cranial e diafragma e, também no rim, fígado e baço foram realizadas sem sucesso. Este mesmo resultado foi encontrado por Pinheiro (2008), o qual não visualizou as células-tronco de medula óssea aplicada em camundongos *mdx.* A análise deste rastreamento deve, entretanto ser considerada como uma parte dos resultados desta investigação. Os resultados obtidos até agora abre novas chances e perspectivas para o grande desafio do tratamento da distrofia muscular de Duchenne em humanos.

7 CONCLUSÃO

1- Os tratamentos efetuados nesta investigação não alteraram a força de tração dos membros torácicos, mas melhoraram significativamente a creatinofosfoquinase sérica principalmente após três aplicações de células-tronco em acuponto verdadeiro, falso e solução fisiológica em acuponto verdadeiro.

2- Os tratamentos influenciaram a qualidade de regeneração e degeneração muscular do músculo tibial cranial nos grupos tratados, no entanto foi mais evidente no tratamento células-tronco em acupontos verdadeiros e a quantidade de colágeno mostrou-se mais evidente neste mesmo grupo muscular em todos os grupos tratados.

3- O tratamento com células-tronco de polpa dentária humana em pontos verdadeiros melhorou a expressão da distrofina, no entanto esta melhora foi um pouco menor com as associações da terapia celular nos acupontos falsos e solução fisiológica nos acupontos verdadeiros.

4- A terapia celular isolada com células-tronco de polpa dentária humana e a acupuntura com solução fisiológica nos acupontos B47, B49, B52 pode constituir tratamentos benéfico à melhora do processo degenerativo da distrofia muscular em camundongos *mdx*.

5- A terapia celular com células-tronco de polpa dentária humana associada aos acupontos B47, B49, B52, potencializa o efeito regenerativo em camundongos *mdx*, mas não consegue deter a degeneração muscular progressiva.

REFERÊNCIAS

AMEIS, K.; KANAAN, Y.M.; DAS, J.R.; GEORGE JR, M.; SOBRIAN, S. Effect of manual acupuncture-induced injury on rat skeletal muscle**. Medical Acupuncture**. december, v. 20, n.4, p. 225-230, 2008.

BARTON-DAVIS, E.R.; CORDIER L.; SHOTURMA, D.I.; LELAND, S. E.; SWEENEY, H. L. Aminoglycoside antibiotics restore dystrophin function to skeletal muscles of mdx mice. **Journal of Clinical Investigation.** v. 104, p.375–381, 1999.

BELTRÃO-BRAGA, P.C.B.; PIGNATARI, G.C.; MAIORKA, P.C.; OLIVEIRA, N.A.J.; LIZIER, N.F.; WENCESLAU, C.V.; MIGLINO, M.A.; MUOTRI, A.R.; KERKIS, I. Feeder-free derivation of induced pluripotent stem cells from human immature dental pulp stem cells. **Cell Transplantation**. v.20, n. 11-12, p.1707 -1719, 2011.

BEN, H., PEI-JING, R.; LI, L.; GAO, X.; HE, W. Effects of different acupuncture stimulations on no content in acupoint areas. **Journal of Traditional Chinese Medicine.** v. 30, n. 1, march, p.25–29, 2010.

BLAKE, D. J.; WEIR, A.; NEWEY, S.E.; DAVIES, K.E. Function and genetics of dystrophin and dystrophin-related proteins in muscle. **Physiological Review**. April, v. 82, n.2, p.291-329, 2002.

BULFIELD G., SILLER W.G., WIGHT P.A., MOORE K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse**. Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.81, n. 4, p. 1189–1192, 1984.

BURDI, R.; ROLLAND, JF.; FRAYSSE, B.; LITVINOVA, K.; COZZOLI, A.; GIANNUZZI, V.; LIANTONIO, A.; CAMERINO, G.M.; SBLENDORIO, V.; CAPOGROSSO, R.F.; PALMIERI, B.; ADREETTA, F.; CONFALONIERI, P.; De BENEDICTS, L.; MONTAGNANI, M.; De LUCA, A. Multiple pathological events in exercised dystrophic *mdx* mice are targeted by pentoxifylline: outcome of a large array of in vivo and ex vivo tests. **Journal of Applied Physiology**, v.106, p. 1311–1324, 2009.

BUSHBY,K.; FINKEL, R.; BIRNKRANT, D.J.; CASE, L.E.; CLEMENS, P.R.; CRIPE, L.; KAUL, A.; KINNETT, K.; McDONALD, C.; PANDYA, S.; POYSKY, J.;SHAPIRO,

F.;TOMEZSKO, J.; CONSTANTIN, C. Diagnosis and management of Duchenne muscular dystrophy, part 1: diagnosis, and pharmacological and psychosocial management. **www.thelancet.com/neurology**, november 30, p.1-17, 2009.

CAPLAN, A. Why are MSCs therapeutic? New data: new insight. **The Journal of Pathology.** 217, p. 318–324, 2009.

CARNEIRO, N.M. Acupuntura na prevenção e tratamento de náusea e vômitos. **Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina**. p. 1-14, 2007.

CEROYSKY J, HUDECEK V, ROZKOT M, HARAPAT D, HERCIK Z. Acupuncture to induce oestrus in gilts. **The Medical Acupuncture** Web Page. Acessado em http://med-vetacupuncture.org/english/articles/gilts.html Acesso em 05/12/2008.

CHAKKALAKAL, J.V.; THOMPSON, J.; PARKS, R.J.; JASMIN, B.J. Molecular, cellular, and pharmacological therapies for Duchenne/Becker muscular dystrophies. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 8, p.880-891, 2005.

CHOI, YEONG-GON; PARK, JAE-HYUN; LIM, S. Acupuncture inhibits ferric iron deposition and ferritin-heavy chain reduction in an MPTP-induced parkinsonism model. **Neuroscience Letters**. v.450, p. 92–96, 2009.

COLLINS, C. A.; MORGAN, J. E. Duchenne's muscular dystrophy: animal models used to investigate pathogenesis and develop therapeutic strategies. **International** J**ournal of Experimental Pathology**, v. 84, n.4, agosto, p.165-72, 2003.

COSSU, G.; SAMPAOLESI, M. New therapies for Duchenne muscular dystrophy: challenges, prospects and clinical trials. **TRENDS in Molecular Medicine**,v. 13, n. 12, p.1-7, 2007.

COSTA, F. Q.; BOTTECCHIA, R. J.; SILVA, J. F. S. Uso da acupuntura no tratamento de patologias reprodutivas de fêmeas de animais domésticos. **Revista Brasileira Reprodução Animal.** v. 32, n.1, p. 50-57, 2008.

De LUCA A.; NICO, B., ROLLAND, J. F.; COZZOLI, A.; BURDI, R., MANGIERI, D., GIANNUZZI, V.; LIANTONIO, A.; CIPPONE, V.; De BELLIS, M.; NICCHIA, G. P.; CAMERINO, G. M.; FRIGERI, A.; SVELTO, M.; CAMERINO, D. C. Gentamicin treatment in exercised *mdx* mice: Identification of dystrophin-sensitivepathways and evaluation of efficacy in work-loaded dystrophic muscle. **Neurobiology of Disease,** v. 32, n. 2, p.243–253, 2008.

DECONINCK, N.; DAN, B. Pathophysiology of Duchenne Muscular Dystrophy: Current Hypotheses. **Pediatric Neurology**, v. 36 n. 1, p. 1-7, 2007.

DING, Y.; YAN, Q.; RUAN, J.; ZHANG, Y., LI, W.; ZHANG, Y.; LI, Y.; DONG, H.; ZENG, H. Electro-acupuncture promotes survival, differentiation of the bone marrow mesenchymal stem cells as well as functional recovery in the spinal cord-transected rats**.** **BMC Neuroscience**. v. 10, n. 35, p.1-13, 2009.

DING, Y.; YAN, Q.; RUAN, J.; ZHANG, Y.; LI, W.; ZENG, X.; HUANG, S.; ZHANG, Y.; WANG, S.; DONG, H.; ZENG, Y. Bone marrow mesenchymal stem cells and electroacupuncture downregulate the inhibitor molecules and promote the axonal regeneration in the transected spinal cord of rats. **Cell Transplantation**. v. 20, n. 4, p. 475–491, 2011.

DRAEHMPAEHL, D.; ZOHMANN, A. **Acupuntura no cão e no gato:** princípios básicos e prática científica. São Paulo: Roca, 1997, p.6-65.

DUAN, DONGSHENG . Duchenne muscular dystrophy gene therapy: Lost in translation? **Reserch and Report in Biology.** march, v. 2, p. 31–42, 2011.

EHMSEN, J.; POON, E.; DAVIES, K. The dystrophin-associated protein complex. **Journal of Cell Science**. v. 115, n. 14, p. 2801-2804, 2002.

ELY, J. F.; ELY P. B.; WEBSTER, R. S.; PAVELECINI, M.; LUCAS, M. Alterações enzimáticas decorrentes de isquemia muscular esquelética em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.15, n.3, p. 11-20, 2000.

GAMA, E.D. Acupuntura e imunologia. Anais I Congresso Internacional de Acupuntura Veterinária. São Paulo:FMVZ – UNESP, p. 25-28,1999.

GAO, J.; ZHANG, L.; WANG,Y.; LU, B.; CUI, H.; FU, W.; WANG, H.; YU, Y.; YU X. Antiarrhythmic effect of acupuncture pretreatment in rats subjected to simulative global ischemia and reperfusion -involvement of adenylate cyclase, protein kinase a, and l-type ca2+ channel. **The Journal Physiological Science.** v. 58, n. 6, p. 389–396, 2008.

GOMES, J. A. P.; MONTEIRO, B. G.; MELO, G. B.; SMITH, R. L.; DA SILVA, M. C. P.; LIZIER, N. F.; KERKIS, A.; CERRUTI, H.; KERKIS, I. Corneal reconstruction with tissue-engineered cell sheets composed of human immature dental pulp stem cells. **IOVS**, March, v.51, n.3, p. 1408-1414, 2010.

GOODY, M. F.; KELLY, M. W.; REYNOLDS, C. J.; KHALIL, A.; CRAWFORD, B. D.; HENRY, C. A. NAD+ biosynthesis ameliorates a zebrafish model of muscular dystrophy. **Plos Biology**, october, v. 10, n. 10, p.1-17, 2012.

GROUNDS, M.; McGEACHIE, J. K. Skeletal muscle regeneration after crush injury in dystrophic mice an autoradiographic study**. Muscle Nerve**. v.15, n. 5, p. 580-586, 1992.

GUSSONI, E.; SONEOKA, Y.; STRICKLAND, C.D.; BUZNEY, E.A.; KHAN, M. K.; FLINT, A. F.; KUNKEL, L. M.; MULLIGAN, R. C. Dystrophin expression in the *mdx* mouse restored by stem cell transplantation. **Nature**, 23 september, v. 401, p.390-394, 1999

GUYON, J. R.; MOSLEY, A. N.; ZHOU, Y.; O'BRIEN, K. F.; SHENG, X.; CHIANG, K.; DAVIDSON, A. J.; VOLINSKI, J. M.; ZON, L. I.; KUNKEL, L. M. The dystrophin associated protein complex in zebrafish human molecular genetics. **Human Molecular Genetics.** v. 12, n. 6, p.601-615, 2003.

HAN, H. J.; PARK, S. J.; SO, K.; MYOUNG, H. S.; LEE, K. J.; OGAY, V.; LEE, Y. H. Electrical Characterization of Proposed Transpositional Acupoints on the Urinary BladderMeridian in a RatModel. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-8, 2011.

HAWKE, T. J.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology.** v. 91, n. 2, p. 534-551, 2001.

HE, Y.H.; NE, Z.B. **Teoria Básica da Medicina Tradicional Chinesa**. Ed. Atheneu, RJ, 1999.

HOFFMAN, E. P., BROWN, J. R. R. H., KUNKEL, L. M. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. **Cell**. v. 51, n.6, p. 919–28, 1987.

HOFFMANN, W. E.; SOLTER, P. F. Diagnostic enzymology of domestic animals. In: Kaneko, J. J. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 4ª ed. San Diego: Academic Press, p. 351-378,1989.

HÜBSCHER, M.; VOGT, L.; ZIEBART, T.; BANZER, W. Immediate effects of acupuncture on strength performance: a randomized, controlled crossover trial. **European Journal Applied Physiology,** v. 110, n. 2, p.353–358, 2010.

IAMAGUTI, P. et al. Eletroacupuntura analgésica (EAA) em cirurgias abdominais de cães. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. v.4, n.2, abr./jun, p. 20-22, 1981.

ICHIM, T. E.; ALEXANDRESCU, D. T.;SOLANO, F.; LARA, F.; CAMPION, R. N.; PARIS, E.; WOODS E. J.; MURPHY, M. P.;DASANU, C. A.; PATEL, A. N.; MARLEAU, A. M.; LEAL, A.; RIORDAN, N. H. Mesenchymal stem cells as anti-inflammatories: Implications for treatment of Duchenne muscular dystrophy. **Cellular Immunology**. v. 260, n.2, p. 75–82, 2010.

ITAGAKI, Y.; SAIDA, K.; IWAMURA, K. Regenerative capacity of *mdx* mouse muscles after repeated applications of myo-necrotic bupivacaine. **Acta Neuropathologica.** v. 89, n.4, p.380-384, 1995.

KAHN, M. A. Corticosteroid therapy in Duchenne muscular dystrophy. **Journal of the Neurological Science.** v. 120, p.8–14. 1993

KARST, M.; SCHEINICHEN, D.; RUECKERT, T.; WAGNER, T.; WIESE, B.; FINK, M. Effect of acupuncture on the neutrophil respiratory burst: a placebo-controlled single-blinded study. **Complementary Therapies in Medicine.** v. 11, n. 1, p. 4–10, 2003

KAYALI, R.; KU, JI-MO.; KHITROV, G.; JUNG, M .E.;PRIKHODKO, O.; BERTONI, C. Read-through compound 13 restores dystrophin expression and improves muscle function in

the *mdx* mouse model for Duchenne muscular dystrophy**. Human Molecular Genetics**. v. 21, n. 18 p.4007-4020, 2012.

KEMALADEWI, D. U.; HOOGAARS, W. M. H.; Van HEININGEN, S. H.; TERLOUW, S.; De GORTER, D. J. J.; DEN DUNNEN, J. T.; Van OMMEN, G. J. B.; AARTSMA-RUS, A.; Ten DIJKE, P.; HOEN, P. A. C. Dual exon skipping in myostatin and dystrophin for Duchenne muscular dystrophy. **BMC Medical Genomics**, v.4, n.36 p.1-10, 2011.

KERKIS, I.; KERKIS, A.; DOZORTSEV, D.; STUKART-PARSONS, G. C.; MASSIRONI, S. M. G.; PEREIRA, L. V.; CAPLAN, A. I.; CERRUTI, H. F. Isolation and Characterization of a Population of Immature Dental Pulp Stem Cells Expressing OCT-4 and Other Embryonic Stem Cell Markers. **Cells tissues organs**. v. 184, n. 3-4, p.105–116, 2006.

KERKIS,I.; AMBROSIO, C. E.; KERKIS, A.; MARTINS, D. S.; ZUCCONI, E.; FONSECA, S. A. S.; CABRAL, R. M.; MARANDUBA, C. M. C.; GAIAD, T. P.; MORINI, A. C.; VIEIRA, N. M.; BROLIO, M. P.; SANT'ANNA, O. A.; MIGLINO, M. A.; ZATZ, M. Early transplantation of human immature dental pulp stem cells from baby teeth to golden retriever muscular dystrophy (GRMD) dogs: Local or systemic? **Journal of Translational Medicine.** v. 6, n.35, p.1-13, 2008.

KHUARANA, T.S.; DAVIES, K.E. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. **Nature**. v. 2, p.379-390, 2003.

LIU, C. T.; CHEN, K. C.; CHIU, E. H. H. Adult degenerative scoliosis treated by acupuncture**.The Journal of Alternative and Complementary Medicine**. August, v.15, n. 8, p 935-937, 2009.

LIU, H.; YANG, T.; XIN, T.; WU, W.; CHEN, Y. Implanted electro-acupuncture electric stimulation improves outcome of stem cells' transplantation in spinal cord injury. **Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology**. v. 40, n. 5, p.331-337, 2012.

LIU, JIAN-HUA; YAN, J; YI, SHOU-XIANG.; CHANG, XIAO-RONG; LIN, YA-PING; HU, JI-MING. Effects of Electroacupuncture on gastric myoelectric activity and substance P in the dorsal vagal complex of rats. **Neuroscience Letters.** v. 356, n. 2, p.99–102, 2004.

LUNA, S. P. L. Emprego da Acupuntura em anestesia. In: FONTONI, D. T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em cães e gatos**. São Paulo: Roca, p. 337-343, 2002.

LUZ, M. A. M.; NETO, H. S.; MARQUES, M. J. Regeneração Muscular na Patogênese da Distrofia Muscular de Duchenne. **UNORP**. v. 3, n. 2, p. 13-25, 2003.

MA, SHENG-XING. Enhanced nitric oxide concentrations and expression of nitric oxide synthase in acupuncture points/meridians. **The journal of alternative and complementary medicine.** v. 9, n, 2, p. 207–215, 2003.

MALIK, V.; RODINO-KLAPAC, L. R.; VIOLLET L.; WALL, C. ; KING W.; AL-DAHHAK, R.; LEWIS, S.; SHILLING; C. J.; KOTA; J.; SERRANO-MUNUERA, C.; HAYES J.; MAHAN J. D.; CAMPBELL, K. J.; BANWELL B.; WATTS, V.; SIVAKUMAR, K., BIEN-WILLNER R.; FLANIGAN, K. M.; SAHENK, Z.; BAROHN, R. J.; WALKER, C. M.; MENDELL, J. R. Gentamicin-Induced Readthrough of Stop Codons in Duchenne Muscular Dystrophy. **Annals of Neurology**. v. 67, n. 6, p. 771-780, 2010.

MANZUR, A. Y.; KUNTZER, T.; PIKE, M.; SWAN, A. Glucocorticoid corticosteroids for Duchenne muscular dystrophy. **Cochrane database of systematic reviews**. Art. No.: CD003725. DOI: 10.1002/14651858.CD003723.pub3. ,n. 1, 2008.

MARCUCCI, F. C. I. Acupuntura na doença de Parkinson: revisão de estudos experimentais e clínicos. **Revista Neurociência**, v.15, n. 2, p.147-152, 2007.

MARSHALL, P. A., WILLIAMS, P. E.,GOLDSPINK, G. Accumulation of collagen and altered fiber-type ratios as indicators of abnormal muscle gene expression in the mdx dystrophic mouse. **Muscle and Nerve**. v. 12, n.7, p. 528-537, 1989.

MOYNIHAN, J. A.; ADER, R. 1996. Psychoneuroimmunology: Animal Models of Disease. **Psychosomatic Medicine.** v. 58, n. 6, p. 546-558, 1996.

ONDA, A.; JIAO, Q.; YASUHARU, N.; AKIMOTO T.; MIYAMOTO, T.; MINAMISAWA, S.; FUKUBAYASHI, T. Acupuncture ameliorated skeletal muscle atrophy induced by

hindlimb suspension in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** v. 410, p.434–439, 2011.

PASTERNAK, C.; WONG, S.; ELSON, E. L. Mechanical Function of Dystrophin in Muscle Cells. **The Journal of Cell Biology**. v. 128, n. 3, p. 355-361, 1995.

PASTORET, C.; SEBILLE, A. Mdx mice show progressive weakness and muscle deterioration with age. **Journal of the Neurological Sciences.** v.129, p. 97-105, 1995.

PESSOA V. M., MEIR C., FERREIRA J. C. P., ARAÚJO G. H. M., GIOSO M. M. Effect of microdoses of prostaglandin F2α to induce luteolysis in Nelore cows. *In*: **Annual International Congress on Veterinary Acupuncture** , 30, 2004, Oostende, Belgium. *Proceedings* … Oostende, Belgium: International Veterinary Acupuncture Society, 2004. p.277-283.

PICHAVANT, C.; AARTSMA-RUS, A.; CLEMENS, P. R.; DAVIES, K. E.; DICKSON, G.; TAKEDA, S.; WILTON, S. D.; WOLFF, J. A.; WOODDELL, C. I.; XIAO, X.; TREMBLAY, J. P. Current status of pharmaceutical and genetic therapeutic approaches to treat DMD. **The American Society of Gene & Cell Therapy**. v. 19, n. 5,p. 830–840, 2011.

PINHEIRO, C. H. J.; QUEIROZ, J. C. F.; FERREIRA, L. G.; VITZEL, K. F.; NACHBAR, R. T.; SOUSA, L. G. O.; SOUZA-JR, A. L.; NUNES, M. T.; CURI, R. Local injections of adipose-derived mesenchymal stem cells modulate inflammation and increase angiogenesis ameliorating the dystrophic phenotype in dystrophin-deficient skeletal muscle. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 8, n. 2, p.363–374, 2012.

PINHEIRO, D. A. G. B. Estudo do potencial miogênico das células tronco mesenquimais e embrionárias no modelo murino da distrofia muscular de Duchenne. Dissertação de mestrado, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, 114p., 2008.

RAFAEL, J. A.; BROWN, S. C. Dystrophin and utrophin: genetic analyses of their role in skeletal muscle. **Microscopy Research and Technique**. v. 48, n. 3-4, p.155-166, 2000.

RAFAEL, J. A.; TINSLEY, J. M.; POTTER, A. C.; DECONINCK, A. E.; DAVIES, K. E. Skeletal muscle-specific expression of a utrophin transgene rescues utrophin-dystrophin deficient mice. **Nature Genetics**. v. 19, n.1, p. 79-82, 1998.

RANDO, T. A. Recent advances in the pathogenesis and treatment of neuromuscular diseases. **Current Opinion in Neurology**. v. 25, n. 5, p. 586–587, 2012

RASTEGAR, F.; SHENAQ, D.; HUANG, J.; ZHANG, W.; ZHANG, B. Q.; HE, B. C.; CHEN, L; ZUO, G. W.; LUO, Q.; SHI, Q.; WAGNER, E. R.; HUANG, E.; GAO, Y.; GAO, J. L.; KIM, S. H.; ZHOU, J. Z.; BI, Y.; SU, Y.; ZHU, G.;LUO, J.; LUO, X.; QIN, J.; REID, R. R.; LUU, H. H.; HAYDON, R. C.; DENG, Z. L.; HE, T. C. Mesenchymal stem cells: molecular characteristics and clinical applications. **World Journal Stem Cells.** August 26, v. 2, n.4, p. 67-80, 2010.

REITTER, B. Deflazacort vs. prednisone in Duchenne muscular dystrophy: trends of an ongoing study. **Brain & Devolepment**.v.17, p.39–43, 1995.

ROSS, J. **Combinações dos Pontos de Acupuntura – A chave para o êxito**. Ed. Roca, SP, 2003.

ROSS, J. **Zang Fu Sistema de órgãos e vísceras da Medicina Tradicional Chinesa.** Ed. Roca, SP, 1° ed. , 1994.

SCHMALBRUCH, H.; HELLHAMMER, U. The number of satellite cells in normal human muscle. **The Anatomical Record.** v. 185, n.3, p.279-287, 1976.

SCOGNAMILLO-SZABÓ M.V.R., BECHARA G.H. Acupuntura: bases científicas e aplicações. **Ciência Rural**, v. 31, n. 6, p. 1091-1099, 2001.

SEWRY, C. A. Muscular dystrophies: an update on pathology and diagnosis. **Acta Neuropathologica.** v. 120, n. 3, p. 343–358, 2010.

SHERIFFS, I. N.; RAMPLING, D.; SMITH, V.V. Paraffin embedded muscle is suitable for the diagnosis of muscular dystrophy. **Journal Clinical Pathology.** v. 55, n. 8, p.636-640, 2002

SHOEN, A. M. **Acupuntura Veterinária da arte antiga à medicina moderna**. São Paulo: Roca, 2 ed., p.603, 2001.

TABOSA, A.; YAMAMURA, Y.; FORNO, E.R.; MELLO, L.E.A.M. A Comparative Study of the Effects of Electroacupuncture and Moxibustion in the Gastrointestinal Motility of the Rat. **Digestive Diseases and Sciences**. v. 49, n. 4, p. 602–610, 2004.

TABOSA, A.; YAMAMURA, Y.; FORNO, E.R.; MELLO, L.E.A.M. Effect of the acupoints ST-36 (*Zusanli*) and SP-6 (*Sanyinjiao*) on intestinal myoelectric activity of Wistar rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.35, n. 6, p. 731-739, 2002.

TAKAOKA, Y.; OHTA, M.; ITO, A.; TAKAMATSU, K.; SUGANO, A.; FUNAKOSHI, K.; TAKAOKA, N.; SATO, N.; YOKOZAKI, H.; ARIZONO, N.; GOTO, S.; MAEDA, E. Electroacupuncture suppresses myostatin gene expression: cell proliferative reaction in mouse skeletal muscle. **Physiological Genomics.** v.30, n.2, p.102-10, 2007.

TANABE, Y.; ESAKI, K.; NOMURA, T. Skeletal muscle pathology in X chromosome-linked muscular dystrophy (*mdx*) mouse. **Acta Neuropathologica.** v. 69, n. 1-2, p. 91-95, 1986.

TIDBALL, J.G.; WEHLING-HENRICKS, M. The role of free radicals in the pathophysiology of muscular dystrophy. **Journal of Applied Physiology.** v. 102, n. 4, p. 1677–1686, p. 2007.

TORRENT, Y.; D'ANGELO, M. G.; LI, Z.; DELBO, R.; MERICKAY, M.; DELISO, A.; FASSATI, A. PAULIN, D.; COMI, G. P.; SCARLATO, G.; BRESOLIN, N. Transplacental injection of somite-derived cells in *mdx* mouse embryos for the correction of dystrophin deficiency**. Human Molecular Genetics.** v. 9, n. 12, p.1843-1852, 2000.

URTIZBEREA, J.A.; FAN, Q. S.; VROOM, E.; RÉCAN, D. Looking under every rock: Duchenne muscular dystrophy and traditional Chinese medicine. **Neuromuscular Disoders**, v. 13, n. 9, p. 705-707, 2003.

VAINZOF, M., YAMAMOTO, L.U.; KOSSUGUE, P.M.; FOGAÇA, L.L.Q., VELOSSO, F.Z.; AYUB, D.; MUNIZ, V. P.; ZATZ, M.; SILVA, H. C. A.; MASSIRONI, S. M. G.; MIGLINO, M. A.; AMBROSIO, C. E.; MIYAZATO, L. G.; MORAES, J. R. E.; D'ANGELES, F. H. F.; LACERDA NETO, J. C.; MORTARI, A. C.; BORGES, A. S.;

REZENDE, L. A. L.; RAHAL, S. C. Modelos animais ajudando a decifrar doenças neuromusculares humanas. **Neurociências**, v.13, n. 3, p.18-20, 2005.

Van PUTTEN, M.; De WINTER, C., Van ROON-MOM, W.; Van OMMEN, G. J.; HOEN, P. A. C.; RUS, A. A. A 3 months mild functional test regime does not affect disease parameters in young *mdx* mice. **Neuromuscular Disorders**. v. 20, n. 4, p.273–280, 2010.

Van PUTTEN, M.; HULSKER, M.; NADARAJAH, V. D.; VAN HEININGEN, S. H.; Van HUIZEN, E.; VAN ITERSON, M.; ADMIRAAL, P.; MESSEMAKER, T.; DEN DUNNEN, J.T.; 'T HOEN, P.A.C.; AARTSMA-RUS, A. The Effects of Low Levels of Dystrophin on Mouse Muscle Function and Pathology. **Plos one**: e31937. doi:10.1371/journal.pone.0031937. v. 7, n. 2, 2012

WALLACE, G. Q.; MCNALLY, E. M. Mechanisms of muscle degeneration, regeneration, and Repair in the Muscular Dystrophies. **Annual Review of Physiology**. v. 71, p.37-57, 2009.

WALMSLEY, G. L.; GOMEZA, V. A.;FUENTE, M. F.; BURKE, M. M.; NAGEL, N.; HOLDER, A.; STANLEY, R.; CHANDLER, K.; MARKS, S. L.; MUNTONI, F.; SHELTON, G. D.; PIERCY R. J. A Duchenne Muscular Dystrophy Gene Hot Spot Mutation in Dystrophin-Deficient Cavalier King Charles Spaniels Is Amenable to Exon 51 Skipping. **Plos one**, v. 5, n. 1, p. 1-9, 2010.

WANG, H.; PAN, Y.; XUE, B.; WANG, X.; ZHAO, F.; JIA, J.; LIANG, X.; WANG, X. The Antioxidative Effect of Electro-Acupuncture in a Mouse Model of Parkinson's Disease. **Plos one**, v. 6, n. 5, p. 1-8, 2011.

WELCH, E. M.; BARTON, E. R.; ZHUO, J.; TOMIZAWA, Y.; FRIESEN, W. J.; TRIFILLIS, P.; PAUSHKIN, S.; PATEL, M.; TROTTA, C. R.; HWANG, S.; WILDE, R. G.; KARP, G.; TAKASUGI, J.; CHEN, G.; JONES, S.; REN, H.; MOON, Y.; CORSON, D.; TURPOFF, A. A.; CAMPBELL, J. A.; CONN, M. M.; KHAN, A.; ALMSTEAD, N. G.; HEDRICK, J.; MOLLIN, A.; RISHER, N.; WEETALL, M.; YEH, S.; BRANSTROM, A. A.; COLACINO, J. M.; BABIAK, J.; JU, W. D.; HIRAWAT, S.; NORTHCUTT, V.J.; MILLER, L. L.; SPATRICK, P.; HE, F.; KAWANA, M.; FENG, H.; JACOBSON, A.; PELTZ, S. W.;

SWEENEY, H. L. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. **Nature.** v. 447, n.7140, 87-91, 2007.

WHITEHEAD, N. P.; PHAM, C.; GERVASIO O. L.; ALLEN, D. G. *N*-Acetylcysteine ameliorates skeletal muscle pathophysiology in *mdx* mice. **The Journal Physiology**. v. 586, n. 7, p. 2003–2014, 2008.

WILLMANN, R.; POSSEKEL, S.; DUBACH-POWELL, J.; MEIER, T.; RUEGG, M. A. Mammalian animal models for Duchenne muscular dystrophy. **Neuromuscular Disorders**. v. 19, p. 241–249, 2009.

YAMAMURA, I. A arte de inserir. 2.ed. São Paulo: Roca, 03-06,1998.

YAN, J. Comparison of Therapeutic Effects between Acupuncture plus Sacral Injection and Simple Acupuncture for Lumbar Intervertebral Disc Herniation. **Journal of Acupuncture and Tuina Science**, v.5, n.3, p. 169-70, 2007.

YAN, Q.; RUAN, J.; DING, Y.; LI, W.; LI, Y.; ZENG, Y. Electro-acupuncture promotes differentiation of mesenchymal stem cells, regeneration of nerve fibers and partial functional recovery after spinal cord injury. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 63, n. 1-2, p. 151–156, 2011.

YANG, R.; CHEN, M.; LEE, C. H.; YOON, R.; LAL, S. Clones of Ectopic Stem Cells in the Regeneration of Muscle Defects In Vivo. **Plos one** v.5,n.10, e13547.doi:10.1371/journal.pone.0013547, 2010

YIN, C. S.; JEONG, H. S.; PARK, H. J.; BAIK, M. H. Y.; CHOI, C. B.; KOH, H. G. A proposed transpositional acupoint system in a mouse and rat model. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 3, p.159–165, 2008.

ZIMMERMAN, A.; CLEMENS, P. R.; TESI-ROCHA, C.; CONNOLLY, A.; IANNACCONE, S. T.; KUNTZ, N., ARRIETA, A.; HACHE, L.; HENRICSON, E.; HU, F.;

MAYHEW J.; ESCOLAR, M. Liquid formulation of pentoxifylline is a poorly tolerated treatment for Duchenne dystrophy. **Muscle Nerve.** v. 44, n. 2, p. 170–173, 2011.