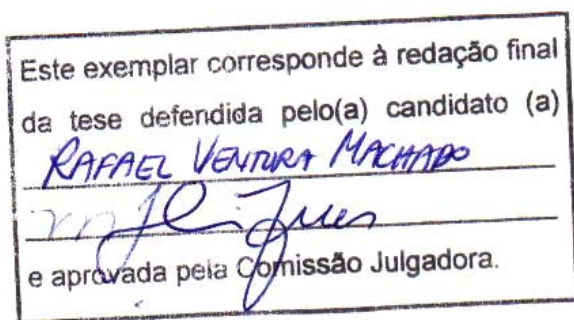


UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



RAFAEL VENTURA MACHADO

**INFLUÊNCIA DO CROMOGLICATO DE SÓDIO NO
PROCESSO DE NECROSE MUSCULAR EM
CAMUNDONGOS *MDX* JOVENS.**



Tese apresentada ao Instituto de Biologia para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular e Estrutural, na área de Anatomia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Júlia Marques

Co-orientadora: Profa. Dra. Elaine Minatel

Campinas, 2006

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

M180i	Machado, Rafael Ventura Influência do cromoglicato de sódio no processo de necrose muscular em camundongos <i>mdx</i> jovens / Rafael Ventura Machado -- Campinas, SP: [s.n.], 2006. Orientadora: Maria Júlia Marques. Co-orientadora: Elaine Minatel. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia. 1. Camundongo <i>mdx</i>. 2. Cromoglicato dissódico. 3. Mionecrose. 4. Músculo – regeneração. I. Marques, Maria Júlia. II. Minatel, Elaine. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.
--------------	---

Título em inglês: Cromolyn therapy decreases dystrophic skeletal muscle necrosis.

Palavras-chave em inglês: *Mdx* mice; Disodium cromoglycate; Mionecrosis; Muscle - regeneration.

Área de concentração: Anatomia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Maria Julia Marques, Laurecir Gomes, Elaine Cristina Leite Pereira.

Data da defesa: 18/09/2006.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

Campinas, 18 de setembro de 2006.

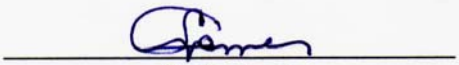
BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Júlia Marques (Orientadora)



Assinatura

Profa. Dra. Laurecir Gomes



Assinatura

Profa. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira



Assinatura

Prof. Dr. Marco Cesar Somazz

Assinatura

Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari

Assinatura

Dedico...

Aos meus pais Sebastião e Beth, pelo apoio tranquilo e confortante, essencial para realização deste trabalho. Aos meus irmãos Gustavo e Fábio, pessoas especiais, pela amizade e companheirismo. A minha namorada Carol, linda, pelo amor, paciência e presença em todos os momentos.

Agradeço...

A Deus, pelas oportunidades de aprendizado e crescimento oferecidos em todos os aspectos da vida durante a realização deste trabalho.

*"Eu Sou o Caminho a Verdade e a Vida"
(Jesus Cristo)*

Agradecimento especial...

Às Professoras Dra. Maria Júlia Marques e Dra. Elaine

Minatel pelo acolhimento, confiança e dedicação.

Agradecimentos...

Ao **Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural** pela contribuição no desenvolvimento pessoal e profissional.

Ao **Prof. Dr. Humberto Santo Neto** pela contribuição durante a formação, pelo conhecimento compartilhado na disciplina Anatomia Aplicada ao Sistema Locomotor e pelas sugestões dadas durante a realização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. José Angelo Camilli e Profa. Dra. Valéria Helena Alves Cagnon Quitete** por compartilhar seus conhecimentos através das disciplinas Esplancnologia e Métodos Didáticos em Anatomia.

Ao **Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira** pela disponibilidade e considerações realizadas no Exame de Qualificação e Proficiência em Inglês.

À **Profa. Dra. Laurecir Gomes e Profa. Dra. Elaine Cristina Leite Pereira** pela disponibilidade, sugestões e demais contribuições dadas durante a pré-banca e banca examinadora.

Ao **Prof. Dr. Marco Cesar Somazz** pela disponibilidade como membro suplente na banca examinadora e sugestões dadas durante a pré-banca examinadora.

A **Profa. Dra. Evanisi Teresa Palomari** pela disponibilidade como membro suplente na banca examinadora.

À **Profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzato** pela contribuição realizada no Exame de Qualificação.

Aos **Srs. Norivaldo Celestino e Marco Aurélio Ribeiro de Paula** pelo auxílio nos procedimentos experimentais realizados neste trabalho.

À **Sra. Marlene Lima** pela manutenção e cuidados com os animais utilizados neste trabalho.

À **Sra. Lillian Alves Senne Panagio e Ana Floriano** pela atenção e auxílio dispensado durante o mestrado.

Aos **Srs. Paulo Afonso Bernardes, Paulo Francisco dos Santos, Toni Donizeti dos Santos e Carlos Gonçalves** pela prestatividade durante o mestrado.

A todos os docentes, funcionários, colegas e amigos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

À **CAPES, FAEPEX-UNICAMP, CNPq e FAPESP** pelo apoio financeiro.

*“A sutileza do pensamento consiste em
descobrir a semelhança das coisas diferentes e
a diferença das coisas semelhantes”*

(Montesquieu)

SUMÁRIO

Abreviaturas

Resumo

Abstract

1. INTRODUÇÃO	01
1.1 Distrofia muscular de Duchenne	04
1.2 Distrofina e o complexo distrofina-glicoproteínas	04
1.3 Camundongo <i>mdx</i>	07
1.4 Necrose muscular no camundongo <i>mdx</i>	08
1.5 Regeneração muscular no camundongo <i>mdx</i>	11
1.6 Cromoglicato de sódio	12
2. OBJETIVO	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 Animais	17
3.2 Grupos experimentais e tratamento com o cromoglicato de sódio	17
3.3 Análise da integridade do sarcolema	17
3.4 Preparo dos músculos para análise histológica	18
3.5 Análise dos cortes histológicos por meio de HE e AE	19
3.6 Determinação da creatino-quinase (CK) total no plasma sanguíneo	21
4. RESULTADOS	22
4.1 Análise qualitativa	23
4.2 Análise quantitativa	26
4.3 Análise comparativa entre os músculos STN e TA do grupo <i>mdx</i> CRO	28
4.4 Níveis de creatino-quinase (CK) total no plasma sanguíneo	29
5. DISCUSSÃO	30
5.1 Análise da mionecrose	31
5.2 Análise da regeneração	34
5.3 Análise dos níveis de creatino-quinase (CK)	35
6. CONCLUSÃO	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
8. TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO	50

Abreviaturas

AE – azul de Evans

CDG – complexo distrofina-glicoproteínas

CK – enzima creatino-quinase

CRO – camundongo *mdx* tratado com o cromoglicato de sódio

CTRL – camundongo *mdx* controle

DABCO – 1,4-diazabicyclo [2.2.2] octano

DMD – distrofia muscular de Duchenne

HE – hematoxilina-eosina

HSF1 - heat-shock factor 1

hsp – heat-shock protein

hsp90 – heat-shock protein 90 KDa

hsp65 – heat-shock protein 65 KDa

hsp70 – heat-shock protein 70 KDa

L-NAME – L ω -nitro-L-arginina metil éster

mdx - X chromosome-linked muscular dystrophy

NOs – óxido nítrico sintase

nNOS – óxido nítrico sintase neuronal

eNOS – óxido nítrico sintase endotelial

iNOS – óxido nítrico sintase induzível

μ NOS – óxido nítrico sintase muscular

NO[•] - radical livre óxido nítrico

STN – músculo esternomastóideo

TA – músculo tibial anterior

RESUMO

Neste trabalho foi verificado se o cromoglicato de sódio protege os músculos distróficos de camundongos *mdx* da necrose. Camundongos *mdx* (n=8) com 14 dias de vida pós-natal, antes do início dos ciclos de degeneração e regeneração, foram tratados com cromoglicato de sódio (50mg/Kg/dia; intraperitoneal) por 16 dias. Camundongos *mdx* (n=8) com a mesma idade foram utilizados como grupo controle, recebendo salina pela mesma via e período. A necrose muscular foi quantificada através do marcador azul de Evans (AE), que penetra na fibra muscular somente quando há lesão do sarcolema. Secções do terço médio dos músculos esternomatóideo e tibial anterior foram obtidas para análise em HE e AE. Foram avaliados o número de fibras musculares positivas ao AE, de fibras musculares com núcleo periférico e de fibras com núcleo central. Foram quantificadas as áreas com infiltrado inflamatório exuberante com células no estágio inicial de regeneração muscular (Área Infl/Reg) e áreas com infiltrado inflamatório escasso com células em estágio avançado de regeneração. O cromoglicato de sódio promoveu diminuição significativa da mionecrose ($p<0,05$; teste t de *Student*) em ambos músculos e aumento da porcentagem de fibras com núcleo periférico. No músculo tibial anterior, a diminuição da mionecrose foi de 26% e o aumento de fibras com núcleo periférico, 30%. A área de Infl/Reg aumentou em ambos os músculos ($p<0,05$; teste t de *student*). Os resultados mostram que o cromoglicato de sódio, ministrado antes do início dos ciclos de degeneração/regeneração, protege os músculos distróficos da mionecrose e interfere nos estágios iniciais da regeneração.

Palavras-chave: camundongo *mdx*, cromoglicato de sódio, mionecrose, regeneração muscular.

ABSTRACT

In the present study, we verified whether disodium cromoglycate (cromolyn), an anti-allergic drug, could protect dystrophic *mdx* muscle fibers from degeneration. Treated *mdx* mice (n=8; 14 days of age) received daily intraperitoneal injections of cromolyn at a dose of 50mg/kg body weight in saline, during 15 days. Cromolyn treatment started before the cycles of muscle degeneration-regeneration had started. Control non-treated mice (n=8 *mdx*) were injected with an equivalent amount of saline. For visualization of muscle fiber damage, treated (n=5) and non-treated *mdx* (n=5) mice were injected with Evans blue dye (EBD), a marker of sarcolemmal lesion. Cryostat cross-sections of the sternomastoid (STN) and tibialis anterior (TA) muscles were stained with HE. The whole cross-sectional area of the muscles was divided into a regenerated area, an area of inflammatory cell infiltration/regeneration and an area of regeneration. The number of regenerated muscle fibers (central nucleated fibers), fibers with peripheral cell nuclei and degenerated fibers (positive to EBD) was counted in the regenerated area. The areas of inflammatory cell infiltration/regeneration and of regeneration were expressed as a percentage of the total transverse graft area. Cromolyn lead to a significant decrease in myonecrosis and in the percentage of central nucleated fibers ($p<0.05$; Student's t test). The number of fibers with peripheral nuclei increased in about 30% in the TA muscle. The area of inflammation-regeneration increased ($p<0.05$; Student's t test) in the cromolyn treated group. These results show that cromolyn treatment before the cycles of muscle fiber degeneration-regeneration started protects dystrophic muscle fiber from myonecrosis and promotes the earlier stages of muscle fiber regeneration.

1. INTRODUÇÃO

O termo “distrofia muscular progressiva” faz referência a um grupo de doenças degenerativas hereditárias causadas por alterações nos genes que codificam uma ampla variedade de proteínas, tais como as da matriz extracelular, proteínas associadas a membrana e proteínas da matriz nuclear da fibra muscular (Swash e Schwartz, 1988). A forma mais comum e severa das distrofias musculares nos humanos é a distrofia muscular de Duchenne (DMD). Esta é devida a mutação do gene localizado na banda Xp21 do cromossomo X que codifica a proteína distrofina, essencial para a manutenção da integridade das células musculares cardíacas e esqueléticas (Engel *et al*, 1994; Cohn e Campbell, 2000). No sarcolema, a distrofina está associada a glicoproteínas e forma o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG) (Brown e Dphil, 1997; Petrof, 2002; Spencer e Mellgren, 2002).

A ausência da distrofina interrompe a ligação entre a matriz celular e o citoesqueleto da fibra, promovendo instabilidade do sarcolema e desorganização dos componentes do CDG durante os ciclos de contração e relaxamento do músculo, o que permite o influxo exacerbado de íons cálcio, ativação de proteases endógenas dependentes do cálcio, inibição da atividade mitocondrial e hipercontração da fibra muscular (Vandebrouck *et al*, 2005). Evidências sugerem que a liberação de radicais livres nos músculos distróficos promova estresse oxidativo seguido por mionecrose (Disatnick *et al*, 1998).

O camundongo *mdx* (X chromosome-linked muscular dystrophy) é um modelo experimental largamente utilizado para o estudo da DMD (Bulfield *et al*, 1984; Muller *et al*, 2001; Sasaoka *et al*, 2003). Tal como no humano distrófico, apresenta mutação genética resultando na falta da distrofina e processo inflamatório intenso (Engel *et al*, 1994; Biggar *et al*, 2002; Hamer *et al*, 2002), tornando-se o modelo animal experimental mais utilizado para o estudo da doença, bem como das terapias farmacológicas (Khurana e Davies, 2003). Nos músculos distróficos de camundongos *mdx*, os ciclos de degeneração/regeneração se iniciam de

forma severa na terceira semana após o nascimento e se estendem até o segundo mês, quando diminuem em intensidade e se estabilizam (Lefaucheur *et al*, 1996).

A utilização de estratégias farmacológicas para tratamento da DMD tem por objetivo diminuir o acometimento muscular, minimizando os prejuízos funcionais decorrentes da doença e também permite o estudo da função de moléculas envolvidas no processo de necrose e regeneração muscular (Porter *et al*, 2002). Os corticosteróides prednisona e deflazacort são os antiinflamatórios mais utilizados em humanos na tentativa de minimizar a evolução da doença, porém seus efeitos colaterais são severos, tais como ganho de peso, perda de massa óssea e edema (Muntoni *et al*, 2002; Khurana e Davies, 2003).

O cromoglicato de sódio é um antiinflamatório não-hormonal que estabiliza a membrana plasmática de mastócitos, inibindo a liberação de histamina e leucotrienos em órgãos alvo tais como os brônquios, a mucosa nasal e o trato gastrintestinal. Seus efeitos colaterais são mínimos ou praticamente ausentes (Berman, 1983; Pesko, 1995). Também, liga-se diretamente ao domínio N-terminal da proteína de choque térmico de 90KDa (*heat-shock protein 90* -hsp90), interrompendo sua atividade chaperona (Okada *et al*, 2003). A inibição da hsp90 diminui a inflamação e o edema (Bucci *et al*, 2000; Wax *et al*, 2003).

Camundongos *mdx* adultos, submetidos a treinamento físico associado ao tratamento diário com cromoglicato de sódio, apresentaram aumento significativo na força muscular. Esta melhora funcional não foi acompanhada pela diminuição significativa nos níveis da enzima triptase, liberada pela degranulação dos mastócitos. Foi sugerido que o cromoglicato de sódio atuaria através de mecanismos desconhecidos, que não a estabilização dos mastócitos (Granchelli *et al*, 1996). Assim, levantamos a hipótese de que a droga poderia estabilizar o sarcolema e diminuir a necrose nos músculos distróficos de camundongos *mdx*.

1.1 Distrofia muscular de Duchenne

A DMD é uma doença recessiva provocada pela translocação, deleção ou mutação da banda Xp21 do braço curto do cromossomo X, responsável pela codificação da proteína distrofina. A distrofina, elemento essencial do CDG, está localizada na superfície interna da fibra muscular e sua função é promover a estabilidade do sarcolema. Também é encontrada nas células gliais, de Purkinje e Schwann. A doença acomete uma em cada 3500 crianças do sexo masculino, caracterizando-se por degeneração e substituição da fibra muscular por tecido adiposo, fraqueza seguida por perda da função motora e óbito ao redor da terceira década de vida por comprometimento cardiorrespiratório (Engel *et al*, 1994; Petrof, 1998; Biggar *et al*, 2002).

Na ausência da distrofina, as fibras musculares perdem a sua estabilidade tornando-se frágeis durante os ciclos de contração e relaxamento muscular. Isso permite o influxo exacerbado de íons cálcio, ativação de proteases endógenas, diminuição da atividade mitocondrial e hipercontração seguida por necrose da miofibra. Ao mesmo tempo, os componentes do CDG mostram-se desorganizados (Salimena *et al*, 2004). Inicia-se então um processo de regeneração muscular através da ativação de células satélites com posterior formação e amadurecimento dos miotubos em fibras musculares, porém, este é prejudicado ou insuficiente na DMD. Gradualmente os músculos são substituídos por gordura e tecido fibroso, o que justifica a perda da função observada nesses pacientes (Grounds *et al*, 2005a).

1.2 Distrofina e o complexo distrofina-glicoproteínas

Duas classes principais de moléculas associadas ao sarcolema da fibra muscular esquelética são responsáveis pela transmissão da força de contração gerada nas miofibrilas para o tecido conjuntivo adjacente ao músculo: o complexo distroglicana/sarcoglicana, incluindo o CDG (Figura 1), e as integrinas (Järvinen *et al*, 2005). A ausência de algumas destas moléculas do

sarcolema origina diferentes tipos de distrofias musculares. No caso da DMD, a doença é decorrente da falta da distrofina no CDG. A ausência da distrofina, associada à força contrátil dos sarcômeros, resulta em fragilidade e dano do sarcolema com conseqüente necrose muscular (Cohn e Campbell, 2000; Grounds *et al*, 2005a).

A isoforma predominante da distrofina encontrada nos músculos esqueléticos tem 3685 aminoácidos (427 kDa) divididos em quatro domínios; o primeiro relacionado a α -actina, o segundo ligado à espectrina, o terceiro à ancarina e o último a um complexo de proteínas extracelulares tais como a α 2-laminina e α -dystroglicana (Engel *et al*, 1994). Também se relaciona indiretamente com glicoproteínas submembranas (sintrofina, óxido nítrico sintase - NOS). Assim, a distrofina é fundamental para a organização dos diversos elementos que compõem o CDG (para revisão vide Bogdanovich *et al*, 2004).

A isoforma neuronal da NOS (nNOS) é um elemento importante do CDG (Silvagno *et al*, 1996). Estudos realizados em músculos de camundongos normais mostraram que a localização da nNOS no sarcolema coincidia com a distrofina. Posteriormente descobriu-se que a nNOS ligava-se a α 1-sintrofina do CDG (Brenman *et al*, 1996). No sarcolema dos pacientes com DMD e no camundongo *mdx* a nNOS está diminuída, porém é expressa em pequenas quantidades no citosol (Voisin *et al*, 2005). Desta forma, devido a relação da NOS com o CDG, atribui-se importância funcional desta proteína no processo fisiopatológico da distrofia (Dudley *et al*, 2006).

Das três principais isoformas de NOS, duas são essencialmente cálcio-dependentes (NOS neuronal - nNOS e NOS endotelial - eNOS), e uma cálcio independente (NOS induzível - iNOS) (Bredt, 1999). Embora a principal forma expressa nos músculos esqueléticos seja a nNOS, pequenas quantidades de eNOS e iNOS também são encontradas (Silvagno *et al*, 1996). Uma outra isoforma foi identificada no músculo esquelético e denominada μ NOS (Nakane *et al*,

1993). Todas as isoformas são oxiredutases, as quais convertem a L-arginina em L-citrulina, gerando o radical livre óxido nítrico (NO) (Bredt e Snyder, 1994). A interação entre a nNOS e o complexo Ca^{2+} -calmodulina, mediada por proteínas presentes no citosol, tal como a *hsp90*, aumentaria a liberação de NO (Song *et al*, 2001).

No músculo normal, a indução do NO promove resposta vasodilatadora necessária para o suprimento de metabólitos e oxigênio para o trabalho muscular, seja cardíaco ou esquelético. Também equilibra o efeito vasoconstritor do sistema adrenérgico simpático (Barton *et al*, 2005; Voisin *et al*, 2005).

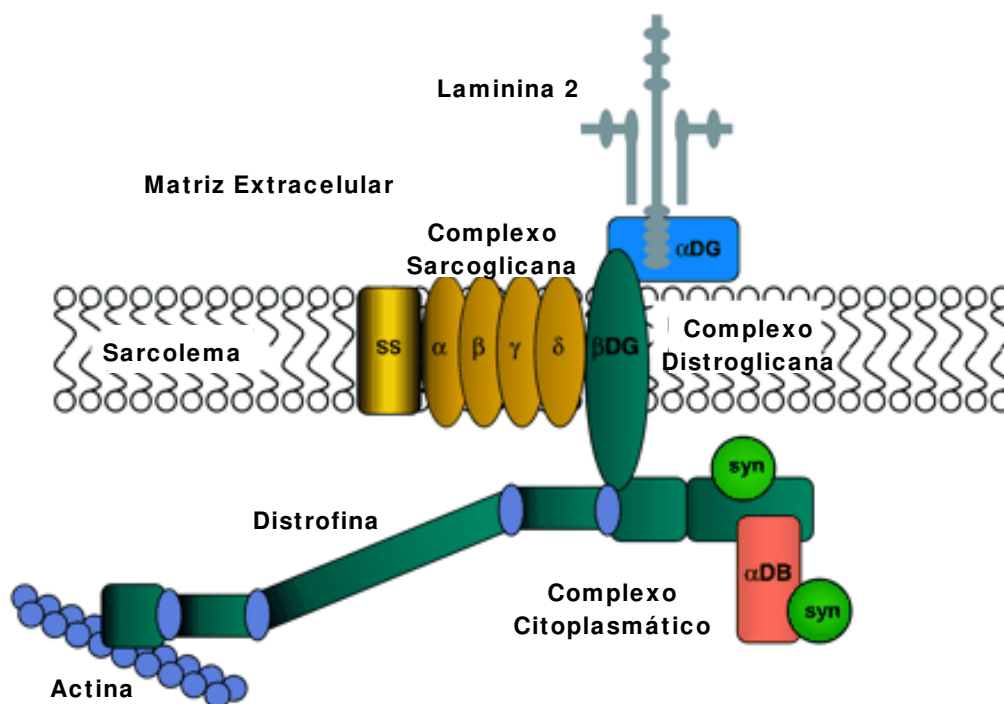


Figura 1. Modelo esquemático do complexo distrofina-glicoproteínas (modificado de Blake *et al*, 2002).

1.3 Camundongo *mdx*

O camundongo da linhagem *mdx*, proveniente de uma mutação espontânea identificada na linhagem de camundongos C57BL/10ScSn, tornou-se o modelo experimental preferido para o estudo das distrofinopatias, bem como das terapias farmacológicas, em particular da DMD, pois, tal como o humano distrófico, o *mdx* apresenta mutação genética, ausência da distrofina e processo inflamatório intenso, além de mostrar-se acessível devido à larga disponibilidade e baixo custo de produção e manutenção (Bulfield *et al*, 1984; Tanabe *et al*, 1986; Hamer *et al*, 2002; Sasaoka *et al*, 2003).

Os músculos esqueléticos do camundongo *mdx* apresentam ciclos de degeneração e regeneração que se iniciam na terceira semana de vida e se continuam por toda a vida do animal (Pastoret e Sebillé, 1995). Estudos mostraram que no sétimo dia pós-nascimento os camundongos apresentaram cerca de 0,62% das fibras musculares regeneradas. No décimo quarto e vigésimo primeiro dias, 2,2% e 5%, respectivamente, períodos esses caracterizados como estado pré-necrótico (Minatel *et al*, 2003; Porter *et al*, 2003a). Até os nove meses de idade, nota-se heterogeneidade no diâmetro das fibras musculares bem como o aumento significativo do número de fibras com núcleo central (Briguet *et al*, 2004). Acredita-se que o início repentino da mionecrose observada na terceira semana de idade seja devido ao aumento da atividade muscular que ocorre neste período associado a alterações na concentração de componentes citoplasmáticos, que levariam a susceptibilidade das fibras musculares (Cullen e Jarros, 1988; Disatnik *et al*, 1998).

No camundongo *mdx*, ao contrário do que acontece nos humanos com DMD, a regeneração parece compensar adequadamente o processo degenerativo muscular com menor fibrose e perda funcional (Yablonka-Reuveni e Anderson, 2006).

1.4 Necrose muscular no camundongo *mdx*

A força de contração gerada pelas proteínas miofibrilares localizadas no citoplasma da fibra muscular esquelética é transferida primeiramente para as proteínas da face interna do sarcolema, dentre elas a distrofina, em seguida para as proteínas que cruzam o sarcolema e finalmente para as proteínas que se ligam ao tecido conjuntivo extracelular (endomísio, perimísio e epimísio) (Järvinen *et al*, 2005). Assim, a ausência da distrofina no complexo CDG resulta em fragilidade da miofibrila durante os ciclos de contração e relaxamento, pois a força contrátil dos sarcômeros danifica o sarcolema e leva a necrose da fibra muscular (Grounds *et al*, 2005a).

Desta forma, foi proposto que o evento inicial para a necrose da fibra muscular no camundongo *mdx* seja a ausência da distrofina com conseqüente desorganização do CDG. A evidência para este fato é a perda de conteúdo intracelular da fibra muscular distrófica para o meio extracelular. Como exemplo, podemos citar a enzima creatino-quinase (CK). A perda da integridade do sarcolema permite também o influxo de proteínas e íons para o meio intracelular, tais como albumina e íons cálcio, que promovem a mionecrose (Straub *et al*, 1997; Amthor *et al*, 2004).

Outros eventos também contribuiriam para o intenso processo de degeneração muscular. Um destes eventos seria a desorganização e funcionamento das moléculas associadas ao CDG. Estudos do papel da nNOS e NO permitiram compreender parte do mecanismo fisiopatológico da distrofia muscular.

Nos humanos como DMD, bem como nos camundongos *mdx*, há notável diminuição nos níveis de nNOS no sarcolema em razão da desorganização do CDG promovida pela ausência da distrofina. Em conseqüência, ocorre a diminuição da produção de NO e isquemia dos músculos distróficos pois, como o NO derivado dos músculos esqueléticos parece ser crítico para a manutenção adequada do fluxo sanguíneo para o tecido, o processo de oposição a vasoconstrição

simpática normal dos vasos durante as atividades contráteis estaria prejudicado, resultando em variáveis níveis de isquemia que levariam a necrose muscular, mesmo na ausência de anormalidade vascular (Chang *et al*, 1996; Chaubourt *et al*, 2002). Como uma artéria em comum supre determinadas regiões dentro do músculo, esse mecanismo poderia explicar as diferenças encontradas no processo de necrose, o qual ocorre de forma não uniforme dentro de um mesmo músculo (Rando, 2001).

Outra hipótese é que o óxido nítrico agiria como agente antioxidante na célula, sendo importante para o processo de proteção contra a ação dos agentes oxidantes liberados no citoplasma oriundos do metabolismo da fibra muscular (Voisin *et al*, 2005).

No músculo esquelético normal, o NO atuaria através de mecanismos de oxidação e/ou S-nitrosilação de proteínas dos canais de cálcio do retículo sarcoplasmático. Assim, quando se inibiu a NOS com L-NAME, notou-se a diminuição de cálcio liberado através do retículo sarcoplasmático, do peso e área de secção transversa muscular e do rendimento funcional (Wang *et al*, 2001; Pouvreau e Jacquemond, 2005).

Nos músculos distróficos de animais *mdx*, o tratamento com L-arginina melhorou o fenótipo da musculatura distrófica, pois foi demonstrado que o NO ativou precocemente as células satélites durante o reparo muscular pós-lesão, diminuiu o processo inflamatório e aumentou a expressão de utrofina, compensando parcialmente a ausência da distrofina (Barton *et al*, 2005).

Certos músculos, como os intrínsecos da laringe e os extraoculares, ao contrário dos músculos dos membros e da respiração, parecem ser protegidos contra a necrose (Porter *et al*, 2003). Porém, não se sabe se esses músculos são seletivamente poupados por causa da característica anatômica de sua irrigação vascular ou por causa da composição bioquímica das fibras musculares que confere menor susceptibilidade ao dano oxidativo. Estudo da NOS nos

músculos extraoculares do animal *mdx* mostrou que a preservação seletiva desses músculos não estava relacionada a enzima pois, da mesma forma que nos músculos distróficos dos membros e no diafragma, mostraram reduzida concentração da NOS no sarcolema e aumento no citosol (Wehling *et al*, 1998).

Uma hipótese freqüentemente citada e que poderia contribuir para a mionecrose é o funcionamento dos canais de cálcio da fibra muscular distrófica. Foi sugerido que os mecanismos controladores da concentração de cálcio estariam prejudicados devido a ausência da distrofina, resultando no influxo e acúmulo intracelular de grandes quantidades de íons cálcio, como demonstrado esquematicamente na Figura 2 (Vandebrouck *et al*, 2005). Isso colaboraria para a ruptura do sarcolema, para a hipercontração da miofibrila e para a ativação de proteases endógenas dependentes do cálcio, resultando na necrose da fibra muscular (Straub *et al*, 1997). Tem-se sugerido que os músculos distróficos extraoculares são capazes de manter a homeostase do cálcio, justificando assim a resistência desses músculos para o processo de degeneração decorrente da ausência de distrofina (Khurana *et al*, 1995).

Nas fibras em hipercontração, característica histológica da fase de pré-necrose muscular, foi observada indução significativa de proteínas de choque térmico (*heat shock protein – hsp*), mais especificamente a *hsp65* e *hsp70* e ubiquitina. Estas atuam como moléculas protetoras contra o estresse oxidativo ocorrido nestas fibras. Embora o cálcio induza o estresse, ele sozinho não estaria envolvido na indução das *hsp's*. A toxicidade dos metabólitos e a presença de proteínas danificadas no interior das fibras hipercontraídas seriam provavelmente os indutores das *hsp's* (Bornman *et al*, 1995).

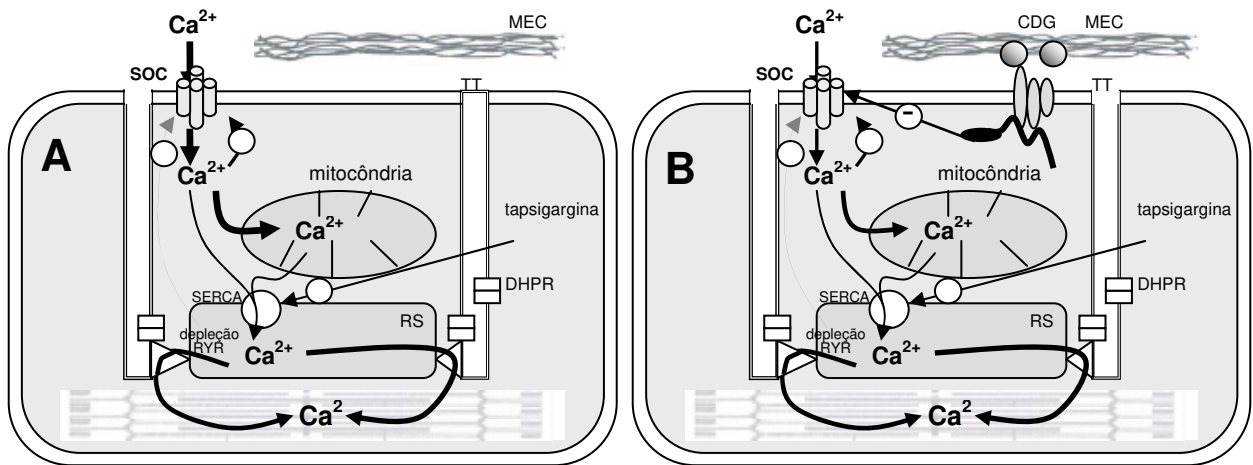


Figura 2. Modelo esquemático para o movimento do cálcio na ausência (A) e presença de distrofina (B). A despolarização ativa a abertura dos receptores ryanodina (RyR) no retículo sarcoplasmático (RS) e o cálcio é liberado. A despolarização mantida ou repetida leva a diminuição da quantidade de Ca^{2+} no RS. Isso é evidenciado pelo bloqueio da bomba de cálcio SERCA ATPase por tapsigargina. A depleção na quantidade de cálcio estocado no RS induz a ativação de canais dependentes da concentração de cálcio (SOC, store-operated channel), resultando no influxo de íons cálcio. Este mecanismo é demonstrado em miotubos com ausência de distrofina (A), bem como nas mitocôndrias, que mantêm a ativação do SOC quando há reduzida quantidade de íons cálcio no citosol. Em miotubos que expressam a distrofina, a entrada do cálcio para armazenagem no RS é moderada devido a interação de SOC com o complexo distrofina-glicoproteínas (CDG). **DHPR**, receptor 1,4-dihidropiridina; **MEC**, matriz extracelular (Modificado de Vandebrouck *et al*, 2005).

1.5 Regeneração muscular no camundongo *mdx*

No camundongo *mdx* jovem a regeneração muscular parece compensar adequadamente o processo de necrose, havendo menos fibrose e menor perda funcional. Nos animais idosos a regeneração muscular não compensa adequadamente o processo de mionecrose, provavelmente devido a uma resposta inflamatória insuficiente ou devido ao esgotamento das células satélites (Reimann *et al*, 2000; Rando, 2001; Marques *et al*, 2002).

Após seis meses de idade, alguns músculos apresentam-se quase completamente regenerados, com cerca de 80-90% de fibras com núcleo central, restando apenas poucas áreas de degeneração\regeneração muscular (Pastoret e Seville, 1995).

A regeneração muscular envolve etapas comparáveis a miogênese embrionária, tal como ativação de células satélites, liberação de fatores reguladores da miogênese (MyoD, miogenina, MRF4 e Myf-5), fusão e diferenciação de mioblastos e maturação do miotubo em fibra muscular (Charge e Rudnicki, 2004). No processo de regeneração, o MyoD é necessário para iniciar o processo de diferenciação das células satélites em mioblastos e para a ativação da miogenina. A miogenina auxilia o desenvolvimento do miotubo para a formação da fibra muscular madura (Jin *et al*, 2000). Durante a fase de regeneração foi observado o aumento da expressão de algumas proteínas, tais como a *hsp90* e ubiquitina, que colaborariam para a síntese de novas proteínas (Bornman *et al*, 1995).

A fibra muscular em regeneração apresenta o núcleo volumoso, com aspecto vesicular, cromatina condensada, nucléolo proeminente e citoplasma basófilo, devido a grande quantidade de RNA e escassez de elementos contráteis, visível pelo número reduzido de estriações (Torres e Duchon, 1987). Já a fibra muscular regenerada é caracterizada pela centro-nucleação, citoplasma eosinófilo e aumento da relação citoplasma/núcleo (Pastoret e Seville, 1995; Earnshaw *et al*, 2002).

1.6 Cromoglicato de sódio

O cromoglicato é um agente antiinflamatório não hormonal que foi introduzido primeiramente para o tratamento da asma brônquica, na década de 60. Com o passar dos anos, evidenciou-se que a droga também poderia ser utilizada no tratamento de outras patologias em

que os mastócitos estivessem envolvidos, tal como rinite alérgica e mastocitose sistêmica (Berman, 1983; Fain *et al*, 2005; Meltzer, 2006).

O cromoglicato de sódio ($C_{23}H_{14}Na_2O_{11}$, peso molecular 512,33, Figura 3), tal como demonstrado em experimentos *in vitro* e *in vivo*, estabiliza a membrana plasmática de mastócitos, impedindo a liberação de histamina e leucotrienos em órgãos alvo tais como brônquios, mucosa nasal e trato gastrointestinal (Pesko, 1995; Ginsburg e Baldwin, 2004). Também se liga diretamente ao domínio N-terminal da proteína de choque térmico de 90 KDa (*heat-shock protein-hsp90*), interrompendo a função desta proteína (Okada *et al*, 2003).

O cromoglicato de sódio tem baixa biodisponibilidade quando administrado por via oral (menor que 1%) devido a propriedade físico-química da molécula que se apresenta preferivelmente hidrofílica, formando uma camada de hidratação ao seu redor, a qual dificulta a passagem pela camada bilipídica das células intestinais (Ding *et al*, 2004). Quando administrado de forma sistêmica é carregado espontaneamente pela albumina, devido à natureza eletrostática desses elementos (Hu *et al*, 2005).

Camundongos adultos da linhagem *mdx*, submetidos a estresse físico e tratados diariamente com cromoglicato de sódio, apresentaram aumento significativo na força muscular. Contraditoriamente, esta melhora funcional não foi acompanhada por uma melhora nos níveis da enzima triptase (liberada pela degranulação dos mastócitos) e da enzima CK (indicador de mionecrose) (Granchelli *et al*, 1996).

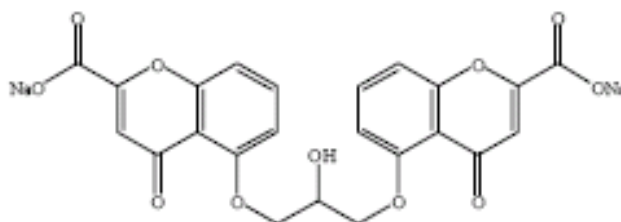


Figura 3. Estrutura Molecular do Cromoglicato de Sódio (Hu *et al*, 2005).

2. OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi verificar se o tratamento precoce com o cromoglicato de sódio, antes que se iniciem os ciclos de degeneração/regeneração, impede a necrose muscular em camundongos *mdx*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem *mdx*, de ambos os sexos, obtidos de casais mantidos no biotério do Departamento de Anatomia do Instituto de Biologia. As matrizes foram oriundas do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da UNICAMP. Após o nascimento os filhotes permaneceram com a fêmea até o 25º dia de vida pós-natal, sendo posteriormente separados. Durante todo o experimento, os animais estiveram em caixas plásticas com 12 horas de ciclo claro/escuro, ração e água *ad libitum*.

3.2 Grupos experimentais e tratamento com o cromoglicato de sódio

Os animais *mdx* foram tratados a partir do 14º dia de vida pós-natal. Um grupo recebeu cromoglicato de sódio (50mg/Kg; Galena®; n=8; grupo *mdx* CRO) diluído em soro fisiológico e administrado via intra-peritonal diariamente, até completar 30 dias de idade. Outro grupo, denominado grupo controle (n=8; grupo *mdx* CTRL), recebeu soro fisiológico ao invés da droga pela mesma via e período. Após o término do tratamento, os animais de ambos os grupos foram anestesiados com hidrato de cloral 10% m/v (0,1 mL/10g de camundongo) e os músculos esternomastóideo e tibial anterior retirados para análise histológica e uma amostra de sangue coletada para análise de creatino-quinase total.

Os animais tratados com o cromoglicato de sódio foram pesados diariamente em balança semi-analítica (Marte® AS2000C) para que a dose da droga fosse ajustada ao peso do animal.

3.3 Análise da integridade do sarcolema

O corante azul de Evans (AE; tetrasodium diazo salt Evans blue dye; Sigma®) é amplamente usado como um marcador *in vivo* de lesões do sarcolema, evidenciando somente

fibras musculares degeneradas ou em degeneração (Matsuda *et al*, 1995). O acúmulo intracelular do corante na fibra muscular esquelética indica perda da integridade e conseqüente alteração na permeabilidade do sarcolema (Hamer *et al*, 2002).

Ao completarem 29 dias de idade, 15 dias após o início do tratamento, cinco dos animais de cada grupo foram pesados e receberam por via intraperitonal 0,01mL/g de uma solução a 1%*m/v* de AE (solução em PBS: 14g de fosfato de sódio monofásico, 4,3g de fosfato de potássio dibásico anidro, 72g de cloreto de sódio em um litro de água destilada; pH 7,5). Após 12 horas da injeção, os animais foram anestesiados conforme o item 3.2. O sucesso da injeção do AE foi identificado pela coloração azul das orelhas e patas dos animais.

3.4 Preparo dos músculos para análise histológica

Os músculos esternomastóideo (STN) e tibial anterior (TA) foram retirados e colocados em suporte de madeira com *gum tragacanth* (Sigma-Aldrich®), mantidos por 45 segundos em *n*-hexano (J.T. Baker®) a -130°C, rapidamente transferidos para nitrogênio líquido e finalmente armazenados em biofreezer a -70°C até o processamento para análise.

A obtenção dos cortes foi realizada em criostato (Microm®-HS505E), sendo os músculos mantidos previamente à temperatura de -23°C por 30 minutos. Após esse tempo, foram realizados cortes transversais com 10 µm de espessura do terço médio dos músculos. Foram obtidas duas lâminas com seqüência alternada de quatro cortes, uma para coloração e análise em hematoxilina-eosina (HE) e outra para análise do AE em fluorescência.

As lâminas a serem coradas com HE foram imersas em solução de hematoxilina de Harris por 30 segundos em temperatura ambiente, lavadas em água corrente por dez minutos e imersas em solução de eosina por 15 segundos, sendo posteriormente retirado o excesso de eosina em

água corrente. Após, foram desidratadas em seqüência de álcoois e xilol e montadas em meio de montagem alkan (Alkimia®). As lâminas para análise da integridade do sarcolema, por meio do AE, foram lavadas em acetona, em seguida com PBS, secas a temperatura ambiente e montadas em meio para fluorescência DABCO (Sigma®).

3.5 Análise dos cortes histológicos por meio de HE e AE

As lâminas coradas com HE foram analisadas com auxílio de objetiva de 20X e ocular 10X contendo um retículo quadrilátero com 100 pontos, acoplada ao microscópio de luz binocular (Carl Zeiss®). Para a quantificação das fibras musculares utilizou-se um contador manual. Imagens foram adquiridas através de vídeo câmera (Nikon® Express Series) acoplada ao microscópio de luz (Nikon® Eclipse E 400) com objetiva de 20X e conectado a um computador com software Image Pro-Express®. Imagens fluorescentes foram obtidas utilizando-se vídeo câmera (Hamamatsu® C2400) acoplada ao microscópio de fluorescência (Nikon® EFD-3) com objetivas de 10X e 20X e comprimento de onda de 590nm, conectado a um computador Intel Pentium 100 com software Adobe Photoshop® 4.0.1.

Para cada animal de ambos os grupos, dois cortes aleatórios de cada lâmina foram analisados qualitativa e quantitativamente. Na análise qualitativa foram observadas as diferentes características histológicas das fibras musculares nas secções transversais dos músculos distróficos corados em HE. Assim, verificou-se a presença de fibras com núcleo periférico (fibras que não passaram pelo processo de necrose), fibras necróticas (fibras poucos coradas pela HE e com contorno irregular. Em microscopia de fluorescência estas fibras mostram o citoplasma positivo ao AE), fibras em estágio inicial de regeneração (células de menor diâmetro, citoplasma fortemente basófilo, núcleo localizado centralmente e presença de abundante infiltrado

inflamatório ao redor dessas células), fibras em estágio avançado de regeneração (células de menor diâmetro, citoplasma levemente basófilo, núcleo localizado centralmente e escassa presença de infiltrado inflamatório ao redor das células) e fibras completamente regeneradas (fibras com núcleo central, citoplasma eosinófilo e diâmetro equivalente a de fibras com núcleo periférico).

Cada secção transversal muscular foi dividida em três áreas com características histológicas distintas. Uma área que continha fibras no estágio inicial de regeneração, denominada Área Inflamação/Regeneração (Área Infl/Reg). Uma área que continha fibras no estágio avançado de regeneração, denominada Área de Regeneração (Área Reg) e a terceira área que continha fibras com núcleo periférico (np), núcleo central (nc) e fibras necróticas, denominada área núcleo central e periférico (Área NCP). Essas áreas foram medidas em μm^2 utilizando o software Image Pro-Express® e expressas como porcentagem da área total da secção transversal muscular (Grounds e Torrisi, 2004; Grounds *et al*, 2005b).

Na Área NCP quantificou-se, por meio de contagem manual, o número total de fibras musculares, o número de fibras com núcleo central e de fibras necróticas. As fibras necróticas foram observadas pela técnica do AE por meio de microscopia de fluorescência. As fibras com núcleo periférico foram quantificadas segundo a fórmula $\text{np} = \text{número total de fibras} - (\text{nc} + \text{AE})$, onde np= número de fibras com núcleo periférico; nc= número de fibras com núcleo central (regeneradas) e AE= número de fibras positivas ao AE (necróticas). Os resultados foram expressos em porcentagem do número total de fibras quantificadas.

Obtidos os resultados, calculou-se a média, desvio-padrão e a significância (teste t de *student* com $p \leq 0,05^*$) entre os grupos experimentais *mdx* CRO e *mdx* CTRL.

3.6 Determinação da creatino-quinase (CK) total no plasma sanguíneo

O sangue de três animais de cada grupo foi coletado sob anestesia, de acordo com o item 2.2. Introduziu-se um capilar de vidro heparinizado no plexo retrobulbar e por gotejamento procedeu-se a coleta de 1,5 mL de sangue para um eppendorf®. Em seguida, o sangue foi centrifugado (centrifuga refrigerada Sigma® 3-18k) a 12000 rpm, 4°C por 15 minutos. Para quantificação da CK total utilizou-se o kit CK Nac Cinético Crystal da Bioclin®. As absorbâncias das amostras foram lidas a 25°C utilizando-se espectrofotômetro U.V (Thermo Electron Corporation® Spectrophotometer Genesys 20) com comprimento de onda de 340 nm e cubetas de quartzo de 1cm de caminho óptico. Os valores foram expressos em Unidades/Litro (U/L).

4. RESULTADOS

4.1 Análise qualitativa

Os músculos STN e TA dos grupos *mdx* CRO e *mdx* CTRL apresentaram fibras musculares com diferentes características histológicas. Foram observadas fibras com núcleo periférico, fibras em processo de degeneração, fibras em diferentes estágios de regeneração e fibras completamente regeneradas.

As fibras com núcleo periférico apresentaram formato poligonal e em justaposição com outras fibras de mesma característica (Fig. 4 A e B). As fibras em degeneração foram evidenciadas pela presença de azul de Evans no seu interior (Fig 5A). Estas fibras mostraram contornos irregulares, fracamente coradas pelo HE e aparentemente fragmentadas (Fig 5B).

As fibras musculares em regeneração foram classificadas em dois estágios, de acordo com as suas características morfológicas e a celularidade local. Fibras no estágio inicial de regeneração foram caracterizadas por pequenos miócitos fortemente basófilos com núcleo central, entremeado por infiltrado inflamatório exuberante, em áreas de grande celularidade (Áreas de Inflamação/Regeneração; Fig. 6A e B). Fibras no estágio mais avançado de regeneração foram caracterizadas por citoplasma levemente basófilo, núcleo central, maior proporção de citoplasma em relação ao volume nuclear e diminuição aparente do infiltrado inflamatório, em áreas de menor celularidade (Áreas de Regeneração; Fig. 7A e B).

Fibras regeneradas foram caracterizadas pelo núcleo centralizado, condensado, citoplasma eosinófilo e diâmetro da fibra muscular próximo ao de uma fibra muscular esquelética com núcleo periférico (Fig. 8A e B).

Fibras com núcleo periférico

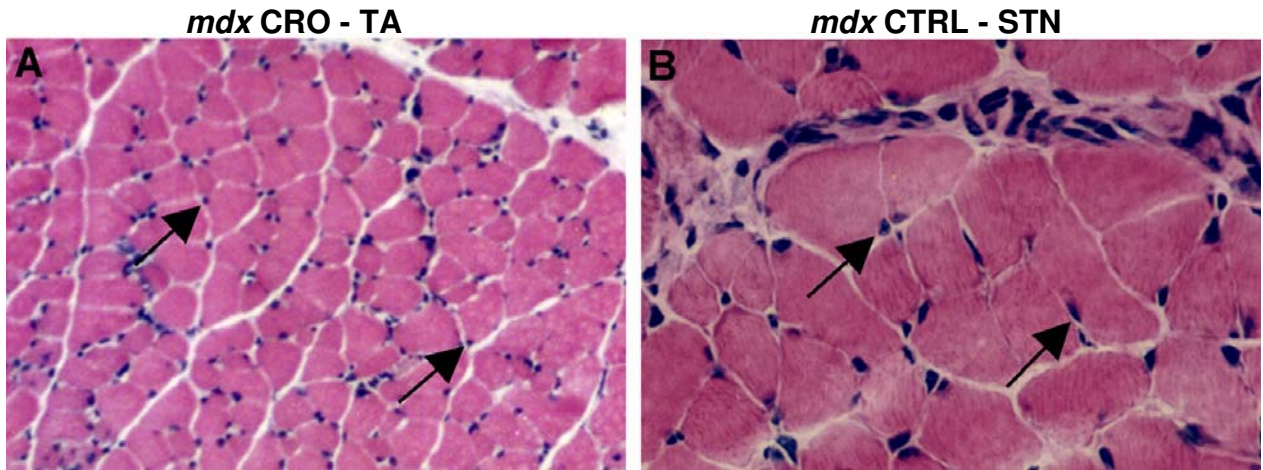


Figura 4. Secção transversal dos músculos esqueléticos distróficos TA do grupo *mdx* CRO (A) e STN do grupo *mdx* CTRL (B) mostrando fibras com núcleo periférico (setas). Coloração HE. Aumento (A, 200X e B, 400X)

Fibras em degeneração

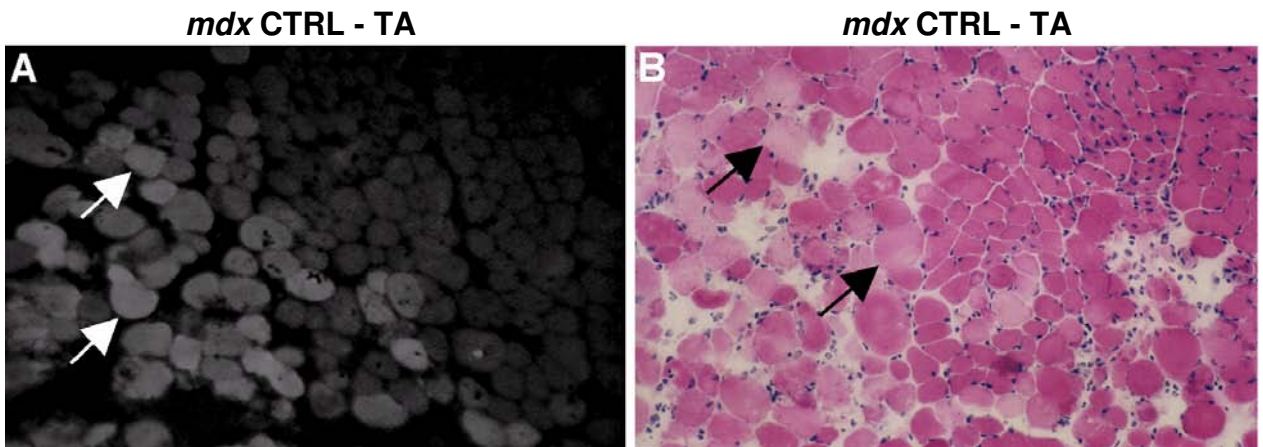


Figura 5. Secção transversal do músculo esquelético distrófico TA do grupo *mdx* CTRL mostrando fibras necróticas marcadas pelo azul de Evans (A) e HE (B). Em A, fibras positivas ao azul de Evans (setas brancas). Em B, notam-se fibras pouco coradas e com contorno irregular (setas pretas). Aumento 200X.

Fibras em regeneração: estágio inicial

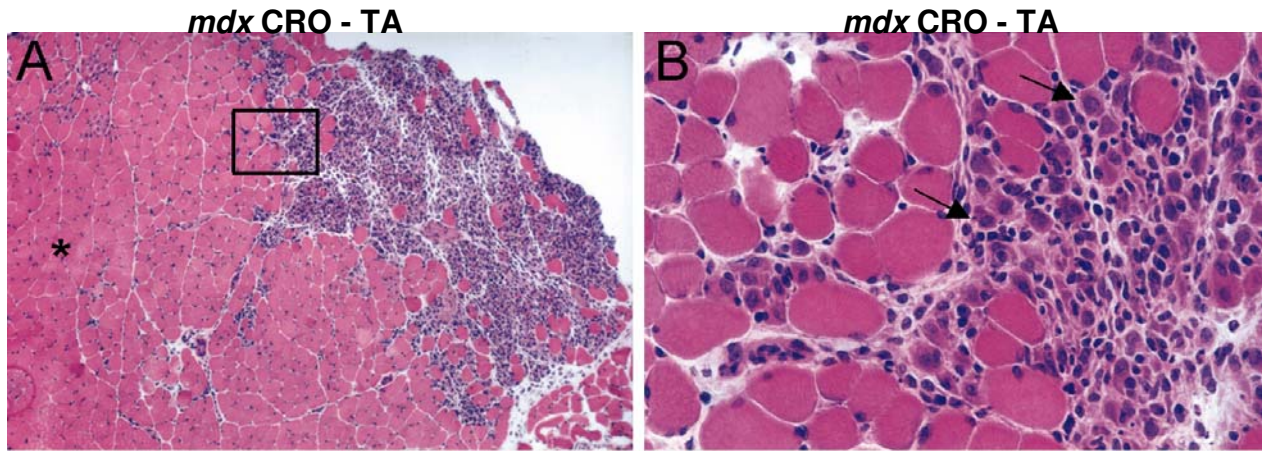


Figura 6. Secção transversal dos músculos esqueléticos distróficos. A, TA do grupo *mdx* CRO (100X); B, TA do grupo *mdx* CRO (400X). B representa o quadro em detalhe na figura A mostrando fibras no estágio inicial de regeneração (setas). Asterisco em A representa área com fibras com núcleo central e periférico. Coloração HE.

Fibras em regeneração: estágio avançado

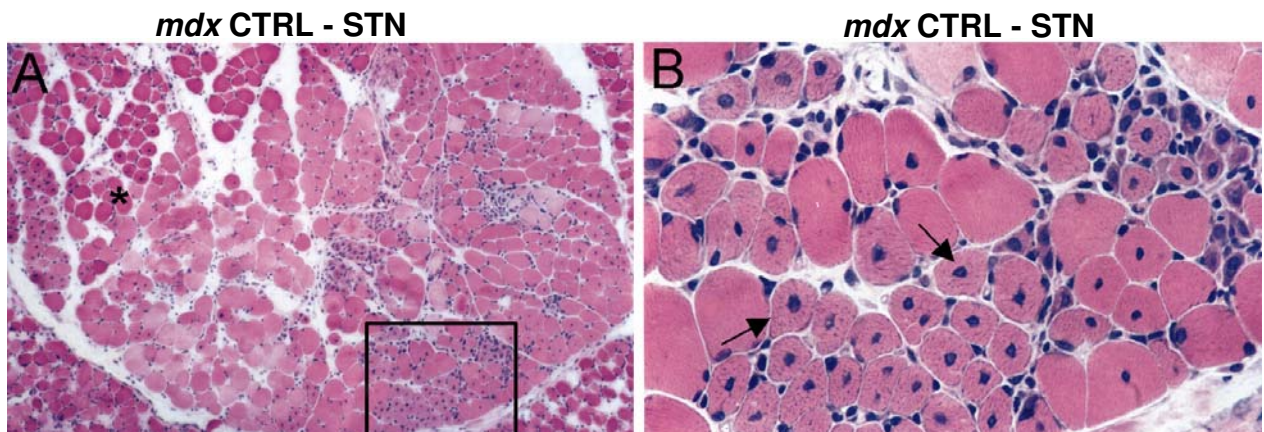


Figura 7. Secção transversal dos músculos esqueléticos distróficos. A, STN do grupo *mdx* CTRL (100X); B, STN do grupo *mdx* CTRL (400X). B representa o quadro em detalhe na figura A mostrando fibras no estágio tardio de regeneração (setas). Asterisco em A representa área com fibras com núcleo central e periférico. Observa-se também em A aumento do espaço entre grupos de fibras musculares. Coloração HE.

Fibras regeneradas

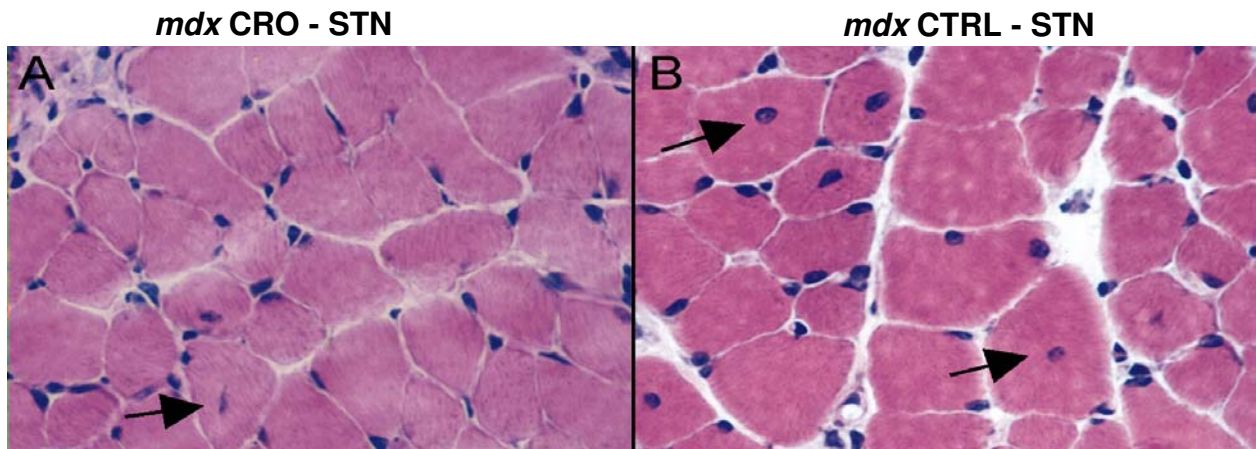


Figura 8. Secção transversal dos músculos esqueléticos distróficos mostrando fibras regeneradas com núcleo central (setas). A, STN do grupo *mdx* CRO. B, STN do grupo *mdx* CTRL. Coloração HE. Aumento 400X.

4.2 Análise quantitativa

Não houve diferença significativa para o peso corporal durante o período de estudo entre os grupos CRO e CTRL. As médias de peso dos animais do grupo CRO e CTRL foram de $7,1\text{g} \pm 0,9$ e $8,0\text{g} \pm 0,9$, respectivamente ($p > 0,05$; teste t de *student*).

No grupo de animais tratado com cromoglicato de sódio (*mdx* CRO), a porcentagem de fibras com núcleo periférico foi significativamente maior apenas no músculo TA. Nos animais do grupo *mdx* CTRL haviam $55,12 \pm 25,7\%$ de fibras com núcleo periférico, enquanto que nos animais do grupo *mdx* CRO haviam $86,69 \pm 6,6\%$ de fibras com núcleo periférico ($p < 0,05^*$), um aumento de cerca de 30%. No músculo STN esta diferença não foi significativa (Tabela 1), embora os animais do grupo *mdx* CRO apresentassem um aumento de cerca de 5% de fibras com núcleo periférico em relação aos animais do grupo *mdx* CTRL.

A porcentagem de fibras em degeneração diminuiu significativamente em ambos os músculos do grupo *mdx* CRO ($p < 0,05^*$; Tabela 1). No músculo TA, esta diminuição foi mais

evidente, onde se observou uma redução de cerca de 26% na porcentagem de fibras necróticas (%AE), enquanto que no músculo STN a diminuição foi de aproximadamente 5,5%.

Houve diminuição significativa na porcentagem de fibras regeneradas (%nc) apenas no músculo TA do grupo tratado com o cromoglicato de sódio. Embora no músculo STN também tenha ocorrido diminuição da %nc, esta diferença não foi significativa (Tabela 1).

O número total de fibras musculares diminuiu significativamente no músculo STN de animais tratados com o cromoglicato de sódio, o mesmo não sendo observado no músculo TA (Tabela 1).

Tabela 1. Comparação entre a porcentagem de fibras com núcleo periférico, porcentagem de fibras marcadas pelo azul de Evans, porcentagem de fibras com núcleo central e número total de fibras dos músculos distróficos esternomastóideo (STN) e tibial anterior (TA) dos grupos *mdx* CTRL e *mdx* CRO

	<i>mdx</i>	%np	%AE	% nc	Nº Total de Fibras
STN	CTRL	60,72±9,02	10,03±7,85	29,26±3,79	947 ±117,13
	CRO	66,26±6,91	4,55* ±2,25	29,07±6,25	787* ±71,02
TA	CTRL	55,12±25,70	28,63±26,21	16,25±2,93	1598±521,1
	CRO	86,69* ±6,60	2,33* ±1,42	10,98* ±6,05	1539±256,18

STN, músculo esternomastóideo; TA, músculo tibial anterior; %np, porcentagem de fibras com núcleo periférico; %AE, porcentagem de fibras positivas ao azul de Evans; %nc, porcentagem de fibras regeneradas com núcleo central; Nº Total de Fibras, número total de fibras musculares.

*p<0,05; Teste t de *student*.

O tratamento com o cromoglicato de sódio promoveu aumento significativo da porcentagem da área de inflamação/regeneração (% Área Infl/Reg; Tabela 2), a qual continha fibras em estágios iniciais de regeneração (Figura 6A e B). Este aumento foi mais evidente no músculo TA (aumento de 11,35%) do que no STN (aumento de 5,65%).

A porcentagem da área de regeneração (%Área Reg), contendo fibras musculares em estágios mais avançados de regeneração (Figura 7A e B), não se modificou com o tratamento pela droga em ambos os músculos estudados.

A porcentagem da área total de secção transversal contendo fibras com núcleo central e periférico (%NCP) diminuiu significativamente no músculo TA (Figuras 6 e 7; asterisco). A área de secção transversal dos músculos STN e TA do grupo *mdx* CRO diminuiu significativamente (Tabela 2).

Tabela 2. Comparação entre a porcentagem da área de fibras em processo inicial de regeneração, porcentagem da área de fibras no estágio avançado de regeneração, porcentagem da área de fibras com núcleo central e periférico e área da secção transversal muscular dos músculos distróficos esternomastóideo (STN) e tibial anterior (TA) dos grupos *mdx* CTRL e *mdx* CRO

	<i>mdx</i>	%Área Infl/Reg	%Área Reg	%Área NCP	Área da Secção Transversal Muscular x 10 ³ (µm ²)
STN	CTRL	3,14±2,23	8,08±4,13	88,77±4,90	1252,37±211,09
	CRO	8,79* ±5,33	7,10±4,54	84,12±7,04	883,54* ±210,40
TA	CTRL	0,85±1,43	5,31±4,33	93,84±3,71	2768,47±481,42
	CRO	12,20* ±10,90	5,13±4,34	82,67* ±10,42	2020,51* ±222,18

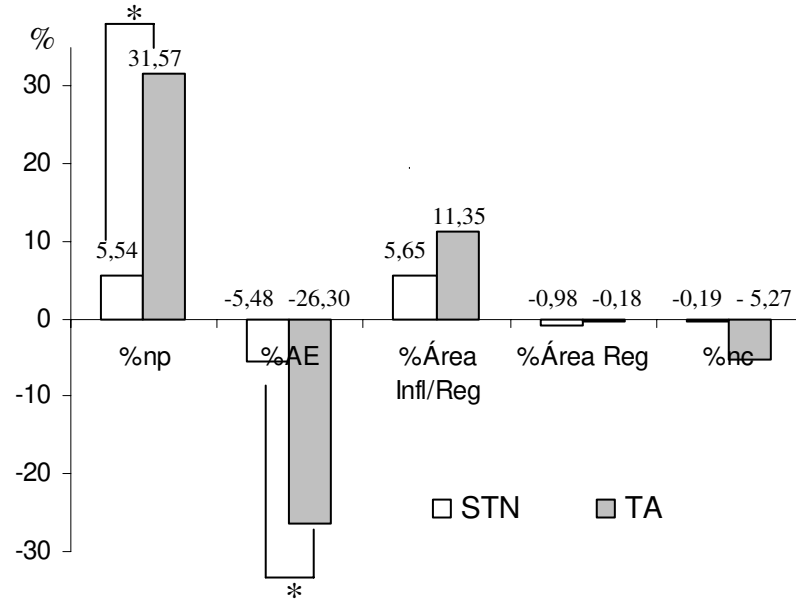
STN, músculo esternomastóideo; TA, músculo tibial anterior; %Área Infl/Reg, porcentagem da área total que se encontra em processo inicial de regeneração com presença de abundante infiltrado inflamatório; %Área Reg, porcentagem da área total em estágio avançado do processo de regeneração. %Área NCP, porcentagem da área total da secção transversal contendo fibras musculares com núcleo central e periférico. *p<0,05; Teste t de *student*.

4.3 Análise comparativa entre os músculos STN e TA do grupo *mdx* CRO

Comparando-se os músculos STN e TA do grupo *mdx* CRO observamos que, em ambos os músculos, o cromoglicato de sódio promoveu manutenção de fibras com núcleo periférico, diminuiu a porcentagem de fibras marcadas pelo AE e aumentou as áreas iniciais de regeneração

(Gráfico 1). A porcentagem de fibras com núcleo periférico e marcadas pelo AE foi significativamente diferente entre os músculos STN e TA.

Gráfico 1. Comparação entre os músculos distróficos esternomastóideo (STN) e tibial anterior (TA) frente ao tratamento com o cromoglicato de sódio.



STN, músculo esternomastóideo; **TA**, músculo tibial anterior, **%np**, porcentagem de fibras com núcleo periférico; **%AE**, porcentagem de fibras positivas ao azul de Evans; **%Área Infl/Reg**, porcentagem da área total de fibras musculares que se encontra em processo inicial de regeneração com presença de abundante infiltrado inflamatório; **%Área Reg**, porcentagem da área total de fibras musculares em estágio avançado do processo de regeneração; **%nc**, porcentagem de fibras com núcleo central. * $p < 0,05$; Teste t de *student*.

4.4 Níveis de creatino-quinase (CK) total no plasma sanguíneo

Os valores de CK total encontrados no plasma sanguíneo não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$; teste t de *student*) entre os grupos estudados. As médias dos valores de CK, expressos em U/L, para os animais os grupos *mdx* CTRL e *mdx* CRO foram 1503 ± 524 e 2209 ± 688 , respectivamente.

5. DISCUSSÃO

5.1 Análise da mionecrose

A utilização de parâmetros histológicos para o estudo das alterações musculares decorrentes da distrofia, tais como o número total de fibras musculares, a porcentagem de fibras com núcleo central e a análise da integridade do sarcolema, nos fornecem dados que, em conjunto, descrevem o processo de degeneração e regeneração ocorridos ao longo do tempo nos músculos esqueléticos (Gaschen e Burgunder, 2001).

No presente trabalho, verificamos que os resultados obtidos referentes a mionecrose para o grupo *mdx* CTRL estão de acordo com os da literatura (Pagel e Partridge, 1999; Henricks-Wehling *et al*, 2004). Comparando-se os músculos TA e STN, observamos uma diferença entre eles quanto a porcentagem de fibras com núcleo periférico (indicativo de fibras que não passaram pelo processo de mionecrose), de fibras positivas ao AE (que indica perda da integridade do sarcolema e mionecrose), de fibras em regeneração e de fibras regeneradas (núcleo central). Estes resultados estão de acordo com o consenso geral de que músculos distróficos respondem com intensidade diferente à falta de distrofina (Briguet *et al*, 2004; Grounds e Torrisi, 2004).

O cromoglicato de sódio é um antiinflamatório não-esteróide cujo mecanismo de ação é estabilizar a membrana plasmática de mastócitos (Berman, 1983; Ginsburg e Baldwin, 2004). Foi sugerido que esta droga inibiria mecanismos dependentes de cálcio envolvidos na liberação dos mediadores químicos dos mastócitos (Pesko, 1995).

Em estudo anterior, observou-se melhora funcional em camundongos *mdx* adultos, submetidos ao exercício físico, tratados com cromoglicato de sódio. Esta melhora funcional não foi acompanhada por um aumento da atividade dos mastócitos, sendo sugerido que o cromoglicato atuaria diretamente na fibra muscular (Granchelli *et al*, 1996).

No presente trabalho, houve diminuição estatisticamente significativa da mionecrose para ambos os músculos do grupo *mdx* CRO, evidenciado pela menor porcentagem de fibras marcadas

pelo AE. O AE é um marcador celular *in vivo* que possibilita detectar alterações de permeabilidade da fibra muscular precocemente, quando ainda não são detectadas com técnicas histológicas tradicionais como a hematoxilina-eosina (Straub *et al*, 1997). Também foi observada manutenção significativa de fibras com núcleo periférico no músculo TA e não significativa no STN do grupo *mdx* CRO. A diminuição da mionecrose e a manutenção de maior quantidade de fibras com núcleo periférico sugere efeito protetor do cromoglicato de sódio nos músculos distróficos.

Embora o presente trabalho não permita elucidar os mecanismos pelos quais o cromoglicato protegeu a fibra distrófica, foram levantadas algumas hipóteses. A primeira hipótese seria que o cromoglicato de sódio possa ter atuado diretamente no sarcolema, tal como sugerido anteriormente (Granchelli *et al*, 1996). Este seria um mecanismo baseado no mecanismo de ação do cromoglicato nos mastócitos (Ginsburg e Baldwin, 2004; Pesko, 1995; Berman, 1983). Assim, o cromoglicato estabilizaria o sarcolema, o que impediria a entrada exacerbada de íons cálcio durante os ciclos de contração e relaxamento muscular, diminuindo a mionecrose.

Uma outra possibilidade seria a de que o cromoglicato de sódio, ao atuar no sarcolema, modificaria os canais dependentes de cálcio. Estes canais situam-se no sarcolema e fazem conexão com o complexo distrofina-glicoproteínas (Vandebrouck *et al*, 2005). Em ausência da distrofina, estes canais permitem influxo exacerbado de íons cálcio para o interior da fibra muscular, levando a hipercontração da miofibrila, ativação de proteases endógenas dependentes do cálcio, instabilidade do sarcolema durante os ciclos de contração e relaxamento e necrose da fibra muscular (Straub *et al*, 1997).

Uma outra hipótese para explicar o mecanismo de ação do cromoglicato, levando a diminuição da mionecrose, se baseia em sua interação com moléculas sinalizadoras da fibra muscular, tais como as proteínas de choque térmico (*hsp*), família de proteínas que desempenham

inúmeras funções na fibra muscular normal e em patologias neuromusculares, destacando-se as proteínas *hsp70* e *hsp90* (Nishimura e Sharp, 2005).

A proteína *hsp70* é induzida em presença de agentes oxidantes, hipóxia, inflamação e hipertermia (Goto *et al*, 2003) e desempenha função protetora contra esses fatores que poderiam levar a morte celular (Shen *et al*, 2005).

A proteína *hsp90*, encontrada em todas as células eucarióticas, constitui cerca de 1 a 2% das proteínas citosólicas. É encontrada também em pequenas quantidades no núcleo e no citoesqueleto celular (Csermely *et al*, 1998; Pratt e Toft, 2003). Apresenta dois domínios, o N-terminal e o C-terminal. A *hsp90* funciona como uma molécula chaperona, promovendo o enovelamento e translocação de novas proteínas sintetizadas (Scheibel e Buchner, 1998). Níveis moderados de *hsp90* foram encontrados no sarcoplasma e núcleo de fibras musculares completamente desenvolvidas, podendo refletir sua participação na atividade normal das fibras musculares (Borman *et al*, 1996).

O cromoglicato de sódio é um inibidor específico das *hsp90*, ligando-se diretamente ao seu domínio N-terminal. Esta ligação inibe a função da *hsp90* de maneira similar ao antibiótico geldanamicina (GA) (Okada *et al*, 2003). Em células nervosas e tumorais, o bloqueio farmacológico da *hsp90* pela GA interrompe a ligação do complexo *hsp90-HSF1* (*HSF1- heat-shock factor1*), resultando na elevação dos níveis celulares de *HSF1*, que por sua vez promove o aumento da expressão de *hsp70*. Verificou-se que isso teria um efeito protetor contra fatores neurotóxicos que promovem degeneração em células nervosas (Shen *et al*, 2005). Nas células tumorais, a inibição da *hsp90* pela GA aumentou a expressão da *hsp70*, sendo que o transporte celular de cálcio poderia estar envolvido nesse processo (Elia *et al*, 1996; Chang *et al*, 2006).

A diminuição da mionecrose observada nos músculos distróficos, após o tratamento com cromoglicato, poderia se dar por mecanismos celulares semelhantes ao ocorrido no sistema

nervoso central e células tumorais, já que todas as células eucarióticas, dentre elas as dos músculos distróficos, apresentam normalmente a *hsp90* e *hsp70*. Em várias condições de estresse celular, tal como ocorre na distrofia muscular de Duchenne e no camundongo *mdx*, a expressão da *hsp70* está aumentada (Nishimura e Sharp, 2005). Fibras distróficas em hipercontração apresentam aumento da expressão de proteínas da família da *hsp70*, sugerindo um efeito protetor contra a necrose da fibra muscular distrófica (Bormann, 1995).

A inibição da *hsp90* também acarreta uma diminuição de citocinas inflamatórias presentes nos macrófagos, tal como o fator de necrose tumoral α (TNF α) (Wax *et al*, 2003). Foi mostrado que o bloqueio *in vivo* do TNF α em camundongos *mdx* diminui a mionecrose (Grounds e Torrisi, 2004). Assim, através da inibição da *hsp90* pelo cromoglicato de sódio, poderia ocorrer diminuição do TNF α , diminuindo conseqüentemente a mionecrose.

5.2 Análise da regeneração

No presente trabalho, dividimos a área total do músculo distrófico em 3 regiões: a área de inflamação-regeneração, que representa o estágio inicial do processo regenerativo, com abundante infiltrado inflamatório, bem como mioblastos e miotubos. A área de regeneração, que representa um estágio mais avançado de regeneração, visto que contem mioblastos e pobre infiltrado inflamatório. Finalmente, a área regenerada, contendo fibras regeneradas com diâmetro próximo ao das fibras que não sofreram regeneração. Verificamos que o tratamento com cromoglicato aumentou de forma significativa a porcentagem da área de inflamação-regeneração. Provavelmente, o cromoglicato de sódio interferiu no processo inicial de regeneração muscular através da inibição da *hsp90*, visto que uma de suas funções é influenciar, direta e indiretamente, a transformação das células satélites em miotubos, através da interação com os fatores MyoD e

miogenina, promovendo a síntese e enrolamento de novas proteínas citoplasmáticas (Bornman *et al*, 1996; White *et al*, 2000; Srikakulam e Winkelmann, 2004; Yun e Matts, 2005). Não obstante, observamos fibras musculares totalmente regeneradas, sugerindo que a inibição da *hsp90* foi insuficiente para impedir totalmente a regeneração muscular (Csermely *et al*, 1998).

5.3 Análise dos níveis de creatino-quinase (CK)

A enzima CK cataliza a fosforilação reversível da creatina pela adenosina trifosfato (ATP), com a formação de creatino-fosfato. Esta enzima está associada com a formação de ATP nos sistemas contráteis ou de transporte, principalmente nas células musculares. Quando os níveis séricos desta enzima estão aumentados sugere-se que ocorreu lesão muscular, visto que uma das principais localizações da CK é o músculo estriado esquelético (Maglara *et al*, 2003). Na DMD, a atividade da CK está 50 a 100 vezes acima dos limites superiores dos valores de referência (Engel *et al*, 1994). Em camundongos *mdx*, os níveis de CK também se mostram elevados durante toda a vida do animal (Yoshida *et al*, 2006). Em estudo prévio, foi demonstrado que o tratamento com o cromoglicato de sódio melhorou o rendimento funcional do músculo esquelético, porém não houve melhora dos níveis de CK (Granchelli *et al*, 1996).

Não houve diferença significativa entre os níveis de CK dos grupos *mdx* CRTL e *mdx* CRO. Este resultado provavelmente pode ser explicado pelo fato do cromoglicato não ter impedido totalmente o início dos ciclos de necrose e regeneração. Verificamos que os músculos TA e STN responderam com intensidades diferentes ao cromoglicato de sódio, sugerindo que possam existir diferenças na ação da droga dependendo do músculo analisado e da intensidade com que este músculo é afetado pela falta de distrofina. Visto que os valores obtidos da CK são valores séricos totais, ou seja, expressam a necrose do músculo cardíaco e de todos os músculos

esqueléticos, seria interessante verificarmos se outros músculos, como por exemplo, o diafragma e o músculo cardíaco, também seriam protegidos pelo cromoglicato de sódio.

6. CONCLUSÃO

O tratamento precoce de camundongos *mdx* com o cromoglicato de sódio diminuiu significativamente a mionecrose nos músculos tibial anterior e esternomastóide e atuou na regeneração muscular, retardando as fases iniciais do processo regenerativo. Sugere-se que o cromoglicato de sódio possa ter atuado diretamente na membrana da fibra muscular, estabilizando-a. Adicionalmente, o cromoglicato de sódio pode ter atuado em moléculas sinalizadoras intracelulares, tais como as proteínas de choque térmico, influenciando os mecanismos de degeneração e regeneração. Em conjunto, estes resultados sugerem que o cromoglicato de sódio possa ser potencialmente útil para o tratamento farmacológico da distrofia muscular, bem como para desvendar os mecanismos envolvidos nas distrofinopatias e demais doenças neuromusculares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMTHOR, H.; EGELHOF, T.; MCKINNELL, I.; LADD, M.E.; JANSSEN, I.; WEBER, J.; SINN, H.; SCHRENK, H.-H.; FORSTING, M.; VOIT, T.; STRAUB V. Albumin targeting of damaged muscle fibres in the mdx mouse can be monitored by MRI. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, p. 791-796, 2004.

BARTON, R.E.; MORRIS, L.; KAWANA, M.; BISH, L.T.; TOURSEL, T. Systemic administration of L-arginine benefits *mdx* skeletal muscle function. **Muscle & Nerve**, v. 32, p. 751-760, 2005.

BERMAN, B.A. Cromolyn: past, present and future. **Pediatric Clinics North America**, v. 30, n. 5, p. 915-930, 1983.

BIGGAR, W.D.; KLAMUT, H.J.; DEMACIO, P.C.; STEVENS, D.J. RAY, P.N. Duchenne muscular dystrophy: current knowledge, treatment, and future prospects. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 401, p. 88-106, 2002.

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

BOGDANOVICH, S.; PERKINS, K.J.; KRAG, T.O.B.; KHURANA, T.S. Therapeutics for Duchenne muscular dystrophy: current approaches and future directions. **Journal Molecular Medicine**, v. 82, n. 2, p. 102-115, 2004.

BORNMAN, L.; POLLA, B.S.; LOTZ, B.P.; GERICKE, G.S. Expression of heat-shock/stress proteins in Duchenne muscular dystrophy. **Muscle & Nerve**, v. 18, p. 23-31, 1995.

BORNMAN, L.; POLLA, B.S.; LOTZ, B.P.; GERICKE, G.S. Heat-shock protein 90 and ubiquitin: developmental regulation during myogenesis. **Muscle & Nerve**, v. 19, p. 574-580, 1996.

BREDT, D.S. Endogenous nitric oxide synthesis: biological functions and pathophysiology. **Free Radical Research**, v. 31, p. 577-596, 1999.

BRENMAN, J.E.; CHAO, D.S.; GEE, S.H.; MCGEE, A.W.; CRAVEN, S.E.; SANTILLANO, D.R.; WU, Z.; HUANG, F.; XIA, H.; PETERS, M.F.; FROEHNER, S.C.; BREDT D.S. Interaction of nitric oxide synthase with the postsynaptic density protein PSD-95 and α 1-syntrophin mediated by PDZ domains. **Cell**, v. 84, p. 757-767, 1996.

BRIGUET, A.; COURDIER-FRUH, I.; FOSTER, M.; MEIER, T.; MAGYAR, J.P. Histological parameters for the quantitative assessment of muscular dystrophy in the *mdx*-mouse. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, p. 675-682, 2004.

BROWN, R.H.; DPHIL JR, M.D. Dystrophin-associated proteins and the muscular dystrophies. **Annual Review Medicine**, v. 48, p. 457-466, 1997.

BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; CICALA, C.; SESSA, W.C.; CIRINO, G. Geldanamycin, an inhibitor of heat shock protein 90 (Hsp90) mediated signal transduction has anti-inflammatory effects and interacts with glucocorticoid receptor *in vivo*. **British Journal of Pharmacology**, v. 131, p. 13-16, 2000.

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

CHANG, W.J.; IANNACCONE, S.T.; LAU, K.S.; MASTERS, B.S.; MCCABEM T.J.; MCMILAN, K.; PADRE, R.C.; SPENCER, M.J.; TIDBALL, J.G.; STULL, J.T. Neuronal nitric oxide synthase and dystrophin-deficient muscular dystrophy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 17, p. 9142-9147, 1996.

CHANG, Y-S; LEE, L-C; SUN, F-C; CHAO, C-C; FU, H-W; LAI, Y-K. Involvement of calcium in the differential induction of heat shock protein 70 by heat shock protein 90 inhibitors, geldanamycin and radicicol, in human non-small cell lung cancer H460 cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 97, p. 156-165, 2006.

CHARGÉ, S.B.P.; RUDNICKI, M.A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. **Physiological Review**, v. 84, p. 209-238, 2004.

CHAUBOURT, E.; VOISIN, V.; FOSSIER, P.; BAUX, G.; ISRAËL, M.; De La PORTE, S. Muscular nitric oxide synthase (muNOS) and utrophin. **Journal of Physiology (Paris)**, v. 96, p. 43-52, 2002.

COHN, R.D.E; CAMPBELL, K.P. Molecular basis of muscular dystrophies. **Muscle & Nerve**, v. 23, p. 1456-1471, 2000.

CSERMELY, P.; SCHNAIDER, T.; SÓTI, C.; PROHÁSZKA, Z.; NARDAI, G. The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 79, n. 2, p. 129-168, 1998.

CULLEN, M.J.; JARROS, E. Ultrastructure of the muscle in the X-chromosome linked dystrophic (*mdx* mouse). Comparison with Duchenne muscular dystrophy. **Acta Neuropathologica**, v. 77, p. 69-81, 1988.

DING, X.; RATH, P.; ANGELO, R.; STRINGFELLOW, T.; FLANDERS, E.; DINH, S.; GOMEZ-ORELLANA, I.; ROBINSON, J.R. Oral absorption enhancement of cromolyn sodium through noncovalent complexation. **Pharmacological Research**, v. 21, n. 12, p. 2196-2206, 2004.

DISATNIK, M.H.; DHAWAN, J.; YU, Y.; BEAL, M.F.; WHIRL, M.M.; FRANCO, A.A.; RANDO, T.A. Evidence of oxidative stress in mdx mouse muscle: studies of the pre-necrotic state. **Journal of the Neurological Science**, v. 161, p. 77-84, 1998.

DUDLEY, R.W.R.; DANIALOU, G.; GOVINDARAJU, K.; LANDS, L.; EIDELMAN, D.E.; PETROF, B.J. Sarcolemmal damage in dystrophin deficiency is modulated by synergistic interactions between mechanical and oxidative/nitrosative stresses. **American Journal of Pathology**, v. 168, n. 4, p. 1276-1287, 2006.

EARNSHAW, J.C.; KYPRIANOU, P.; KRISHEN, K.; DHOOT, K. Differentiation of original and regenerated skeletal muscle fibers in mdx dystrophic muscles. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 118, p. 19-27, 2002.

ELIA, G.; DE MARCO, A.; ROSSI, A.; SANTORO, M.G. Inhibition of HSP70 expression by calcium ionophore A23187 in human cells. An effect independent of the acquisition of DNA-binding activity by the heat shock transcription factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 27, p. 16111-16118, 1996.

ENGEL, A.G.; YAMAMOTO, M.; FISCHBECK, K.H. Dystrophinopathies. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. **Myology**. New York: McGraw-Hill, Inc., 1994. 1937p. p. 1133-1187. ISBN 0070195595.

FAIN, O.; STIRNEMANN, J.; ECLACHE, V.; BARETE, S.; CASASSUS, P.; HERMINE, O.; LORHOLARY, O. Systemic mastocytosis. **Presse Medicale**, v. 34, n. 9, p. 681-687, 2005.

GASCHEN, F.; BURGUNDER, J.M. Changes of skeletal muscle in young dystrophin-deficient cats: a morphological and morphometric study. **Acta Neuropathologica**, v. 101, p. 591-600, 2001.

GINSBURG, M.L.; BALDWIN, A.L. Disodium cromoglycate stabilizes mast cell degranulation while reducing the number of hemoglobin-induced microvascular leaks in rat mesentery. **American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 286, p. H1750-H1756, 2004.

GOTO, K.; OKUYAMA, R.; SUGIYAMA, H.; HONDA, M.; KOBAYASHI, T.; UEHARA, K.; AKEMA, T.; SUGIURA, T.; YAMADA, S.; OHIRA, Y.; YOSHIOKA, T. Effects of heat stress and mechanical stretch on protein expression in cultured skeletal muscle cells. **Pflugers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 447, n.2, p. 247-253, 2003.

GRANCHELLI, J.A.; AVOSSO, D.L.; HUDECKI, M.S.; POLLINA, C. cromolyn increases strength in exercised mdx mice. **Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology**, v. 91, p. 287-296, 1996.

GROUND, M.D.; SOROKIN, L.; WHITE, J. Strength at the extracellular matrix-muscle interface. **Scandinavian Journal of Medicine and Science in Sports**, v. 15, p. 381-391, 2005a.

GROUND, M.D.; DAVIES, M.; TORRISI, J.; SHAVLAKADZE, T.; WHITE, J.; HODGETTS, S. Silencing TNF α activity by using Remicade or Enbrel blocks inflammation in whole muscle grafts: an in vivo bioassay to assess the efficacy of anti-cytokine drugs in mice. **Cell and Tissue Research**, v. 320, n.3, p. 509-515, 2005b.

GROUND, M.D.; TORRISI, J. Anti-TNF α (Remicade®) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. **FASEB Journal**, v. 18, p. 676-682, 2004.

HAMER, P.W.; McGEACHIE, J.M.; DAVIES, M.J.; GROUND, M.D. Evans blue dye as an in vivo marker of myofibre damage: optimizing parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. **Journal of Anatomy**, v. 200, p. 69-79, 2002.

HENRICKS-WEHLING, M.; LEE, J.J.; TIDBALL, J.G.; Prednisolone decreases cellular adhesion molecules required for inflammatory cell infiltration in dystrophin-deficient skeletal muscle. **Neuromuscular Disorders**, v. 14, p. 483-490, 2004.

HU, Y-J.; LIU, Y.; PI, Z-B.; QU, S-S. Interaction of cromolyn sodium with human serum albumin: a fluorescence quenching study. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 6609-6614, 2005.

JÄRVINEN, T.A.H.J.; JÄRVINEN, T.L.N.; KAARIAINEN, M.; KALIMO, A.; JÄRVINEN, M. Muscle injuries - biology and treatment. **American Journal of Sports Medicine**. v. 33, n. 5, p. 745-764, 2005.

JIN, Y.; MURAKAMI, N.; SAITO, Y.; GOTO, Y.; KOISHI, K.; NONAKA, I. Expression of MyoD and myogenin in dystrophic mice, *mdx* and *dy*, during regeneration. **Acta Neuropathologica**, v. 99, p. 619-627, 2000.

KHURANA, T.S.; PRENDERGAST, R.A.; ALAMADDINE, H.S.; TOME, F.M.; FARDEAU, M.; ARAHATA, K.; SUGITA, H.; KUNKEL, L.M. Absence of extraocular muscle pathology in Duchenne's muscular dystrophy: role for calcium homeostasis in extraocular muscle sparing. **Journal of Experimental Medicine**. v. 182, p. 467-475, 1995.

KHURANA, T.S.; DAVIES, K.E. Pharmacological strategies for muscular dystrophy. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 379-389, 2003.

LEFAUCHEUR, J.P.; GJATA, B.; SEBILLE, A. Factors inducing mast cell accumulation in skeletal muscle. **Neuropathology and Applied Neurobiology**, v. 22, p. 248-255, 1996.

MAGLARA, A.A.; VASILAKI, A.; JACKSON, M.J.; McARDLE, A. Damage to developing mouse skeletal muscle myotubes in culture: protective effect of heat shock proteins. **The Journal of Physiology**, v. 548, n. 3, p. 837-846, 2003.

MARQUES, M.J.; LUZ, M.A.M.; SANTO NETO, H. Impaired regeneration of dystrophin-deficient muscle fibers is caused by exhaustion of myogenic cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, p. 691-695, 2002.

MATSUDA, R.; NISHIKAWA, A.; TANAKA, H. Visualization of dystrophic muscle fibers in *mdx* mouse by vital staining with Evans blue: evidence of apoptosis in dystrophin-deficient muscle. **Journal of Biochemistry**, v. 118, n. 5, p. 959-964, 1995.

MELTZER, E.O. Allergic rhinitis: Managing the pediatric spectrum. **Allergy and Asthma Proceedings**. v.27, n. 1, p. 2-8, 2006.

MINATEL, E.; NETO, H.S.; MARQUES, M.J. Acetylcholine receptor distribution and synapse elimination at the developing neuromuscular junction of mdx mice. **Muscle & Nerve**, v. 28, n. 5, p. 561-569, 2003.

MULLER, J.; VAYSSIERE, N.; ROYUELA, M.; LEGER, M.E.; MULLER, A.; BACOU, F.; PONS, F.; HUGON, G.; MORNET, D. Comparative evolution of muscular dystrophy in diaphragm, gastrocnemius and masseter muscles from old male mdx mice. **Journal of Muscle Research and Cell. Motility**, v. 22, p. 133-139, 2001.

MUNTONI, F.; FISHER, I.; MORGAN, J.E.; ABRAHAM, D. Steroids in Duchenne muscular dystrophy: from clinical trials to genomic research. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, p. S162-S165, 2002.

NAKANE, M.; SCHMIDT, M.M.; POLLOCK, J.S.; FORSTERMANN, U.; MURAD, F. Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. **FEBS Letters**, v. 316, p. 175-180, 1993.

NISHIMURA, R.N.; SHARP, F.R. Heat shock proteins and neuromuscular disease. **Muscle & Nerve**, v. 32, p. 693-709, 2005.

OKADA, M.; ITOH, H.; HATAKEYAMA, T.; TOKUMITSU, H.; KOBAYASHI, R. Hsp90 is a direct target of the anti-allergic drugs disodium cromoglycate and amlexanox. **Biochemical Journal**, v. 374, p. 433-441, 2003.

PAGEL, C.N.; PARTRIDGE, T.A. Covert persistence of *mdx* mouse myopathy is revealed by acute and chronic effects of irradiation. **Journal of Neurological Science**, v. 164, p. 103-116, 1999.

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

PESKO, L.J. Cromolyn sodium topical (Compounding). **Americam Druggist**, v. 211, n. 6, p. 46-48, 1995.

PETROF, B.J. The molecular basis of activity-induced muscle injury in Duchenne muscular dystrophy. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 179, n. 1-2, p. 111-123, 1998.

PETROF, B.J. Molecular pathophysiology of myofiber injury in deficiencies of the dystrophin-glycoprotein complex. **American Journal Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 81 (Suppl), p. S162–S174, 2002.

PORTER J.D.; MERRIAM, A. P.; KHANNA, S.; ANDRADE, F.H.; RICHMONDS, C.R.; LEAHY, P.; CHENG, G.; KARATHANASIS, P.; ZHOU, X.; KUSNER, L.L.; ADAMS, M.E.; WILLEM, M.; MAYER, U.; KAMINSKI, H.J. Constitutive properties, not molecular adaptations, mediate extraocular muscle sparing in dystrophic *mdx* mice. **The FASEB Journal**, v. 17, n. 3, doi:10.1096/fj.02-0810fje, 2003.

PORTER, J.D.; KHANNA, S.; KAMINSKI H.J.; RAO, J.S.; MERRIAN, A.P.; RICHMONDS, C.R.; LEAHY, P.; LI, J.; GUO, W.; ANDRADE, F.H. A chronic inflammatory response dominates the skeletal muscle molecular signature in dystrophin-deficient *mdx* mice. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 3, p. 263-272, 2002.

POUVREAU, S.; JACQUEMOND, V. Nitric oxide synthase inhibition affects sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release in skeletal muscle fibres from mouse. **Journal of Physiology**, v. 567, n. 3, p. 815-828, 2005.

PRATT, W.B., TOFT, D.O. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. **Experimental Biology and Medicine**. v. 228, n. 2, p. 111-133, 2003.

REIMANN, J.; IRINTCHEV, A.; WERNIG, A. Regenerative capacity and the number of satellite cells in soleus muscles of normal and *mdx* mice. **Neuromuscular Disorders**. v. 10, n. 4-5, p. 276-282, 2000.

RANDO, T.A. Role of nitric oxide in the pathogenesis of muscular dystrophies: a “two hit” hypothesis of the cause of muscle necrosis. **Microscopy Research and Thechnique**, v. 55, p. 223-235, 2001.

SALIMENA, M.C.; LAGROTA-CANDIDO, J.; QUÍRICO-SANTOS, T. Gender dimorphism influences extracellular matrix expression and regeneration of muscular tissue in *mdx* dystrophic maice. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 122, p. 435-444, 2004.

SASAKA, T.; IMAMURA, M.; ARAISHI, K.; NOGUCHI, S.; MIZUNO, Y.; TAKAGOSHI, N.; HAMA, H.; WAKABAYASHI-TAKAI, E.; YOSHIMOTO-MATSUDA, Y.; NONAKA, I.; KANEKO, K.; YOSHIDA, M.; OZAWA, E. Pathological analysis of muscle hypertrophy and degeneration in muscular dystrophy in γ -sarcoglycan-deficient mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 13, p. 193-206, 2003.

SCHEIBEL, T.; BUCHNER, J. The hsp90 complex-a super-cheperone machine as a novel drug target. **Biochemical Pharmacology**, 56, n. 6, p. 675-682, 1998.

SHEN, H-Y.; HE, J-C.; WANG, Y.; HUANG, Q-Y.; CHEN, J-F. Geldanamycin induces heat shock protein 70 and protects against MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 48, p. 39962-39969, 2005.

SILVAGNO, F.; XIA, H.; BREDET, D.S. Neuronal nitric-oxide synthase- μ , an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n.19, p. 11204-11208, 1996.

SONG, Y.; ZWEIER, J.Z.; XIA, Y. Heat-shock protein 90 augments neuronal oxide nitric synthase activity by enhancing Ca^{2+} /calmodulin binding. **Biochemical Journal**, v. 355, p. 357-360, 2001.

SPENCER, M.J.; MELLGREN, R.L. Overexpression of a calpastatin transgene in mdx muscle reduces dystrophic pathology. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 21, p. 2645-2655, 2002.

SRIRAKULAM, R.; WINKELMANN, D.A. Chaperone-mediated folding and assembly of myosin in striated muscle. **Journal of Cell Science**, v. 117, p. 641-652, 2004.

STRAUB, V.; RAFAEL, J.A.; CHAMBERLAIN, J.S.; CAMPBELL, K.B.; Animal models for muscular dystrophy show different patterns of sarcolemma disruption. **Journal of Cell Biology**, v. 139, n. 2, p. 375-385, 1997.

SWASH, M.; SCHWARTS, M.S. **Neuromuscular Diseases**: a practical approach to diagnosis and management. New York: Springer-Verlag, 1988. v.2. 456p. p. 273-296. ISBN 0354019505X.

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.; ALBRECHT, D.E.; LOKENSGARD, B.E.; SPENCER, M.J. Apoptosis precedes necrosis of dystrophin-deficient muscle. **Journal of Cell Science**, v. 108, p. 2197-2204, 1995.

TORRES, L.F; DUCHEN, L.W. The mutant mdx: inherited myopathy in the mouse. Morphological studies of nerves, muscles and end-plates. **Brain**, v. 110, p. 269-299, 1987.

VANDEBROUCK, A; DUCRET, T.; BASSET, O.; SEBILLE, S.; RAYMOND, G.; RUEGG, U.; GAILLY, P.; COGNARD, C.; CONSTANTIN, B. Regulation of store-operated calcium entries and mitochondrial uptake by minidystrophin expression in cultured myotubes. **The FASEB Journal**, doi:10.1096/fj.04-3633fje, 2005.

VATER, R.; HARRIS, J.B.; ANDERSON, L.V.B.; ROBERDS, S.L.; CAMPBELL, K.P.; CULLEN, M. The expression of dystrophin-associated glycoproteins during skeletal muscle degeneration and regeneration. An immunofluorescence study. **Journal of Neuropathology and Experimental Neurology**, v. 54, n. 4, p. 557-569, 1995.

VOISIN, V.; SÉBRIÉ, C.; MATECKI, S.; YU, H.; GILLET, B.; RAMONATXO, M.; ISRAËL, M.; DE LA PORTE, S. L-arginine improves dystrophic phenotype in mdx mice. **Neuromuscular Disorders**, v. 20, p. 123-130, 2005.

WANG, M-X.; MURREL, D.F.; SZABO, C.; WARREN, R.F.; SARRIS, M.; MURREL, G.A.C. Nitric oxide in skeletal muscle: inhibition of nitric oxide synthase walking speed in rats. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v. 5, n. 3, p. 219-232, 2001.

WAX, S.; PIECYK, M.; MARITIM, B.; ANDERSON, P. Geldanamycin inhibits the production of inflammatory cytokines in activated macrophages by reducing the stability and translation of cytokine transcripts. **Arthritis and Rheumatism**, v. 48, n. 2, p. 541-550, 2003.

WEHLING, M.; STULL, J.T.; MCCABE, T.J.; TIDBALL, J.G. Sparing of mdx extraocular muscles from dystrophic pathology is not attributable to normalized concentration or distribution of neuronal nitric oxide synthase. **Neuromuscular Disorders**, v. 8, p. 22-29, 1998.

WHITE, J.D.; SCAFFIDI, A.; DAVIES, M.; McGEACHIE, J.; RUDNICKI, M.A.; GROUNDS, M.D. Myotube formation is delayed but not prevented in MyoD-deficient skeletal muscle: studies in regenerating whole muscle grafts of adult mice. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, v. 48, n. 11, p. 1531-1543, 2000.

YABLONKA-REUVENI, Z.; ANDERSON, J.E. Satellite cells from dystrophic (mdx) mice display accelerated differentiation in primary cultures and in isolated myofibers. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 1, p. 203-212, 2006.

YOSHIDA, M., YONETANI, A., SHIRASAKI, T., WADA, K. Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. **American Journal of Physiology- Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 290, n. 2, p. R449-R455, 2006.

YUN, B-G.; MATTS, R.L. Differential effects of Hsp90 inhibition on protein kinases regulating signal transduction pathways required for myoblast differentiation. **Experimental Cell Research**, v. 307, n. 1, p. 212-223, 2005.

8. TRABALHO A SER SUBMETIDO À PUBLICAÇÃO

Cromolyn therapy decreases dystrophic skeletal muscle necrosis.

By Maria Julia Marques, Elaine Minatel, Rafael Ventura Machado, Humberto Santo Neto.

Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo 13083-970, Brazil.

Acknowledgments: This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, grants 95/6110-2, 01/00570-4 and 04/15526-9). H.S.N. and M.J.M. are recipients of fellowships from Conselho Nacional de Pesquisas (301286/03-5; 302880/04-6). R.V.M was recipient of a fellowship from Capes.

All correspondence should be addressed to:

Dr. Maria Julia Marques

Departamento de Anatomia, Instituto de Biologia,
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).
Campinas, SP - 13083-970, Brazil.

Email: marques@unicamp.br

Phone: 55-19-3788-6395

Running title: cromolyn therapy for dystrophy.

Abstract

In the present study, we verified whether disodium cromoglycate (cromolyn), an anti-allergic drug, could protect dystrophic *mdx* muscle fibers from degeneration. Treated *mdx* mice (n=8; 14 days of age) received daily intraperitoneal injections of cromolyn at a dose of 50mg/kg body weight in saline, during 16 days. Cromolyn treatment started before the cycles of muscle degeneration-regeneration had started. Control non-treated mice (n=8 *mdx*) were injected with an equivalent amount of saline. For visualization of muscle fiber damage, treated (n=5) and non-treated *mdx* (n=5) mice were injected with Evans blue dye (EBD), a marker of sarcolemmal lesion. Cryostat cross-sections of the sternomastoid (STN) and tibialis anterior (TA) muscles were stained with HE. The whole cross-sectional area of the muscles was divided into a peripheral + central nuclei muscle fiber area, an area of inflammatory cell infiltration/regeneration and an area of regeneration. The number of regenerated muscle fibers (central nucleated fibers), fibers with peripheral cell nuclei and degenerated fibers (positive to EBD) was counted in the peripheral + central cell nuclei muscle fiber area. The areas of inflammatory cell infiltration/regeneration and of regeneration were expressed as a percentage of the total transverse graft area. Cromolyn lead to a significant decrease in myonecrosis and in the percentage of central nucleated fibers ($p<0.05$; Student's t test). The number of fibers with peripheral nuclei increased in about 30% in the TA muscle. The area of inflammation-regeneration increased ($p<0.05$; Student's t test) in the cromolyn treated group. These results show that cromolyn treatment before the cycles of muscle fiber degeneration-regeneration started protects dystrophic muscle fiber from myonecrosis and promotes the earlier stages of muscle fiber regeneration.

Introduction

The *mdx* mouse is a genetic homologue of human Duchenne muscular dystrophy (DMD) (Bulfield et al., 1984; Tanabe et al., 1986). In *mdx* and DMD, a lack in the subsarcolemmal protein dystrophin initiates muscle pathology (Bulfield et al., 1984). In *mdx*, the first signs of muscle damage are seen around 21 days after birth followed by cycles of muscle fiber degeneration-regeneration (Earnshaw et al., 2002). There is no successful treatment for DMD and research has focused on cell and gene therapies to replace the defective dystrophin gene (Skuk et al., 2003; Wells et al., 2002).

A line of evidence suggests that inflammatory cells can contribute to myonecrosis *in vivo* and excessive inflammatory response can directly damage myofibers. It was demonstrated that inhibition of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor alpha, produced by mast cells and other inflammatory cells, protects the dystrophic muscle from necrosis (Grounds and Torrissi, 2004).

Disodium cromoglycate (cromolyn) is an anti-allergic drug that acts by stabilizing the mast cell membrane (Pearce and Al-Laith, 1989). *In vitro* studies had shown that cromolyn is also an antagonist of the heat-shock protein 90 (hsp90; Okada et al., 2003), a protein that is up-regulated during myogenesis (Bornman et al., 1996). Functional studies had shown that cromolyn increases muscle strength in exercised *mdx* mice, being suggested that cromolyn interacted with muscle fibers directly, at the level of the sarcolemma itself or biochemically (Granchelli et al., 1996).

In the present, we hypothesized that cromolyn could stabilize the sarcolemma, similarly to its action in the mast cell membrane. We verified whether the earlier treatment with cromolyn, before the beginning of the degenerative cycles, would protect the dystrophic muscle fiber of *mdx*

mice from degeneration. By using Evans blue dye as a marker of sarcolemmal disruption, we observed that myonecrosis was significantly inhibited by cromolyn.

Material and Methods

Animals

All experiments were carried out in male and female *mdx* mice obtained from a breeding colony maintained by our institutional animal care facility. The mice were housed according to institutional guidelines and had access to food and water *ad libitum*. Pregnant females were isolated and checked daily. The date of birth was designated postnatal day 0 (P0). Cromolyn treatment started on P14, before the cycles of muscle degeneration-regeneration had started (Porter et al., 2003; Lefaucheur *et al*, 1996). Mice were weaned as usual at 4 weeks of age. The animal experiments described here were done in accordance with the guidelines of the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA) and the guidelines set forth by our Institution.

Drug administration

Cromolyn-treated mice (n=8 *mdx*) received disodium cromoglycate (cromolyn; Galena[®], Brazil) daily, injected intraperitoneally at a dose of 50mg/Kg body weight in saline (final volume of 0.01mL for a 25g mouse), during 16 days. Each mouse was weighed daily so that drug dosage could be accurately calibrated. Control mice (n=8 *mdx*) were injected with an equivalent amount of saline.

Evans Blue dye analysis

For visualization of muscle fiber damage, treated (n=5) and non-treated *mdx* (n=5) mice were injected with Evans blue dye (EBD; Sigma, St. Louis, MO, USA), a marker of sarcolemmal

lesion (Hamer et al., 2002). EBD was dissolved in PBS (0.15 M NaCl, 10mM phosphate buffer, pH 7.4) and injected into the peritoneal cavity. The animals received an intraperitoneal injection of 1% EBD in PBS at a dose of 100 μ L per 10 g body weight. The mice were visually inspected for dye uptake. Within 50-60 min after intraperitoneal injection of EBD, discoloration of all mice was observed and successful injection of the dye was indicated by the blue coloration of ears and paws.

Twenty-four hours later, the mice were killed with an overdose of chloral hydrate and the sternomastoid (STN) and tibialis anterior (TA) muscles were dissected out and snap frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and stored at -70⁰C. These muscles were chosen because they represent axial (STN) and apendicular (TA) muscles, which are differently affected in DMD, with limb muscles being more severely impaired than axial muscles (Engel et al., 1994).

Cryostat cross sections (7 μ m thick) were incubated in ice-cold acetone at -20 ⁰C for 10 min, washed 3 x 10 min with PBS and mounted in DABCO (mounting media for fluorescence, Sigma). By fluorescence microscopy analysis, EBD staining showed a bright red emission. Fiber counts of EBD-positive muscle fibers were done in all sections with a hand counter and photographed under a Nikon fluorescence microscope connected to a Hamamatsu video camera. The number of EBD-positive muscle fibers was expressed as a percentage of the total number of muscles fibers counted in each section. Comparisons between groups and values were made using the Student *t*-test.

Morphometric and quantitative analysis

Cryostat cross-sections of the STN and TA were stained with hematoxylin-eosin (HE). The whole cross-sectional area of the muscles was divided into 3 areas: the area of inflammatory cell infiltration/regeneration, the area of regeneration area and the area with fibers showing central or peripheral nuclei. The inflammatory cell infiltration/regeneration area (Fig. 6A) consisted of an extensive inflammatory cell infiltrate and new muscle cells, mainly myoblasts (Fig. 6B). The regeneration area (Fig. 7A) consisted mainly of myotubes, with small diameter and poor inflammatory cell infiltration. Myotubes appeared in transverse sections as plump basophilic cells with at least one centrally located nucleus (see Fig. 7B). The peripheral + central nuclei fibers area (Figs. 6A and 7A) was represented by the remainder of the transverse section of the muscle, occupied by fully regenerated muscle fibers and fibers with peripheral nuclei, indicative of fibers that had not experienced muscle degeneration.

Slides were placed in a Nikon Eclipse E 400 microscope connected to a personal computer and attached to a video camera (Nikon Express Series). Non-overlapping images of the entire cross-section were taken and tiled together by using ImagePro-Express[®] (Media Cybernetics). The total area of each cross-section and the areas of inflammation-regeneration and regeneration within each section were measured by using ImagePro-Express[®]. These areas were expressed as a percentage of the total transverse graft area. In addition, the number of central nucleated fibers and the number of fibers with peripheral nuclei were counted within each peripheral + central cell nuclei muscle fiber area using a hand counter and were expressed as a percentage of the total number of fibers counted within this area. Comparisons between groups and values were made using Student's *t*-test.

CK analysis

Treated (n=3) and non-treated (n=3) *mdx* mice were anesthetized with a mixture (1:1) of ketamine hydrochloride (0.2 g/Kg, Francotar, Virbac) and xilazine hydrochloride (0.04 mg/kg Virbaxil 2%, Virbac) and blood samples (1.5ml) were taken from the retrobulbar plexus of the eye. Creatine-kinase (CK) activity was assayed using a CK Cinético Crystal assay kit (Bioclin, Brazil) employing a Thermo Electron Corporation Genesys 20 spectrophotometer.

Results

No significant differences in weight gain were observed between cromolyn-treated and non-treated (saline injected) *mdx* mice during the study period. The mean body weight was $7.1\text{g} \pm 0.9$ for cromolyn treated and $8.0\text{g} \pm 0.9$ for the control non-treated *mdx* mice ($p > 0.05$; Students t Test). This result shows that cromolyn treatment did not interfere with growth rate of the young *mdx* mice.

There was a significant decrease in Evans blue dye staining in STN and TA muscles of the cromolyn-treated *mdx* (Table 1). The reduction of myonecrosis was markedly seen in the TA muscle, where a 26% decrease in the percentage of degenerated fibers was seen. The EBD stained myofibers generally correspond to necrotic foci visualized by HE staining (Fig. 5A, B).

The histological appearance of muscles from cromolyn-treated and saline-treated *mdx* is shown in Fig. 4, 6, 7. Overall, there were round or roughly polygonal muscle fibers, with their nuclei randomly placed, found in a peripheral location directly under the sarcolemma (Fig. 4). Cromolyn treatment increased in about 30% the percentage of the fibers with peripheral nuclei only in the TA muscle (Table 1). Fully regenerated muscle fibers were mainly seen in the peripheral + central cell nuclei fiber area (Fig. 8), characterized by central nucleation and apparent normal diameter. In the cromolyn-treated TA muscle, there was a significant decrease in

the percentage of central nucleated fibers (Table 1). Inflammatory cells, myoblasts and myotubes were predominant in the inflammatory cell infiltration/regeneration area (Fig. 6). Myotubes were mainly seen in the regeneration area (Fig. 7B).

Morphometric analyses showed a significant increase in the percentage of inflammatory-regeneration area in the cromolyn-treated group, with a 5.7% increase in the STN and 11.3% increase in the TA (Table 2). There was no difference in the area of regeneration in the cromolyn-treated and non-treated *mdx* for both muscles and there was a significant decrease in the peripheral + central nuclei fiber area for TA ($p < 0.05$; Table 2). The total cross-sectional area of both muscles decreased with cromolyn ($p < 0.05$; Table 2).

There were no changes in serum CK activity in the cromolyn treated mice compared to the saline treated ($1,503 \pm 524$ U/L for controls and $2,209 \pm 688$ U/L for cromolyn-treated; $p > 0.05$, Student's *t* Test).

Discussion

In the present, we investigated whether the earlier treatment with cromolyn, before the beginning of the degenerative cycles, would protect the dystrophic muscle fiber of *mdx* mice from degeneration. The rationale for the use of this compound arises from two evidences. First, the one that suggests the involvement of mast cell products, such as proinflammatory cytokines, in the myonecrosis of dystrophic muscle (Lefaucheur *et al*, 1996). Second, the observation that cromolyn improves the functional performance of exercised *mdx* mice, possibly by acting directly in the sarcolemma (Granchelli *et al*., 1996).

Mdx mice show histological signs of muscle fiber degeneration beginning at 21 days after birth (Tanabe *et al*., 1986), followed by cycles of muscle fiber degeneration-regeneration, which enables these mice to recover normal functional ability at about 6 months of age. Previously,

these mice were submitted to exercise to induce a status of weakness that would be appropriate to compare with human DMD and to evaluate the potential therapeutic effects of this drug (Granchelli et al., 1996). At the present, *mdx* mice were treated at P14, before the beginning of degenerative cycles, when there is poor muscle fiber degeneration and few central nucleated fibers (Minatel et al., 2003). Therefore, we would be able to see, by histological means, whether cromolyn treatment would decrease muscle fiber degeneration, measured by Evans blue dye-positive fibers (myonecrosis) and central nucleated fibers (regeneration).

Cromolyn treatment leads to a dramatic decrease in the percentage of Evans blue dye labeled fibers, both in TA and STN muscle. This decrease was accompanied, in the TA muscle, by a significant decrease in the percentage of central nucleated fibers, reinforcing the fact that fewer fibers suffered degeneration. In agreement with that, there was a significant increase in the percentage of fibers that remained with peripheral nuclei. Taken together, these results show that the earlier treatment with cromolyn, before the beginning of the degenerative cycles, protects the dystrophic muscle fiber of *mdx* mice from degeneration.

Proinflammatory cytokines, which are produced by inflammatory cells, such as mast cells, have a direct effect on muscle fiber degeneration (Grounds and Torrisi, 2004; Leflaucheur et al., 1996). Cromolyn acts *in vitro* and *in vivo* by stabilizing the plasma membrane of mast cells, preventing mast cell degranulation (Ginsburg e Baldwin, 2004; Pesko, 1995; Berman, 1983). Thus, one possibility to explain the present results would be that cromolyn inhibited the production of these factors, leading to a decrease in myonecrosis. However, this seems to not be the case, since we observed an increase in the inflammation-regeneration area in the cromolyn group, suggesting that cromolyn did not act as an anti-inflammatory drug. In addition, there were no changes in mast cell activity measured by serum tryptase activity (Granchelli et al., 1996).

Evans blue dye is widely used as an *in vivo* non-toxic marker of plasma membrane permeability and this technique is able to detect permeable myofibers in muscle affected by muscular dystrophy that are not detected by standard histological techniques (Hamer et al., 2002). In dystrophin-deficient fibers of *mdx* mice and in DMD, the lack of dystrophin is associated with changes in membrane stability and increased levels of calcium in the muscle fiber, which leads to myonecrosis (Bertorini et al., 1982). Cromolyn would act outside the mast cell, directly in the stabilization of the muscle fiber membrane, as already been suggested (Granchelli et al., 1996) which would be in agreement with the dramatic decrease in EBD positive fibers seen in both muscles studied in the cromolyn group.

A striking finding was that CK activity, usually associated with increased sarcolemmal damage (Yoshida et al., 2006), was not decreased in the cromolyn-treated group, as expected. We measured the total serum CK activity, which corresponds to skeletal and cardiac muscle activities. In the present, TA and STN muscles respond differently to cromolyn treatment in several aspects, such as the percentage of peripheral cell nuclei and central nucleated fibers, which did not change in the STN muscle. Overall, the effects of cromolyn were more pronounced in the TA muscles rather than in the STN muscle and it would be possible that STN muscle reaches a steady level of myonecrosis faster than TA muscle, so that within this time period of study we were no longer able to see any effects of the drug. Therefore, it would be possible that other muscles, such as diaphragm and cardiac muscles did not respond to cromolyn treatment in similar extensions, which may explain the CK result observed here and it would be interesting to see whether cromolyn may act differently in different types of muscles.

More recently, it had been shown that cromolyn is an inhibitor of the heat shock protein 90 (hsp90), binding directly to the N- and C-terminal domains of this protein and suppressing its *in vitro* activity (Okada et al., 2003). The heat shock proteins are a family of proteins with several

activities and roles in normal muscle and neuromuscular diseases (for a review see Nishimura and Sharp, 2005). Hsp90 is involved in muscle regeneration, being upregulated in regeneration muscle fibers of DMD (Bornman et al., 1996), whereas hsp70 is involved in muscle degeneration (Bormann, 1995). The area of inflammation-regeneration defined here as an area containing inflammatory cell infiltrate plus myoblasts and myotubes, was increased in the cromolyn treated group. This area represents an earlier stage of muscle regeneration, when compared to the area of regeneration, where myoblasts are mainly seen and poor inflammatory reaction is present. Thus, it seems that cromolyn slowed down the process of muscle regeneration and this may be explained by its action in suppressing the activity of hsp90. Conversely, muscle degeneration was decreased and cromolyn action in hsp70 activity would also be involved.

In conclusion, the present investigation shows that cromolyn treatment, before the cycles of muscle fiber degeneration-regeneration started, protects dystrophic muscle fiber from myonecrosis and promotes the earlier stages of muscle fiber regeneration. This suggests that cromolyn, by acting directly in the stabilization of muscle fiber membrane, or through the heat shock proteins family, may be a useful clinical intervention to treat DMD and other myopathies and also to open new lines of investigation on the mechanisms of dystrophinopathies.

References

- Berman, B.A. Cromolyn: past, present and future. *Pediatric Clinics North America*, v. 30, n. 5, p. 915-930, 1983.
- Bornman, L.; Polla, B.S.; Lotz, B.P.; Gericke, G.S. Expression of heat-shock/stress proteins in Duchenne muscular dystrophy. *Muscle & Nerve*, v. 18, p. 23-31, 1995.
- Bornman, L.; Polla, B.S.; Lotz, B.P.; Gericke, G.S. Heat-shock protein 90 and ubiquitin: developmental regulation during myogenesis. *Muscle & Nerve*, v. 19, p. 574-580, 1996.
- Bertorini, T.E.; Bhattacharya, S.K.; Palmieri, G.M.M.A.; Chesney, C.M.; Pifer, D.; Baker, B. Muscle calcium and magnesium content in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology*, v. 32, p. 1088-1092, 1982.
- Bulfield, G.; Siller, W.G.; Wight, P.A.L.; Moore, K.J. X chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 81, p. 1189-1192, 1984.
- Engel, A.G.; Yamamoto, M.; Fischbeck, K.H. Distrophinopathies. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. *Myology*. New York: McGraw-Hill, Inc., 1994. 1937p. p. 1133-1187. ISBN 0070195595.
- Ginsburg, M.L.; Baldwin, A.L. Disodium cromoglycate stabilizes mast cell degranulation while reducing the number of hemoglobin-induced microvascular leaks in rat mesentery. *American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology*, v. 286, p. H1750-H1756, 2004.
- Granchelli, J.A.; Avosso, D.L.; Hudecki, M.S.; Pollina, C. cromolyn increases strength in exercised mdx mice. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology*, v. 91, p. 287-296, 1996.
- Grounds, M.D.; Torrisi, J. Anti-TNF α (Remicade®) therapy protects dystrophic skeletal muscle from necrosis. *FASEB Journal*, v. 18, p. 676-682, 2004.
- Hamer, P.W., McGeachie, J.M., Davies, M.J., Grounds, M.D. Evans blue dye an in vivo marker of myofibre damage: optimising parameters for detecting initial myofibre membrane permeability. *Journal of Anatomy*, v. 200, p. 69-79, 2002.
- Okada, M.; Itoh, H.; Hatakeyama, T.; Tokumitsu, H.; Kobayashi, R. Hsp90 is a direct target of the anti-allergic drugs disodium cromoglycate and amlexanox. *Biochemical Journal*, v. 374, p. 433-441, 2003.
- Pearce, F.L.; Al-Laith, M. Effects of sodium chromoglycate and nedocromil sodium on histamine secretion from mast cells from various locations. *Drugs*, v. 37, Suppl 1, p. 37-43, 1989.
- Pesko, L.J. Cromolyn sodium topical (Compounding). *American Druggist*, v. 211, n. 6, p. 46-48, 1995.

- Porter, J.D.; Merriam, A.P.; Leahy, P.; Gong, B.; Khanna, S. Dissection of temporal gene expression signatures of affected and spared muscle groups in dystrophin-deficient (mdx) mice. *Human Molecular Genetics*, v. 12, n. 15, p. 1813-1821, 2003.
- Lefaucheur, J.P.; Gjata, B.; Seville, A. Factors inducing mast cell accumulation in skeletal muscle. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, v. 22, p. 248-255, 1996.
- Skuk, D.; Tremblay, J.P. Myoblast transplantation: the current status of a potential therapeutic tool for myopathies. *Journal Muscular Research Cells Motility*. V. 24, p. 285-300, 2003.
- 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.
- Wells, D.J. Ferrer, A.; Wells, K.E. Immunological hurdles in the path to gene therapy for Duchenne muscular dystrophy. *Experimental Review Molecular Medicine*. v. 4, p. 1-23, 2002.
- Yoshida. M., Yonetani, A., Shirasaki, T., Wada, K. Dietary NaCl supplementation prevents muscle necrosis in a mouse model of Duchenne muscular dystrophy. *American Journal of Physiology- Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, v. 290, n. 2, p. R449-R455, 2006.