



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

CRISTIANE AKEMI IAMAMOTO

**QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MÚSCULO  
ESTRIADO ESQUELÉTICO DE RATOS ATRAVÉS DE  
QUIMILUMINESCÊNCIA: MODELOS DE LESÃO POR  
ISQUEMIA-REPERFUSÃO E CAQUEXIA INDUZIDA POR  
TUMOR DE WALKER-256**

---

Londrina  
2007

**CRISTIANE AKEMI IAMAMOTO**

**QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MÚSCULO  
ESTRIADO ESQUELÉTICO DE RATOS ATRAVÉS DE  
QUIMILUMINESCÊNCIA: MODELOS DE LESÃO POR  
ISQUEMIA-REPERFUSÃO E CAQUEXIA INDUZIDA POR  
TUMOR DE WALKER-256**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Rubens Cecchini  
Co-orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lourenço  
Cecchini Armani

Londrina  
2007

**Catálogo na publicação elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da  
Biblioteca Central da Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

I11q   Iamamoto, Cristiane Akemi.  
Quantificação de óxido nítrico em músculo estriado esquelético de ratos  
através de quimiluminescência : modelos de lesão por isquemia-reperusão e  
caquexia induzida por tumor de Walker-256 / Cristiane Akemi Yamamoto. –  
Londrina, 2007.  
198f. : il.

Orientador: Rubens Cecchini.  
Co-orientadora: Alessandra Lourenço Cecchini Armani.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual  
de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Patologia Experimental, 2007.  
Inclui bibliografia.

1. Óxido nítrico – Teses. 2. Isquemia – Teses. 3. Câncer – Patologia  
experimental – Teses. 4. Caquexia – Teses. 5. Quimiluminescência – Teses. I.  
Cecchini, Rubens. II. Armani, Alessandra Lourenço Cecchini. III. Universidade  
Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616-092

**CRISTIANE AKEMI IAMAMOTO**

**QUANTIFICAÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO EM MÚSCULO  
ESTRIADO ESQUELÉTICO DE RATOS ATRAVÉS DE  
QUIMILUMINESCÊNCIA: MODELOS DE LESÃO POR  
ISQUEMIA-REPERFUSÃO E CAQUEXIA INDUZIDA POR  
TUMOR DE WALKER-256**

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes

---

Prof. Dr. Wander Eduardo Sardinha

---

Prof. Dr. Rubens Cecchini

Londrina, 06 de julho de 2007.

**Dedico este trabalho**

A meus pais, José Toshiaki Iamamoto e Miyoko Murakami Iamamoto, pelo apoio e amor incondicionais.

A Alexandre Yukio Saito, companheiro de todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Rubens Cecchini e à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Alessandra Lourenço Cecchini Armani, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, UEL, pela imprescindível orientação durante a realização deste trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Glaucia Regina Borba Murad e à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marli Cardoso Martins Pinge, Departamento de Ciências Fisiológicas, Centro de Ciências Biológicas, UEL, ao Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes, Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, ao Prof. Dr. Wander Eduardo Sardinha, Departamento de Clínica Cirúrgica, Centro de Ciências da Saúde, UEL, à Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tânia Longo Mazzuco, ao Prof. Ms. Jair Tonon e ao Prof. Ms. Luiz Antonio Custódio, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, UEL, pelas valiosas contribuições ao trabalho.

À Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Angélica Ehara Watanabe, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, UEL, à Fernanda Bovo e à Eliana de Vito, amigas desde a graduação e colegas de mestrado, pelo incentivo ao ingresso no curso de pós-graduação.

A Alexandre Yukio Saito, companheiro e colega de curso, e a Jesus Antonio Vargas e Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho, técnicos do Laboratório de Patologia, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, UEL, pela assistência técnica prestada durante a realização deste trabalho.

Aos colegas de laboratório, Alissana Ester Iakmiu Camargo, Andréia Akemi Suzukawa, Daniel Kogachi, Eveline Aparecida Isquierdo Fonseca, Fábio Leandro Santos Fenner, Flávia Alessandra Guarnier, Gabriella Schürmann Leite, Leila Regina Arias Rotunno, Leonardo Marostica Alves Silva, Marcelo Abbá Macioszek, Patrícia da Silva Peres, Paula Batista Fernandes, Vânia Aparecida Terra Malachias e Vitor Basso Schul, e aos colegas de mestrado, Alexandre Augusto Sasaki, Alexandre Yukio Saito, Andréia Cofani Bianchini, Celso Luiz Borges, Eliana de Vito, Fernanda Bovo, Juliana Rubira Gerez, Leila Regina Arias Rotunno, Marcos Toshiyuki Tanita, Thiago Franco Nasser e Vera Lúcia Hideko Tatakihara, pela amizade e por terem participado, marcadamente, desta etapa de minha vida.

Ao corpo docente do Mestrado em Patologia Experimental, Prof. Dr. Dirceu Estevão, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eiko Nakagawa Itano, Prof. Dr. Emerson José Venâncio, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ionice Felipe, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Maria Angélica Ehara Watanabe, Prof. Dr. Mario Augusto Ono, Prof. Dr. Mário Sérgio Mantovani, Prof. Dr. Phileno Pinge Filho, Prof. Dr. Rubens Cecchini, por ter contribuído para a minha formação científica.

Aos membros do grupo de estudos Referata Fisio-Pato, pelas valiosas informações compartilhadas.

À Vânia Darc, Secretária do Mestrado em Patologia Experimental, Centro de Ciências Biológicas, UEL, pelo apoio na fase final do curso.

À CAPES, ao CNPq e ao PRONEX-PR, pelo apoio financeiro que permitiu a realização deste trabalho.

IAMAMOTO, Cristiane Akemi. **Quantificação de óxido nítrico em músculo estriado esquelético de ratos através de quimiluminescência: modelos de lesão por isquemia-reperfusão e caquexia induzida por tumor de Walker-256.** 2007. 197f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.

## RESUMO

A participação do óxido nítrico ( $\cdot\text{NO}$ ) e do peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ) tem sido sugerida na lesão por isquemia-reperfusão (LIR) do músculo esquelético e, recentemente, na caquexia associada ao câncer. Em virtude das dificuldades encontradas na quantificação do  $\cdot\text{NO}$ , avaliações indiretas de sua síntese têm sido utilizadas, frequentemente, para a investigação de efeitos atribuídos ao  $\cdot\text{NO}$  tanto em condições fisiológicas, como patológicas. A produção de  $\cdot\text{NO}$  foi diretamente detectada no músculo esquelético, nos modelos experimentais de LIR e caquexia induzida por tumor de Walker-256, através de um método de quimiluminescência altamente sensível e específico. Ratos Wistar machos adultos foram submetidos a 4 h de isquemia induzida pela aplicação de torniquete na extremidade proximal da pata posterior esquerda, acompanhada por 1 ( $\text{IR}_1$ ), 2 ( $\text{IR}_2$ ) ou 4 ( $\text{IR}_4$ ) h de reperfusão. NG-nitro-L-arginina metil éster (LNAME – 20 mg/kg), aminoguanidina (AG – 50 mg/kg) ou desferrioxamina (DFO – 60 mg/kg) foi administrado intraperitonealmente (ip) 1 h antes do início da reperfusão. A caquexia foi induzida em ratos pelo tumor de Walker-256, através da inoculação subcutânea (sc) de  $8 \times 10^7$  células tumorais na porção lateral da pata posterior direita. Estes animais foram divididos em 4 grupos, de acordo com o tempo decorrido após o implante do tumor: 3 (T3), 5 (T5), 10 (T10) ou 14 dias (T14). Para eliminar o efeito da redução de ingestão alimentar apresentada pelos grupos experimentais, foram realizados grupos controles PBS / Pair Fed. Cada grupo experimental foi comparado com o respectivo grupo controle PBS / Pair Fed. LNAME (20 mg/kg) ou AG (50 mg/kg) foi administrado ip diariamente até o 5º dia após o implante do tumor. Em ambos os modelos, os músculos gastrocnêmios esquerdos foram removidos e homogeneizados (0,05% m/v) com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2mM, pH 8,5, degaseificado pelo  $\text{N}_2$ , diluídos 20 vezes e adicionados à mistura de reação (luminol 4,39  $\mu\text{M}$ , DFO 36,58  $\mu\text{M}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$  2,44 mM, 25°C). A solução padrão de  $\cdot\text{NO}$  foi utilizada para a curva de calibração (20,80-355,55 aM). A altura e a área sob as curvas de quimiluminescência foram utilizadas para a quantificação de  $\cdot\text{NO}$ . As concentrações de  $\cdot\text{NO}$  (média  $\pm$  EPM fmol / g de tecido) encontradas na LIR foram: Controle ( $4,73 \pm 0,24$ ); Isquemia ( $4,16 \pm 0,99$ );  $\text{IR}_1$  ( $4,26 \pm 0,32$ );  $\text{IR}_2$  ( $5,84 \pm 1,27$ );  $\text{IR}_4$  ( $18,25 \pm 2,04$ );  $\text{IR}_4\text{AG}$  ( $8,08 \pm 0,69$ );  $\text{IR}_4\text{LNAME}$  ( $3,33 \pm 0,298$ );  $\text{IR}_4\text{DFO}$  ( $2,83 \pm 0,30$ ). A perda de massa muscular (%) foi utilizada como indicador de caquexia: PBS / Pair Fed 5 ( $-7,56 \pm 1,03$ ); PBS / Pair Fed 10 ( $5,26 \pm 0,38$ ); PBS / Pair Fed 14 ( $9,11 \pm 1,02$ ); T3 ( $7,36 \pm 2,76$ ); T5 ( $11,63 \pm 2,21$ ); T5LNAME ( $16,71 \pm 3,28$ ); T5AG ( $11,24 \pm 1,13$ ); T10 ( $35,38 \pm 1,60$ ); T14 ( $33,09 \pm 2,37$ ). As concentrações de  $\cdot\text{NO}$  nestes animais foram: PBS / *ad libitum* ( $4,81 \pm 0,18$ ); PBS / Pair Fed 5 ( $2,52 \pm 0,25$ ); PBS / Pair Fed 10 ( $1,96 \pm 0,14$ ); PBS / Pair Fed 14 ( $1,84 \pm 0,11$ ); T3 ( $1,35 \pm 0,15$ ); T5 ( $5,20 \pm 0,48$ ); T5LNAME ( $2,06 \pm 0,18$ ); T5AG ( $2,41 \pm 0,20$ ), T10 ( $1,92 \pm 0,08$ ); T14 ( $2,13 \pm 0,32$ ). Houve aumento da concentração de  $\cdot\text{NO}$  após 4 h de reperfusão, sendo significativamente inibido pela AG e bloqueado pelo LNAME e pela DFO. Estes resultados revelam o envolvimento do  $\cdot\text{NO}$  após 4 h de reperfusão e confirmam estudos prévios em nosso laboratório mostrando o aumento de hidroperóxidos lipídicos e da expressão de iNOS no músculo após 4 h de reperfusão, mas não após a isquemia. No modelo de caquexia, houve redução da concentração de  $\cdot\text{NO}$  em T3, aumentando significativamente em T5. Este aumento foi bloqueado pelo uso de LNAME ou AG. O aumento no 5º dia ocorreu, possivelmente, pela ativação de iNOS pelo TNF- $\alpha$ ,



conforme verificado por outros autores. A partir do 10<sup>o</sup> dia, não houve qualquer alteração da concentração de  $\cdot\text{NO}$ . Houve aumento da concentração de hidroperóxidos lipídicos em T5, que foi significativamente diminuído por ambos os inibidores de NOS, demonstrando o envolvimento do  $\cdot\text{NO}$  na peroxidação lipídica observada no músculo esquelético. Esta é a primeira evidência direta da geração e participação do  $\cdot\text{NO}$  na LIR do músculo esquelético. Nossos resultados mostram, ainda, o envolvimento do  $\cdot\text{NO}$  na lesão peroxidativa observada no músculo esquelético de ratos com caquexia induzida pelo tumor de Walker-256.

**Palavras-chave:** óxido nítrico. Peroxinitrito. lesão de isquemia-reperusão. Caquexia. tumor de Walker-256. músculo esquelético. quimiluminescência.

IAMAMOTO, Cristiane Akemi. **Measurement of nitric oxide on rat skeletal striated muscle by chemiluminescence: models of ischemia-reperfusion injury and Walker-256 tumor-induced cachexia.** 2007. 197f. Dissertation (Master's Degree in experimental pathology) – State University of Londrina, Londrina, 2007.

## ABSTRACT

Nitric Oxide ( $\text{NO}$ ) and peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) has been suggested to be implicated in skeletal muscle damage during Ischemia-Reperfusion Injury (IRI) and more recently, in cancer cachexia. Since  $\text{NO}$  measurement is difficult, indirect approach has been used as tools to investigate the role of  $\text{NO}$  in both physiological and pathological conditions. Using a specific and sensitive chemiluminescence method,  $\text{NO}$  production was directly measured on skeletal muscle in experimental models of IRI and Walker-256 tumour-induced cachexia. Adult male Wistar rats were subjected to 4 h of ischemia by applying of a tourniquet at left hindlimb followed by 1 ( $\text{IR}_1$ ), 2 ( $\text{IR}_2$ ) or 4 h ( $\text{IR}_4$ ) reperfusion. NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME - 20mg/kg), aminoguanidine (AG - 50mg/kg) or desferrioxamine (DFO – 60mg/kg) was injected intraperitoneally (ip) 1 h prior beginning reperfusion. Cachexia was induced in rats by inoculation of  $8 \times 10^7$  Walker-256 tumor cells at right hindlimb subcutaneously (sc). These animals were divided into 4 groups, according to number of days following tumor implantation: 3 (T3), 5 (T5), 10 (T10) and 14 days (T14). To remove the effect of food intake reduction seem in experimental groups, PBS / Pair Fed control groups were also included. Each experimental group was compared with its respective PBS / Pair Fed control group. LNAME (20 mg/kg) or AG (50 mg/kg) was administered ip daily until 5<sup>o</sup> day after tumor implantation. Left gastrocnemius muscles of both models were excised, homogenized (0.05% w/v) in 2mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  at pH 8.5 previously degassed by  $\text{N}_2$ , diluted 20 times and added to reaction mixture (4.39  $\mu\text{M}$  luminol, 36.58  $\mu\text{M}$  DFO, 2.44 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  and degassed 2mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 8.5, 25°C). Standard  $\text{NO}$  solution was used for the calibration curve (20.80-355.55 aM) using the height and the area under chemiluminescence curves for the  $\text{NO}$  measurement.  $\text{NO}$  levels expressed as a mean  $\pm$  SEM fmol/g of tissue were: Control ( $4.73 \pm 0.24$ ), Ischemia ( $4.16 \pm 0.99$ ),  $\text{IR}_1$  ( $4.26 \pm 0.32$ ),  $\text{IR}_2$  ( $5.84 \pm 1.27$ ),  $\text{IR}_4$  ( $18.25 \pm 2.04$ ),  $\text{IR}_4\text{AG}$  ( $8.08 \pm 0.69$ )  $\text{IR}_4\text{LNAME}$  ( $3.33 \pm 0.29$ ) and  $\text{IR}_4\text{DFO}$  ( $2.83 \pm 0.30$ ). Loss of muscle mass (%) was used as cachexia marker: PBS / Pair Fed 5 ( $-7.56 \pm 1.03$ ); PBS / Pair Fed 10 ( $5.26 \pm 0.38$ ); PBS / Pair Fed 14 ( $9.11 \pm 1.02$ ); T3 ( $7.36 \pm 2.76$ ); T5 ( $11.63 \pm 2.21$ ); T5LNAME ( $16.71 \pm 3.28$ ); T5AG ( $11.24 \pm 1.13$ ); T10 ( $35.38 \pm 1.60$ ); T14 ( $33.09 \pm 2.37$ ).  $\text{NO}$  levels were: PBS / *ad libitum* ( $4.81 \pm 0.18$ ); PBS / Pair Fed 5 ( $2.52 \pm 0.25$ ); PBS / Pair Fed 10 ( $1.96 \pm 0.14$ ); PBS / Pair Fed 14 ( $1.84 \pm 0.11$ ); T3 ( $1.35 \pm 0.15$ ); T5 ( $5.20 \pm 0.48$ ); T5LNAME ( $2.06 \pm 0.18$ ); T5AG ( $2.41 \pm 0.20$ ); T10 ( $1.92 \pm 0.08$ ); T14 ( $2.13 \pm 0.32$ ).  $\text{NO}$  levels increased only after 4 h of reperfusion which was significantly inhibited by AG and suppressed by LNAME and DFO. These results revealed the involvement of  $\text{NO}$  after 4 h reperfusion and confirm previous studies in our laboratory that showed increased muscle lipid hydroperoxides and iNOS expression, which occurred after 4 h reperfusion, but not after ischemia. In cachexia model,  $\text{NO}$  levels decreased on the 3<sup>th</sup> day and increased significantly on the 5<sup>th</sup>. This increase was suppressed by LNAME or AG use. Increase of  $\text{NO}$  levels on the 5<sup>th</sup> day must have occurred after iNOS activation by  $\text{TNF-}\alpha$  as verified by others authors. There were no changes of  $\text{NO}$  levels on the 10<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> days. Lipid hydroperoxides levels increased on the 5<sup>th</sup> day that was significantly decreased by both NOS inhibitors, supporting the involvement of  $\text{NO}$  in skeletal muscle lipid peroxidation. This is the first direct evidence showing increased generation and participation of  $\text{NO}$  in skeletal muscle ischemia-

reperfusion injury. Our data also evidenced the involvement of  $\cdot\text{NO}$  in skeletal muscle peroxidative damage showed in rats with Walker-256 tumor-induced cachexia.

**Keywords:** nitric oxide. Peroxynitrite. ischemia-reperfusion injury. Cachexia. Walker-256 tumor. skeletal muscle. chemiluminescence.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1</b> – Esquema representativo da estrutura da NOS, mostrando as etapas da síntese de $\cdot\text{NO}$ .....  | 19 |
| <b>Figura 2</b> – Mecanismos de lesão tecidual na Isquemia-Reperfusão.....  | 32 |
| <b>Figura 3</b> – Esquema ilustrativo mostrando as interações entre os sistemas proteolíticos e as principais anormalidades observadas durante o desenvolvimento da caquexia associada ao câncer .....  | 45 |
| <b>Figura 4</b> – Avaliação da formação de edema durante a realização do protocolo experimental de isquemia-reperfusão em ratos .....   | 53 |
| <b>Figura 5</b> – Exsanguinamento pré-isquemia .....  | 54 |
| <b>Figura 6</b> – Protocolo Experimental de Isquemia-Reperfusão em Ratos.....   | 54 |
| <b>Figura 7</b> – Protocolo experimental de caquexia induzida pelo tumor de Walker-256 em ratos .....   | 57 |
| <b>Figura 8</b> – Representação esquemática da análise de $\cdot\text{NO}$ através de quimiluminescência...   | 60 |
| <b>Figura 9</b> – Gráfico representativo da emissão de quimiluminescência pela amostra de tecido .....  | 65 |
| <b>Figura 10</b> – Curva-padrão de $\cdot\text{NO}$ representada segundo a altura ou a área sob as curvas de quimiluminescência .....   | 66 |
| <b>Figura 11</b> – Quimiluminescência emitida por diferentes concentrações de tecido. A: Correlação com as curvas de quimiluminescência. B: Correlação com a altura e a área sob as curvas de quimiluminescência.....                                   | 68 |
| <b>Figura 12</b> – Efeito da saturação de uma amostra de tecido com $\text{O}_2$ sobre a quimiluminescência.....  | 69 |
| <b>Figura 13</b> – Representação das curvas de quimiluminescência obtidas da análise em triplicata de uma amostra de tecido .....   | 70 |
| <b>Figura 14</b> – Efeito do tempo sobre a quimiluminescência .....   | 70 |
| <b>Figura 15</b> – Efeito da adição de excesso de $\cdot\text{NO}$ sobre a quimiluminescência .....   | 71 |
| <b>Figura 16</b> – Quimiluminescência induzida por t-butil hidroperóxido emitida por diferentes concentrações de tecido. A: Correlação com as curvas de quimiluminescência B: Correlação com a altura e a área sob as curvas de quimiluminescência..... | 72 |
| <b>Figura 17</b> – Comparação entre as curvas de quimiluminescência iniciada por $\text{H}_2\text{O}_2$ -luminol, obtidas pelos grupos controle e experimentais .....   | 75 |

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 18</b> – Efeito dos inibidores de NOS e do quelante de ferro sobre a quimiluminescência iniciada por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -luminol, emitida pelo músculo esquelético após 4 h de reperfusão .....   | 76 |
| <b>Figura 19</b> – Ingestão alimentar apresentada pelos ratos com caquexia induzida pelo tumor de Walker-256.....  | 78 |
| <b>Figura 20</b> – Ingestão alimentar apresentada por animais tratados com inibidores de NOS ...   | 79 |
| <b>Figura 21</b> – Estabelecimento da caquexia em ratos com tumor de Walker-256 .....  | 80 |
| <b>Figura 22</b> – Efeito dos inibidores de NOS sobre as perdas de massa corpórea (A) e muscular (B) .....   | 81 |
| <b>Figura 23</b> – Quimiluminescência induzida por t-butil hidroperóxido para avaliação de lesão lipoperoxidativa em músculo esquelético de ratos com tumor de Walker-256. A: T3xPBS/ <i>ad libitum</i> ; B: T5xPBS/ Pair Fed 5; C: T10xPBS/ Pair Fed 10; D: T14xPBS/ Pair Fed 14.....               | 83 |
| <b>Figura 24</b> – Efeito dos inibidores de NOS sobre a quimiluminescência induzida por t-butil hidroperóxido em músculo esquelético de ratos 5 dias após o implante do tumor de Walker-256.....   | 84 |
| <b>Figura 25</b> – Quimiluminescência induzida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -luminol para quantificação de <sup>•</sup> NO em músculo esquelético de ratos com tumor de Walker-256. A: T3xPBS/ <i>ad libitum</i> ; B: T5xPBS/ Pair Fed 5; C: T10xPBS/ Pair Fed 10; D: T14xPBS/ Pair Fed 14..... | 85 |
| <b>Figura 26</b> – Efeito dos inibidores de NOS sobre a quimiluminescência induzida por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -luminol em músculo esquelético de ratos 5 dias após o implante do tumor de Walker-256 .....   | 86 |

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> – Tempo de tolerância à isquemia em diferentes tecidos .....   | 28 |
| <b>Tabela 2</b> – Alterações metabólicas encontradas na caquexia associada ao câncer.....  | 41 |
| <b>Tabela 3</b> – Principais mediadores envolvidos na caquexia associada ao câncer .....   | 42 |
| <b>Tabela 4</b> – Edema de pata observado em animais submetidos à isquemia-reperfusão experimental (%) .....   | 73 |
| <b>Tabela 5</b> – Níveis de $\text{NO}$ em músculo esquelético de ratos submetidos à isquemia-reperfusão experimental .....                          | 77 |
| <b>Tabela 6</b> – Níveis de $\text{NO}$ em músculo esquelético de ratos durante o estabelecimento da caquexia induzida pelo tumor de Walker-256..... | 87 |

## LISTA DE QUADROS

|   |    |
|---|----|
| <b>Quadro 1</b> – Efeitos biológicos diretos do $\cdot\text{NO}$ .....  | 25 |
| <b>Quadro 2</b> – Efeitos biológicos indiretos do $\cdot\text{NO}$ mediados pelo $\text{N}_2\text{O}_3$ ..... | 26 |
| <b>Quadro 3</b> – Efeitos biológicos indiretos do $\cdot\text{NO}$ mediados pelo $\text{ONOO}^-$ .....        | 27 |

## LISTA DE SIGLAS

**AG** – aminoguanidina

**ATP** – adenosina trifosfato

**BH<sub>4</sub>** – (6R)-5,6,7,8-tetra-hidrobiopterina

**Ca<sup>2+</sup>** – íon cálcio

**Cnos** – <sup>•</sup>NO sintase constitutiva

**DFO** – desferrioxamina

**ENOS** – <sup>•</sup>NO sintase endotelial

**EPM** – Erro Padrão da Média

**ERN** – espécie reativa de nitrogênio

**ERRO** – espécie reativa de oxigênio

**Fé** – ferro

**Fe<sup>2+</sup>** – íon ferroso

**Fe<sup>3+</sup>** – íon férrico

**H** – hora (s)

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – peróxido de hidrogênio

**HOONO** – ácido peroxinitroso

**INOS** – <sup>•</sup>NO sintase indutível

**Ip** – intraperitoneal/ intraperitonealmente

**LIR** – lesão por isquemia-reperfusão

**LNAME** – NG-nitro-L-arginina-metil éster

**LNMMA** – NG-monometil-L-arginina acetato

**LNNA** – N -nitro-L-arginina

**MDA** – malondialdeído

**Min** – minuto (s)

**MtNOS** – <sup>•</sup>NO sintase mitocondrial

**N** – número de animais utilizados ou de experimentos realizados

**N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>** – trióxido de dinitrogênio

**NADPH** – nicotinamida adenina difosfonucleotídeo

**NF- κB** – fator nuclear κB

**NNOS** – <sup>•</sup>NO sintase neuronal

**<sup>•</sup>NO** – óxido nítrico

**NO<sup>+</sup>** – cátion nitroxil



**NO<sub>2</sub>** – dióxido de nitrogênio

**NO<sub>2</sub><sup>-</sup>** – nitrito

**·NO<sub>2</sub>** – radical nitrito

**NO<sub>2</sub><sup>+</sup>** – cátion nitrito

**NO<sub>3</sub><sup>-</sup>** – nitrato

**O<sub>2</sub><sup>·-</sup>** – ânion radical superóxido

**O<sub>2</sub>** – oxigênio

**·OH** – radical hidroxil

**ONOO<sup>-</sup>** – peroxinitrito

**s** – segundo (s)

**sc** – subcutânea/ subcutaneamente

**SEM** – standard error medium

**SOD** – superóxido dismutase

**TNF-α** – fator de necrose tumoral α

**TNF-β** – fator de necrose tumoral β

**URL** – unidade relativa de luz

**XO** – xantina oxidase

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| <b>1 INTRODUÇÃO</b> .....   | 18 |
| 1.1 ÓXIDO NÍTRICO .....   | 18 |
| 1.1.1 Síntese.....  | 18 |
| 1.1.1.1 Síntese dependente de $\cdot\text{NO}$ sintase .....  | 18 |
| 1.1.1.2 Síntese independente de $\cdot\text{NO}$ sintase .....                                      | 22 |
| 1.1.2 Propriedades Biológicas .....   | 23 |
| 1.2 LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO: ASPECTOS GERAIS .....  | 27 |
| 1.3 LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO: IMPORTÂNCIA CLÍNICA .....  | 32 |
| 1.4 $\cdot\text{NO}$ E LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO: MÉTODOS DE ANÁLISE.....                       | 34 |
| 1.5 $\cdot\text{NO}$ E LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO: ESTUDOS EXPERIMENTAIS .....                   | 37 |
| 1.6 CAQUEXIA: ASPECTOS GERAIS.....  | 40 |
| 1.7 CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER: IMPORTÂNCIA CLÍNICA .....   | 46 |
| 1.8 CAQUEXIA E ESTRESSE OXIDATIVO: ESTUDOS EXPERIMENTAIS .....                                      | 47 |
| <br>  |    |
| <b>2 OBJETIVOS</b> .....  | 50 |
| <br>  |    |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 51 |
| 3.1 ANIMAIS .....   | 51 |
| 3.2 REAGENTES .....   | 51 |
| 3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO.....   | 52 |
| 3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO .....   | 52 |
| 3.5 MANUTENÇÃO DO TUMOR DE WALKER-256 .....   | 55 |
| 3.6 MODELO EXPERIMENTAL DE CAQUEXIA .....   | 55 |
| 3.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE CAQUEXIA .....  | 55 |
| 3.8 INDICADORES DE CAQUEXIA.....  | 56 |
| 3.9 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR $\text{H}_2\text{O}_2$ -LUMINOL ..... | 58 |
| 3.9.1 Curva Padrão de $\cdot\text{NO}$ .....  | 58 |
| 3.9.2 Curva de Tecido .....   | 58 |
| 3.9.3 Reação de Quimiluminescência.....   | 59 |
| 3.9.4 Adição de Excesso de $\cdot\text{NO}$ em Amostras de Tecido .....                             | 61 |
| 3.9.5 Saturação de Amostras de Tecido com Oxigênio.....   | 61 |

|  |            |
|--|------------|
| 3.10 ENSAIO DE QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR T-BUTIL HIDROPERÓXIDO .....                                 | 61         |
| 3.10.1 Amostra de Tecido .....   | 61         |
| 3.10.2 REAÇÃO DE QUIMILUMINESCÊNCIA.....   | 62         |
| 3.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA.....  | 62         |
| 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....  | 63         |
| <br>   |            |
| <b>4 RESULTADOS</b> .....  | <b>64</b>  |
| 4.1 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -LUMINOL ..... | 64         |
| 4.2 ENSAIO DE QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR T-BUTIL HIDROPERÓXIDO .....                                  | 71         |
| 4.3 ENVOLVIMENTO DO $\dot{\text{NO}}$ NA LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO.....                                | 73         |
| 4.4 ENVOLVIMENTO DO $\dot{\text{NO}}$ NA CAQUEXIA INDUZIDA PELO TUMOR DE WALKER-256 .....                  | 77         |
| <br>   |            |
| <b>5 DISCUSSÃO</b> .....   | <b>88</b>  |
| 5.1 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -LUMINOL ..... | 88         |
| 5.2 ENVOLVIMENTO DO $\dot{\text{NO}}$ NA LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO .....                               | 91         |
| 5.3 ENVOLVIMENTO DO $\dot{\text{NO}}$ NA CAQUEXIA INDUZIDA PELO TUMOR DE WALKER-256.....                   | 93         |
| <br>   |            |
| <b>6 CONCLUSÃO</b> .....   | <b>98</b>  |
| 6.1 MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE $\dot{\text{NO}}$ .....   | 98         |
| 6.2 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO .....   | 98         |
| 6.3 MODELO EXPERIMENTAL DE CAQUEXIA INDUZIDA POR TUMOR DE WALKER-256.....                                  | 98         |
| <br>   |            |
| <b>REFEÊNCIAS</b> .....  | <b>100</b> |
| <br>   |            |
| <b>ANEXOS</b> .....  | <b>129</b> |

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ÓXIDO NÍTRICO

Há aproximadamente 20 anos, o óxido nítrico ( $\text{NO}$ ) tem sido tema de intensa pesquisa visando à compreensão de seu envolvimento em processos fisiológicos e fisiopatológicos (ZHOU; BERNHARD, 2005). A seguir, serão abordadas as principais vias de síntese e ações biológicas do  $\text{NO}$ .

### 1.1.1 Síntese

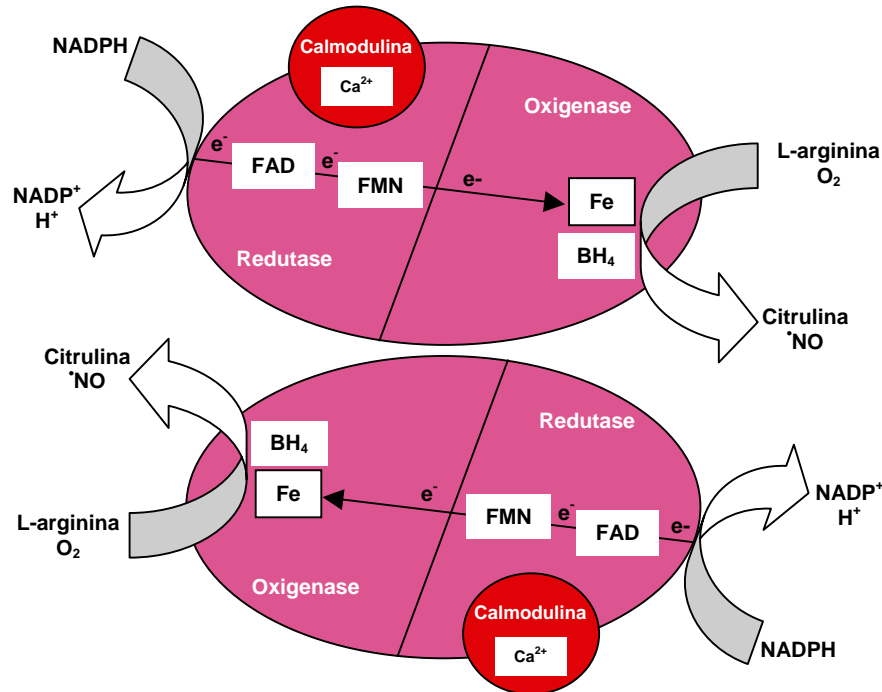
Apesar da existência de outras enzimas envolvidas na liberação ou na síntese de  $\text{NO}$ , tais como nitrito redutases bacterianas (CUTRUZZOLA, 1999; WATMOUGH et al., 1999), xantina oxidase (XO) (MILLAR et al., 1998) e enzimas que agem sobre doadores de  $\text{NO}$  (FEELISCH, 1998), será dado maior enfoque à óxido nítrico sintase (NOS) em virtude desta enzima ser a principal responsável pela síntese de  $\text{NO}$  em mamíferos, incluindo o homem, e da sua relevante participação na patogênese da lesão por isquemia-reperusão (LIR) e da caquexia induzida por câncer.

#### 1.1.1.1 Síntese dependente de $\text{NO}$ sintase

A enzima NOS pertence à superfamília das monooxigenases, sendo estruturalmente semelhante às isoenzimas do citocromo P450.

Estas enzimas, nas formas ativas, são tetrâmeros formados por dois monômeros de NOS e dois monômeros de calmodulina (CaM). Além da CaM, estas enzimas possuem co-fatores fortemente ligados: (6R)-5,6,7,8-tetra-hidrobipterina ( $\text{BH}_4$ ), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e ferro protoporfirina IX (heme). Conforme ilustrado na figura 1, a NOS catalisa a reação de síntese de  $\text{NO}$  e citrulina

a partir de L-arginina, nicotinamida adenina difosfonucleotídeo (NADPH) e oxigênio ( $O_2$ ) (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).



**Figura 1** – Esquema representativo da estrutura da NOS, mostrando as etapas da síntese de  $NO$ . Elétrons ( $e^-$ ) são doados pela NADPH ao domínio redutase da enzima e prosseguem através dos carreadores redox FAD e FMN até o domínio oxigenase, onde interagem com o ferro do heme e com o  $BH_4$  no sítio ativo para catalisar a reação do  $O_2$  com a L-arginina, produzindo  $NO$  e citrulina. O fluxo de elétrons através do domínio redutase requer a ligação  $Ca^{2+}/CaM$ . **Fonte:** Alderton; Cooper; Knowles, 2001.

Três isoformas distintas de NOS têm sido identificadas como produtos de diferentes genes, apresentando localização, regulação, sensibilidade a inibidores e propriedades catalíticas características. Em humanos, tem sido relatado 51-57% de homologia entre as isoformas de NOS. Estas enzimas obedecem à seguinte nomenclatura: nNOS (também conhecida como tipo I, NOS-I e NOS-1), a primeira isoforma descoberta e predominantemente encontrada no tecido neuronal; iNOS (também conhecida como tipo II, NOS-II e NOS-2), cuja expressão é induzida em diferentes tipos celulares e eNOS (também conhecida como tipo III, NOS-III e NOS-3), encontrada no endotélio (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).

As isoenzimas neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) foram assim denominadas conforme o tipo celular do qual foram primeiramente isoladas e clonadas. Sabe-se, atualmente, que as isoformas de NOS são expressas em outros tipos celulares, incluindo plaquetas (nNOS e iNOS) (RADOMSKI; PALMER; MONCADA, 1990; CHEN; MEHTA, 1996), células polimorfonucleares (iNOS) (YUI et al., 1991; RAO et al., 1992; GOODE et al., 1994; CLARK et al., 1996), macrófagos (iNOS) (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997; REICHNER et al., 1999), fibroblastos (eNOS e iNOS) (WERNER-FELMAYER et al., 1990; WILLIS et al., 1994; WANG et al., 1996; SHIMIZU et al., 1997) e queratinócitos (eNOS e iNOS) (HECK et al., 1992; ARANY et al., 1996; SHIMIZU et al., 1997).

Além do tipo celular onde foram primeiramente descritas, outras características são utilizadas para a diferenciação das isoformas de NOS (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Classicamente, as isoformas são divididas em constitutivas (cNOS), que compreendem eNOS e nNOS, e indutível (iNOS). Contudo, esta terminologia tende a tornar-se obsoleta, uma vez que existem evidências mostrando que as isoformas “constitutivas” podem ser induzidas em algumas circunstâncias, assim como a “indutível” pode ser expressa constitutivamente em algumas células (LIAUDET; SORIANO; SZABO, 2000; ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Lundberg et al. (1995), utilizando técnicas imuno-histoquímicas e de hibridização de RNAm, evidenciaram em humanos que a iNOS é expressa constitutivamente no epitélio do sinus paranasal.

Em outro estudo, Geller e Billiar (1998) constataram que as isoformas de cNOS não são expressas constitutivamente em todos os tipos celulares, necessitando de estímulos como citocinas, LPS e produtos microbianos.

De acordo com Forstermann, Boissel e Kleinert (1998), o aumento da expressão de nNOS é considerado uma resposta comum de células neuronais ao estresse induzido por uma variedade de agentes, incluindo estimulação elétrica, exposição à luz, colchicina, formalina, fenobarbital, alérgenos, imobilização e lesões mecânicas ou patológicas.

Além disso, Weiner et al. (1994) observaram aumento da atividade das isoformas eNOS e nNOS em diferentes tecidos de suínos durante a gravidez e após o tratamento com hormônios sexuais, como estradiol e testosterona. No mesmo estudo, este aumento foi suprimido pelo uso de tamoxifeno, um antagonista do receptor de estradiol. Por outro lado, a atividade da isoforma iNOS não foi alterada por estes estímulos.

Outra classificação das NOS baseia-se na dependência de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) intracelular ( $> \sim 100\text{nM}$ ) para a total atividade enzimática (NATHAN; XIE, 1994). A cNOS

abrange as isoformas dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ , produzindo pequenas concentrações de  $\text{NO}$  (pM) durante curto período de tempo. Em contraste, a iNOS permanece em estado ativado independentemente da concentração de  $\text{Ca}^{2+}$  sendo, portanto, capaz de produzir altas concentrações de  $\text{NO}$  (nM) durante longos períodos de tempo (LIAUDET; SORIANO; SZABO, 2000).

Foi proposto, recentemente, que a mitocôndria possui uma isoforma própria que foi denominada de mtNOS (BROOKES, 2004). As isoformas de NOS localizadas na mitocôndria foram isoladas de fígado e cérebro (BATES et al., 1995) e, posteriormente, de músculo esquelético (KOBZIK et al., 1995).

Os efeitos fisiológicos do  $\text{NO}$  são determinados pela atividade de cNOS, enquanto os citotóxicos estão geralmente associados com a expressão de iNOS (LIAUDET; SORIANO e SZABO, 2000). A expressão gênica da iNOS pode ser observada em condições fisiopatológicas, incluindo a LIR (ANAYA-PRADO et al., 2002; KHANNA; COWLED; FITRIDGE, 2005; ZIMIANI et al., 2005).

Em algumas circunstâncias, a NOS catalisa a síntese do ânion radical superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) (PORASUPHATANA; TSAI; ROSEN, 2003). Estudos *in vitro* demonstraram que a nNOS possui maior propensão em produzir  $\text{O}_2^{\cdot-}$  sob concentrações sub-saturadas de L-arginina ou  $\text{BH}_4$  (POU et al., 1992), ou na presença de alguns inibidores de NOS, tal como NG-monometil-L-arginina (L-NMMA) (KLATT et al., 1993), enquanto a eNOS parece sintetizar quantidades detectáveis, porém baixíssimas de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (~500 nmol / minuto / mg) (LIST et al., 1997; STROES et al., 1998). Tem sido demonstrado que a iNOS também produz  $\text{O}_2^{\cdot-}$  sob as mesmas condições testadas ao analisar as isoformas nNOS e eNOS, porém em quantidades inferiores (~100 nmol / minuto / mg), sendo que a produção de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  foi suprimida somente pelo acréscimo de altas concentrações de arginina (mM) (XIA et al., 1998). Desta forma, todas as isoformas são capazes de gerar  $\text{O}_2^{\cdot-}$ . Entretanto, ainda não está claro se este fenômeno ocorre fisiologicamente (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). Em virtude da rápida reação entre o  $\text{NO}$  e o  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (BECKMAN et al., 1990), a síntese de ambas as espécies pela mesma enzima possibilitaria a formação de peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ), ou a liberação de ambas as espécies (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001). O  $\text{ONOO}^-$  é considerado uma espécie reativa de nitrogênio (ERN) altamente lipoperoxidante envolvida em diversas condições patológicas.

### 1.1.1.2 Síntese independente de $\text{NO}$ sintase

Ultimamente, tem sido dada grande atenção ao nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) em virtude deste composto sofrer reações de redução, formando  $\text{NO}$  em eventos hipóxicos ou durante a isquemia (LEPORE, 2000; BRYAN, 2006). Em mamíferos, a atividade de nitrito redutase tem sido associada à cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (NOHL et al., 2000), à protonação (ZWEIER et al., 1995), à deoxi-hemoglobina (COSBY et al., 2003), à XO (LI et al., 2004) e a neutrófilos ativados (EISERICH et al., 1998).

Tem sido demonstrado que a redução do  $\text{NO}_2^-$  na mitocôndria ocorre pela ubiquinona (KOZLOV; STANIEK; NOHL, 1999; NOHL et al., 2001) e pela citocromo c oxidase (CASTELLO et al., 2006), com a subsequente ligação do  $\text{NO}$  produzido ao sítio do citocromo bc1 do complexo III ou IV, resultando em inibição reversível da respiração mitocondrial (TAKEHARA et al., 1996).

A redução ácida do  $\text{NO}_2^-$  requer protonação e redução de um elétron. O pKa relativamente baixo do  $\text{NO}_2^-$  (3,34) (OXTOBY; NACHTRIEB, 1996) limita esta reação em condições fisiológicas, mas pode ocorrer no estômago ou durante eventos isquêmicos, quando o pH diminui (BRYAN, 2006). Em estudo realizado por Zweier et al. (1995), foi observado correlação entre a formação de  $\text{NO}$  a partir de  $\text{NO}_2^-$ , o tempo de isquemia e o decréscimo de pH.

Recentemente, tem sido relatado que a hemoglobina possui a função de nitrito redutase, apresentando um máximo de conversão a  $\text{NO}$  ao atingir 40-60% de saturação pelo oxigênio (HUANG et al., 2005). Esta característica tem sido considerada responsável por eventos como a sensibilidade ao oxigênio e a vasodilatação que se segue à hipóxia (BRYAN, 2006).

A XO é uma flavoproteína presente em vários tecidos de mamíferos (PARKS; GRANGER, 1986; ZWEIER; KUPPUSAMY; LUTTY, 1988) com importantes funções fisiológicas e fisiopatológicas. Além da capacidade de reduzir  $\text{O}_2$  a  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , em baixas tensões de  $\text{O}_2$  esta enzima é capaz de reduzir  $\text{NO}_2^-$  a  $\text{NO}$  no sítio molibdênio (GODBER et al., 2000; LI et al., 2001). O  $\text{O}_2$  age como um inibidor competitivo da reação de redução de  $\text{NO}_2^-$  pela XO (BRYAN, 2006).

Neutrófilos ativados também podem converter  $\text{NO}_2^-$  de forma dependente de mieloperoxidase, formando os agentes oxidantes cloreto de nitrila ( $\text{NO}_2\text{Cl}$ ) e dióxido de



nitrogênio ( $\text{NO}_2$ ) (EISERICH et al., 1998). Estas espécies nitrogenadas podem agir como fontes de  $\cdot\text{NO}$  (LEPORE, 2000).

Sendo assim, existem diferentes vias de síntese de  $\cdot\text{NO}$  independentes de NOS que podem ocorrer em condições isquêmicas.

Além do  $\text{NO}_2^-$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  também tem sido implicado em uma possível via de síntese de  $\cdot\text{NO}$  independente de NOS. Segundo Nagase et al. (1997), o  $\cdot\text{NO}$  pode ser gerado *in vitro* a partir de D- ou L-arginina mesmo na ausência de NOS, desde que na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Apesar do mecanismo deste fenômeno não ter sido elucidado, se comprovada a sua ocorrência *in vivo*, esta via poderá apresentar grande relevância biológica em condições em que há produção excessiva de ERO, tal como o  $\text{H}_2\text{O}_2$ , uma vez que ao contribuir para o aumento de  $\cdot\text{NO}$  até concentrações tóxicas, potencializaria as lesões oxidativas.

### 1.1.2 Propriedades Biológicas

O  $\cdot\text{NO}$  é um radical livre gasoso e hidrofóbico. A baixa reatividade quando comparado a outros radicais livres (por exemplo, o  $\text{O}_2^{\cdot-}$ ) e a natureza hidrofóbica permitem que o  $\cdot\text{NO}$  difunda-se a longas distâncias intra e intercelularmente. Esta propriedade é essencial para que o  $\cdot\text{NO}$  exerça a função de sinalização autócrina e parácrina (THOMAS et al., 2001).

Os efeitos biológicos do  $\cdot\text{NO}$  são classificados em duas categorias principais, diretos e indiretos. Os efeitos diretos resultam da interação direta do  $\cdot\text{NO}$  com biomoléculas específicas, agindo como um mensageiro regulatório em inúmeros processos fisiológicos. Os indiretos, por sua vez, são mediados por ERN, estando geralmente associados a condições fisiopatológicas. Os efeitos do  $\cdot\text{NO}$  são, ainda, classificados conforme a sua biodisponibilidade (WINK; MITCHELL, 1998). Os efeitos diretos são determinados essencialmente pela atividade de cNOS e ocorrem quando o  $\cdot\text{NO}$  é produzido brevemente e em baixas concentrações ( $<1\mu\text{M}$ ), enquanto os indiretos, de forma sustentada e em altas concentrações ( $>1\mu\text{M}$ ), principalmente em consequência da expressão de iNOS (WINK; MITCHELL, 1998; GRISHAM; JOURD'HEULL; WINK, 1999).

De acordo com Liaudet, Soriano e Szabo (2000), a maioria dos efeitos biológicos diretos do  $\cdot\text{NO}$  resultam das interações com metais de transição, que ocorrem através de três diferentes tipos de reações: 1) a formação de complexos nitrosilados estáveis

por ligações covalentes entre  $\cdot\text{NO}$  e íons metálicos; 2) reações de oxido-redução entre  $\cdot\text{NO}$  e íons metálicos; 3) ligação do  $\cdot\text{NO}$  a grupos ferro-enxofre de proteínas.

A formação de complexos nitrosilados estáveis ocorre predominantemente com o íon ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) de heme-proteínas, resultando no deslocamento do  $\text{Fe}^{2+}$  para fora do plano do anel porfirínico (COOPER, 1999). Esta alteração conformacional pode causar efeitos totalmente opostos, como ativação ou inativação, dependendo da proteína afetada. O quadro 1 mostra os principais alvos moleculares do  $\cdot\text{NO}$  e os respectivos efeitos biológicos diretos.

Os efeitos indiretos do  $\cdot\text{NO}$  ocorrem quando sua produção é potencializada e sustentada, principalmente em consequência do aumento da expressão de iNOS. Com isso, uma série de compostos são formados a partir do  $\cdot\text{NO}$ , coletivamente denominados de ERN, com características bioquímicas próprias. Segundo Liaudet, Soriano e Szabo (2000), as ERN são formadas através de duas reações principais: 1) reação com o  $\text{O}_2$ , formando trióxido de dinitrogênio ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ) e 2) reação com  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , formando  $\text{ONOO}^-$ . Em tais condições, estas ERN participam de reações de nitrosação (adjunção de  $\text{NO}^+$ ), nitração (adjunção de  $\text{NO}_2^+$ ) e oxidação, modificando estruturalmente e funcionalmente diversas biomoléculas.

O quadro 2 mostra os principais efeitos biológicos indiretos do  $\cdot\text{NO}$  mediados pelo  $\text{N}_2\text{O}_3$  e o quadro 3, os principais efeitos biológicos indiretos do  $\cdot\text{NO}$  mediados pelo  $\text{ONOO}^-$ .

| <i>ALVO</i>               | <i>MECANISMO</i>   |  | <i>EFEITO BIOLÓGICO</i>   |
|---------------------------|--|--|---|
| GC                        | Ativação através da interação com o heme, induzindo o deslocamento da sGC para a membrana plasmática   |  | Relaxamento do músculo liso, inibição da agregação plaquetária, inibição da adesão de leucócitos ao endotélio, transdução de sinais no sistema nervoso (NATHAN; XIE, 1994)                |
| COX                       | Ativação através da oxidação do heme à forma Fe <sup>3+</sup> .  |  | Modulação da resposta inflamatória (SALVEMINI, 1997).   |
|                           | Em altas concentrações, o <sup>•</sup> NO forma aductos nitrosilados estáveis com o Fe <sup>3+</sup> , resultando em inibição.   |  |   |
|                           | Baixas concentrações de <sup>•</sup> NO diminuem o “Scavenging” de O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> ; O excesso de O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> aumenta a redução do heme à forma Fe <sup>2+</sup> , resultando em inibição. |  |   |
| Cit-P450                  | Inibição através da competição com o O <sub>2</sub> pela ligação ao heme.  |  | Interferência no metabolismo de hormônios esteroidais e de eicosanóides (TAKEMURA et al., 1999). Inibição da síntese do 20-HETE, um potente vasoconstritor (ALONSO-GALICIA et al., 1997). |
| NOS                       | Inibição através da competição com o O <sub>2</sub> pela ligação ao heme.  |  | Regulação da atividade de NOS através de “feedback” negativo (ALDERTON; COOPER; KNOWLES, 2001).   |
| Catalase                  | Inibição através da formação de aductos nitrosilados de Fe <sup>3+</sup>   |  | Diminuição do consumo de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , favorecendo a atividade antimicrobiana e tumoricida de macrófagos ativados (FARIAS-EISNER et al., 1996).                         |
| Citocromo oxidase         | Inibição através da formação de aductos nitrosilados de Fe <sup>2+</sup> , impedindo a ligação do O <sub>2</sub> ao heme   |  | Regulação do consumo de O <sub>2</sub> e da fosforilação oxidativa na mitocôndria (BROOKES, 2004).  |
| Hemoglobina               | Reação com a deoxi-hemoglobina, formando hemoglobina nitrosilada.  | Favorecimento da liberação do O <sub>2</sub> pela hemoglobina; | Aumento da oxigenação de tecidos e órgãos (KOSAKA, 1999).   |
|                           |  | “Estoque” de <sup>•</sup> NO circulante.                       | Transporte de <sup>•</sup> NO ligado à hemoglobina até locais distantes do sítio de formação; Manutenção da concentração fisiológica de <sup>•</sup> NO (DEJAM et al., 2004).             |
|                           | Reação com a oxí-hemoglobina, formando metemoglobina e NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>  |  | Catabolismo do <sup>•</sup> NO (GROSS; LANE, 1999).   |
| Ribo-nucleotídeo redutase | Inibição da síntese de DNA através da ligação do <sup>•</sup> NO ao complexo proteína-tirosil presente na enzima.  |  | Citotoxicidade contra patógenos e células tumorais (LEPOIVRE et al., 1994).   |
| Aconitase mitocondrial    | Inibição através da nitrosilação do centro ferro-enxofre.  |  | Diminuição da respiração mitocondrial (GARDNER et al., 1997).   |
| Aconitase citoplasmática  | Inibição através da nitrosilação do centro ferro-enxofre.  |  | Diminuição da síntese de ferritina; Aumento da síntese do receptor de transferrina (HENTZE; KUHN, 1996).  |

COX: ciclooxigenase; Cit-P450: citocromo-P450; GC: guanilato ciclase; sGC: guanilato ciclase solúvel; 20-HETE: ácido 20-hidroxi-eicosatetraenóico.

### Quadro 1 – Efeitos biológicos diretos do <sup>•</sup>NO

| <i>ALVO</i>  | <i>MECANISMO</i>  | <i>EFEITO BIOLÓGICO</i>  |
|--|---|--|
| Receptor neuronal NMDA                                   | Inibição do sítio modulatório redox através de S-nitrosilação, provocando a dessensibilização do receptor.  | Neuroproteção (LEI et al., 1992; LIPTON et al., 1998).   |
| Receptor de glicocorticóide                              | S-nitrosilação do receptor, inibindo a ligação do fármaco.  | Diminuição dos efeitos anti-inflamatórios dos esteróides (GALIGNIANA; PIWIEN-PILIPUK; ASSREUY, 1999).  |
| Receptor rianodina                                       | Ativação através de Poli-S-nitrosilação, levando à liberação de Ca <sup>2+</sup> do retículo sarcoplasmático.   | Controle da contração do músculo estriado (XU et al., 1998).   |
| Canais de K <sup>+</sup> dependentes de Ca <sup>2+</sup> | Ativação através de S-nitrosilação.   | Vasodilatação (BOLOTINA et al., 1994).   |
| GAPDH  | Inibição através de S-nitrosilação.   | Inibição da glicólise (MOHR et al., 1999).   |
| CK   | Inibição através de S-nitrosilação.   | Diminuição da síntese anaeróbia de ATP (KAASIK et al., 1999).  |
| Álcool desidrogenase                                     | Inibição através da S-nitrosilação.   | Diminuição do metabolismo do álcool (GERGEL; CEDERBAUM, 1996).   |
| Ornitina descarboxilase                                  | Inibição através da S-nitrosilação.   | Diminuição da síntese de poliaminas; restrição da proliferação celular (BAUER et al., 1999).   |
| $\gamma$ -glutamil-cisteína sintetase                    | Inibição através de S-nitrosilação.   | Diminuição da síntese de GSH, alteração do estado redox (LIAUDET; SORIANO; SZABO, 2000).   |
| Proteína cinase C  | Regulação da cascata de sinalização dependente da proteína cinase C através de S-nitrosilação.  | Crescimento e proliferação de células indiferenciadas (TOKER, 1998); Angiogênese (SHIZUKUDA et al., 1999).   |
| Proteína G   | Regulação da sinalização dependente de proteínas G através de S-nitrosilação.   | Modulação sináptica (HESS et al., 1994), regulação da frequência cardíaca (JUMRUSSIRIKUL et al., 1998).  |
| NF- $\kappa$ B   | Estabilização do inibidor I $\kappa$ B $\alpha$ através de S-nitrosilação. Inibição da atividade do NF- $\kappa$ B de ligação ao DNA, via S-nitrosilação da subunidade p50. | Inibição da cascata inflamatória, em decorrência da baixa expressão de citocinas e moléculas de adesão (SHIN <i>et al.</i> , 1996; SPIECKER et al., 1998). |
| Albumina   | Formação de aductos S-nitrosilados estáveis de albumina.  | Transporte e estoque de <sup>•</sup> NO (STAMLER et al., 1992).  |
| Aminas   | Formação de N-nitrosaminas.   | Indução de carcinogênese (HECHT, 1997).  |

CK: creatina cinase; DNA: ácido desoxi-ribonucleico; GAPDH: gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase; GSH: glutationa reduzida; NMDA: N-metil-D-aspartato; NF- $\kappa$ B: fator nuclear  $\kappa$ B.

## Quadro 2 – Efeitos biológicos indiretos do <sup>•</sup>NO mediados pelo N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

| <i>ALVO</i>   | <i>MECANISMO</i>   | <i>EFEITO BIOLÓGICO</i>   |
|---------------|--|---|
| DNA           | Reação oxidativa provocando a quebra da fita de DNA.   | Ativação de PARS, mutagênese, apoptose (SZABO, 1997).   |
| Tiol          | Oxidação de GSH.   | Diminuição do estado antioxidante (MARSHALL et al., 1999).  |
| Lipídios      | Peroxidação lipídica.  | Lesões de membrana, desmielinização, oxidação de LDL (RADI et al., 1991).   |
| Mitocôndria   | Inibição da aconitase, dos complexos I, II e V através de reações de oxidação.   | Inibição da respiração celular, lesão de membrana, abertura do PTP, liberação do citocromo c, apoptose (BROWN, 1999). |
| MnSOD         | Inibição através de reações de nitração.   | Dismutação de O <sub>2</sub> <sup>-</sup> diminuída (MACMILLAN-CROW et al., 1996).                                    |
| Citoesqueleto | Alteração estrutural através de reações de nitração.   | Desorganização da arquitetura celular (CROW et al., 1997).  |
| ND            | Aumento de Bcl2, diminuição da ativação de caspases, inibição da liberação de citocromo c.   | Efeitos anti-apoptóticos (HOWLETT et al., 1999).  |
| ND            | Aumento de p53 (MESSMER; BRUNE, 1996), ativação de caspases (YABUKI et al., 1997), diminuição de Bcl2, aumento de Bax (KOGLIN et al., 1999). | Efeitos pró-apoptóticos   |

DNA: ácido desoxi-ribonucleico; GSH: glutatona reduzida; LDL: lipoproteína de baixa densidade; ND: não determinado; PARS: poli-ADP-ribose sintetase; PTP: poro de transição de permeabilidade; SOD: superóxido dismutase.

### **Quadro 3 – Efeitos biológicos indiretos do <sup>•</sup>NO mediados pelo ONOO<sup>-</sup>**

## **1.2 LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO: ASPECTOS GERAIS**

Alterações patológicas complexas ocorrem em diferentes sistemas celulares durante a isquemia. Há depleção progressiva de adenosina trifosfato (ATP), aumento na taxa de glicólise, acúmulo de lactato, diminuição do pH intracelular, ativação de enzimas intracelulares e edema tecidual. Com o tempo, estas alterações progridem em intensidade, finalmente atingindo componentes estruturais e bioquímicos vitais, resultando em morte celular (REIMER; JENNINGS; TATUM, 1983). Até certo ponto, contudo, por um período de tempo que varia entre os diferentes tipos celulares, a lesão é passível de reparo se o O<sub>2</sub> e os substratos metabólicos forem restaurados. Com a extensão do tempo de isquemia, a estrutura celular continua a deteriorar-se em virtude da progressão inexorável dos mecanismos de lesão ativos, até que a maquinaria energética seja comprometida de tal forma que a reperfusão não

consiga resgatar a célula lesada. Trata-se, portanto, de uma lesão isquêmica irreversível (BARIE; MULLINS, 1988).

Embora o restabelecimento do fluxo sanguíneo seja essencial para a sobrevivência de tecidos isquêmicos, nas células irreversivelmente lesadas, paradoxalmente, a reperfusão desencadeia uma série de eventos provocando lesões adicionais (CORMIER; LEGRAIN, 1962; HEARSE et al., 1975). Este fenômeno tem sido denominado de lesão por isquemia-reperfusão (LIR) (ANAYA-PRADO et al., 2002; KHANNA; COWLED; FITRIDGE, 2005).

A LIR pode ocorrer em inúmeros órgãos, incluindo coração, pulmões, cérebro, rins e músculo esquelético. Com o início da reperfusão, tanto lesão localizada como sistêmica podem estar presentes. Assim como em outras respostas inflamatórias agudas, as interações moleculares presentes na LIR são complexas e dependem de múltiplos fatores. Se a isquemia for suficientemente pronunciada, afetando grande extensão do órgão, a reperfusão subsequente induzirá efeitos sistêmicos comprometendo órgãos distantes, podendo causar falência múltipla e morte (KHANNA; COWLED; FITRIDGE, 2005).

A tolerância à isquemia depende de múltiplos fatores, variando de acordo com o órgão envolvido, as necessidades metabólicas específicas, a circulação colateral e os fatores humorais locais (PERRY, 1988). De acordo com Steinau (1988), o músculo esquelético parece ser mais susceptível à isquemia quando comparado a outros órgãos (Tabela 1). Enquanto nos nervos, no tecido adiposo, na pele e nos ossos as alterações teciduais permanecem reversíveis até, respectivamente, 8, 13, 24 e 96 horas, no músculo esquelético o tempo de tolerância à lesão isquêmica não supera 4 horas.

**Tabela 1** – Tempo de tolerância à isquemia em diferentes tecidos

| Tecido              | Tempo de tolerância (h) |
|---------------------|-------------------------|
| Músculo esquelético | 4                       |
| Nervos              | 8                       |
| Tecido adiposo      | 13                      |
| Pele                | 24                      |
| Ossos               | 96                      |

Fonte: Steinau (1988).

Diversos mecanismos foram propostos para explicar a LIR do músculo esquelético, tais como a geração de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ERO) ou de nitrogênio (ERN), a peroxidação lipídica (ZIMIANI et al., 2005), o fenômeno de não

reperusão (MOORE; CAINE, 2000), o depósito de componentes do sistema complemento (WONG et al., 1999) e o influxo de leucócitos polimorfonucleares (VINTEN-JOHANSEN, 2004).

A lesão oxidativa de biomoléculas por radicais livres, ERO e ERN possui grande relevância na patogênese da LIR. Segundo Zimiani et al. (2005), a peroxidação lipídica representa um dos mais significativos processos que precedem a degeneração celular e necrose.

O principal radical livre envolvido é, certamente, o  $O_2^{\cdot-}$ . Todas as células são capazes de gerar  $O_2^{\cdot-}$  em baixas concentrações, sendo a principal fonte a cadeia respiratória mitocondrial (SCHACHTER; FOULDS, 1999). Durante a LIR, o aumento da produção de  $O_2^{\cdot-}$  e de outras ERO pode ser mediado, ainda, pelas enzimas XO (ANAYA-PRADO et al., 2002), NOS (PORASUPHATANA; TSAI; ROSEN, 2003; NANOBASHVILI et al., 2004), citocromo P450 monooxigenases (GOTTLIEB, 2003), pelo metabolismo do ácido araquidônico (GOTTLIEB, 2003; VINTEN-JOHANSEN, 2004) e pelo metabolismo oxidativo de neutrófilos (JORDAN; ZHAO; VINTEN-JOHANSEN, 1999; MOORE; CAINE, 2000; VINTEN-JOHANSEN, 2004).

O  $O_2^{\cdot-}$  produzido pelo endotélio pós-isquêmico, isolado ou associado a outros fatores, provoca relevantes alterações endoteliais e, indiretamente, pode ser responsável pela produção de radical hidroxil ( $\cdot OH$ ), um radical livre mais potente que o  $H_2O_2$  capaz de lesar uma ampla variedade de biomoléculas, incluindo proteínas, lipídios e ácidos nucleicos. Sob condições fisiológicas, os efeitos nocivos do  $O_2^{\cdot-}$  são prevenidos pela enzima superóxido dismutase (SOD), que converte  $O_2^{\cdot-}$  em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), uma ERO menos reativa. O  $H_2O_2$ , por sua vez, é degradado a  $O_2$  e água ( $H_2O$ ) pela ação da enzima catalase. Desta forma, a homeostase celular é mantida através de um rigoroso balanço entre radicais livres / ERO / ERN produzidos fisiologicamente e defesas antioxidantes. Contudo, durante a reperusão de tecidos previamente isquêmicos, estas defesas antioxidantes naturais podem ser superadas com a conseqüente formação de  $\cdot OH$  a partir de  $H_2O_2$  (ANAYA-PRADO et al., 2002).

O termo ERN refere-se aos estados de oxidação e aductos de  $\cdot NO$ , incluindo o ânion nitroxil ( $NO^-$ ) e o cátion nitroxil ( $NO^+$ ), e seus aductos como dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ), nitrito ( $NO_2^-$ ), nitrato ( $NO_3^-$ ), trióxido de dinitrogênio ( $N_2O_3$ ), tetróxido de dinitrogênio ( $N_2O_4$ ), S-nitrosotióis,  $ONOO^-$  e complexos nitrosil-metais (STAMLER, 1994; GRISHAM; JOURD'HEULL; WINK, 1999).

Durante a isquemia, existe aumento substancial na produção de  $O_2^{\cdot-}$  a partir de eNOS decorrente da depleção tecidual de L-arginina e  $BH_4$  (HUK et al., 1998) e aumento, no tecido isquêmico, da degradação de ATP a hipoxantina e xantina. Estes metabólitos purínicos são convertidos a urato e  $O_2^{\cdot-}$  através de uma reação catalisada pela XO. Desta forma, o  $O_2^{\cdot-}$  é produzido em grande quantidade, reagindo com o  $\cdot NO$  disponível formando  $ONOO^-$ , um agente altamente lipoperoxidante. O  $ONOO^-$  pode, ainda, ser protonado formando o ácido peroxinitroso ( $HOONO$ ). A dissociação deste ácido, por sua vez, gera espécies altamente citotóxicas como o radical nitrito ( $\cdot NO_2$ ) e  $\cdot OH$ , que podem propagar lesão tecidual levando à apoptose ou necrose (HUK; NANOBASHVILI; ORLJANSKI, 1998).

Tem sido proposto que a reação entre o  $\cdot NO$  e o  $O_2^{\cdot-}$  reduz a concentração basal de  $\cdot NO$ , impedindo seus efeitos fisiológicos. O  $\cdot NO$  é um dos mediadores responsáveis pela homeostase vascular, apresentando funções como vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, atenuação da aderência de leucócitos ao endotélio e inibição da proliferação celular do músculo liso. Desta forma, a atenuação destes efeitos pela diminuição de  $\cdot NO$  pode estar relacionada com o fenômeno de não reperfusão observado na LIR (ANAYA-PRADO et al., 2002; KHANNA; COWLED; FITRIDGE, 2005).

De acordo com Moore e Caine (2000), a não reperfusão representa um ciclo vicioso no qual a lesão isquêmica inicial gera mais isquemia. Durante a isquemia, ocorrem alterações vasculares incluindo hemoconcentração, agregação plaquetária, edema de células endoteliais e ativação de leucócitos polimorfonucleares, resultando em oclusão vascular (ANAYA-PRADO et al., 2002; VINTEN-JOHANSEN, 2004). As propriedades hematológicas de leucócitos polimorfonucleares ativos estão envolvidas neste processo, principalmente por sofrerem menor deformação celular em relação aos eritrócitos (MOORE; CAINE, 2000) e pelo aumento de moléculas de adesão ao endotélio (JORDAN; ZHAO; VINTEN-JOHANSEN, 1999; VINTEN-JOHANSEN, 2004). Conseqüentemente, os leucócitos polimorfonucleares, predominantemente neutrófilos, contribuem para a formação de êmbolos, provocando resistência microvascular, edema celular e intersticial e aumento da pressão tecidual extravascular (MOORE; CAINE, 2000; BLAISDELL, 2002).

A relação entre ERO, baixas concentrações de  $\cdot NO$  e ativação de leucócitos observada na LIR é bem documentada em literatura. Embora os mecanismos bioquímicos envolvidos neste processo não sejam totalmente compreendidos, existem evidências que sugerem os efeitos modulatórios do  $\cdot NO$  (LANDER et al., 1993) e das ERO (FLALKOW; CHAN; GRINSTEIN, 1993) sobre fatores de transcrição, tal como o fator de transcrição nuclear  $\kappa B$  (NF- $\kappa B$ ). De acordo com Barnes et al. (1997) e Blackwell e Christman (1997), o



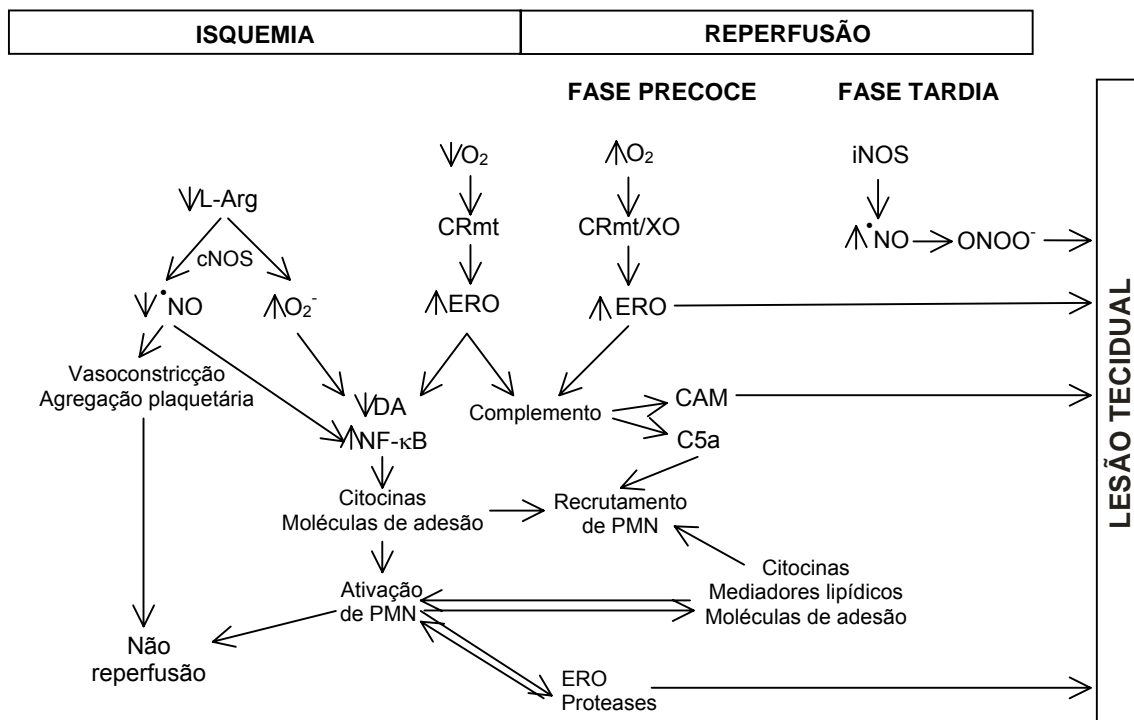
NF- $\kappa$ B regula a expressão de inúmeros genes envolvidos no processo inflamatório presente na LIR. Este fator nuclear induz a rápida expressão dos fatores de necrose tumoral (TNF)  $\alpha$  e  $\beta$  diversas interleucinas (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-11, IL-12, IL-17), quimiocinas (IL-8, proteína inflamatória de macrófagos 1 - MIP-1, proteína quimioatratadora de macrófagos 1 - MCP-1, citocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais - RANTES), enzimas (iNOS, Ciclooxigenase 2 - COX2) e moléculas de adesão (molécula de adesão intercelular 1 - ICAM-1, molécula de adesão de célula vascular 1 - VCAM-1, E-selectina, P-selectina). Sendo assim, a diminuição da concentração de  $\cdot$ NO através de reações com ERO produzidas na LIR desencadeia uma série de eventos, incluindo a ativação de NF- $\kappa$ B resultando em lesão e disfunção celulares mediadas por neutrófilos (ANAYA-PRADO et al., 2002).

Segundo Vinten-Johansen (2004), um dos mecanismos de lesão celular mediada por neutrófilos é a liberação de ERO. Neutrófilos ativados por citocinas pró-inflamatórias geram  $O_2^{\cdot-}$  através de uma reação catalisada pela enzima NADPH oxidase. No neutrófilo, a SOD catalisa a dismutação do  $O_2^{\cdot-}$  em  $H_2O_2$ , a partir do qual podem ser gerados, ainda,  $\cdot$ OH e ácido hipocloroso. O  $\cdot$ OH é produzido através de uma reação que requer  $Fe^{2+}$ , também conhecida como reação de Haber-Weiss. O ácido hipocloroso, por outro lado, é gerado a partir de uma reação catalisada pela mieloperoxidase e, a partir deste ácido podem ser formados derivados altamente tóxicos, as cloroaminas. Outros mecanismos de citotoxicidade mediada por neutrófilos são a liberação de proteases, o fenômeno de não reperfusão e a liberação de metabólitos do ácido araquidônico, assim como de outros mediadores pró-inflamatórios, amplificando a ação deletéria de neutrófilos.

Além disso, a expressão de iNOS induzida por citocinas pró-inflamatórias em células como neutrófilos e macrófagos resulta em produção aumentada de  $\cdot$ NO, contribuindo conseqüentemente para a amplificação das lesões celulares, provavelmente mediadas pelo  $ONOO^{\cdot-}$  (ANAYA-PRADO et al., 2002; KHANNA; COWLED; FITRIDGE, 2005; ZIMIANI et al., 2005).

Por outro lado, existem estudos demonstrando o envolvimento da ativação do sistema complemento na LIR (WONG et al., 1999; MOORE; CAINE, 2000), possivelmente iniciada pela ação de ERO (VINTEN-JOHANSEN, 2004). Alguns mecanismos propostos são: 1) função de mediador pró-inflamatório da fração C5a, promovendo a ativação e a migração de neutrófilos; 2) formação do complexo de ataque à membrana (CAM - C5-9), que forma poros nas membranas, induzindo lise celular.

Conforme o exposto, a patogênese da LIR é multifatorial, estando clara a participação de radicais livres, ERO e ERN no processo de lesão, disfunção e morte celulares. Embora não exista consenso quanto à natureza do envolvimento do  $\text{NO}$  na LIR, se citoprotetora ou citotóxica, existem inúmeras evidências de que alterações na concentração de  $\text{NO}$  influenciam o desenvolvimento da LIR. Os principais mecanismos patogênicos da LIR estão esquematizados na figura 2.



**Figura 2** – Mecanismos de lesão tecidual na Isquemia-Reperfusão. L-Arg: L-arginina; CRmt: Cadeia respiratória mitocondrial; CAM: Complexo de ataque à membrana; C5a: fração a de C5, proteína do sistema complemento; DA: Defesas antioxidantes; ERO: Espécies reativas de oxigênio; cNOS: isoforma constitutiva da óxido nítrico sintase; iNOS: isoforma indutível da óxido nítrico sintase;  $\text{NO}$ : óxido nítrico;  $\text{ONOO}^{\bullet}$ : peroxinitrito;  $\text{O}_2^{\bullet-}$ : ânion radical superóxido; PMN: Leucócitos polimorfonucleares; XO: Xantina oxidase.

### 1.3 LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO: IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Em virtude do contínuo avanço e da sofisticação de técnicas médico-cirúrgicas, possibilitando a complexa manipulação de artérias específicas, parcela crescente da população tem sido acometida pela LIR (MOORE; CAINE, 2000). Esta condição patológica pode ocorrer durante a intervenção em doenças obstrutivas, tais como infarto do

miocárdio e trombose. Pode, ainda, ser uma complicação freqüente de transplantes de órgãos ou de procedimentos para reconstrução de tecidos após traumatismos graves (ÖHLIN; PAVLIDIS; ÖHLIN, 1998; HIRANO et al., 2006; BAXTER et al., 2007; FOLEY; CHARI, 2007).

A fisiopatologia da isquemia aguda seguida por reperfusão tem desenvolvido um interesse crescente e um desafio ao cirurgião vascular. Embora as alterações que ocorrem nos tecidos após a interrupção do fluxo de sangue sejam em boa parte conhecidas, existem controvérsias quanto aos mecanismos implicados na lesão celular após a reperfusão dos tecidos isquêmicos (COSTA, 1991), principalmente no músculo esquelético (SARDINHA, 1994).

A musculatura esquelética compreende 75% da massa dos membros inferiores e representa cerca de 80% do tecido metabolicamente ativo (O'DONNELL et al., 1977), assumindo fundamental importância nas oclusões arteriais dos membros (HAIMOVICI, 1979).

Diversos autores têm relatado complicações após o restabelecimento do fluxo sanguíneo de membros com isquemia aguda, incluindo acidose metabólica, hiperpotassemia, insuficiência renal aguda, mioglobínúria, retrombose, comprometimento da função motora, perda de membros e depressão miocárdica (WINNINGER, 1969; HAIMOVICI, 1973; BUCHBINDER et al., 1981; SHLAFER et al., 1982; HOLLIER, 1983). As alterações metabólicas, segundo Larcan et al. (1973), estão associadas a elevados índices de mortalidade.

Alterações decorrentes da reperfusão também podem ser observadas em procedimentos de transferência de tecido vascularizado para a reconstrução de órgãos ou tecidos afetados por lesões graves. Considerando o músculo esquelético em particular, este procedimento tem sido utilizado em casos de perda de tecido em decorrência de ressecção de tumores, osteomielite e traumatismos (KRIMMER; HAHN; LANZ, 1995).

O músculo *latissimus dorsi* é um dos tecidos mais versáteis para o procedimento de retalho miocutâneo utilizado na cirurgia plástica reconstrutiva. Embora a reconstrução da parede mamária pós-mastectomia seja o uso mais comum deste músculo, ele também é utilizado efetivamente na correção de defeitos miocutâneos de pescoço e cabeça (BARTON JUNIOR; SPICER; BYRD, 1983).

A transferência de tecido com inervação motora para a reconstrução de elementos contráteis de membros com extensa perda de musculatura ou com paralisia do plexo braquial menor constitui, também, um procedimento bem aceito. Nestas situações não

somente a sobrevivência, mas também a preservação da função contrátil do músculo transplantado é esperada (IKEBE et al., 2001). Entretanto, o resultado do transplante é imprevisível. Uma variedade de fatores pode ser responsável pelo fracasso do transplante, incluindo edema intracelular, lesão do endotélio, trombose, comprometimento da drenagem venosa, o chamado fenômeno de não reperfusão, ou seja, eventos que caracterizam a LIR.

Diversas estratégias terapêuticas têm sido desenvolvidas com a finalidade de prevenir ou amenizar os efeitos da LIR. Estudos neste sentido baseiam-se na inibição ou interferência em pontos críticos da patogênese da LIR, como a síntese de  $\text{NO}$ , a geração de ERO, a ativação da cascata do complemento, a ativação e a migração de neutrófilos.

Outro recurso que tem sido explorado é o pré-condicionamento isquêmico (PCI), que consiste na aplicação de breves períodos de isquemia sucedidos por reperfusão. Foi relatado que este procedimento, quando repetido por número variável de vezes, aumenta a tolerância do tecido às alterações decorrentes de isquemia prolongada (MURRY; JENNINGS; REIMER, 1986; GÜRKE et al., 1996). Tem sido discutido o envolvimento da modulação das defesas antioxidantes, da síntese de  $\text{NO}$  e da reserva de fosfatos ricos em energia no processo de citoproteção mediada pelo PCI.

Entretanto, mais estudos sobre os efeitos destas terapias são necessários. Até o presente momento, antiinflamatórios convencionais têm sido utilizados na supressão da inflamação com resultados satisfatórios, inclusive atenuando alguns dos mecanismos da LIR (JORDAN; ZHAO; VINTEN-JOHANSEN, 1999).

#### **1.4 $\text{NO}$ E LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO: MÉTODOS DE ANÁLISE**

Intensa investigação sobre o envolvimento do  $\text{NO}$  na LIR do músculo esquelético tem sido realizada há tempos. Entretanto, ainda não existe consenso quanto às ações do  $\text{NO}$  durante o desenvolvimento da LIR, visto que em literatura há inúmeros relatos atribuindo ao  $\text{NO}$  tanto efeitos citotóxicos quanto citoprotetores (BLEBEA et al., 1996; KNIGHT et al., 1997; WANG et al., 1997; ZHANG et al., 1997; CORDEIRO; SANTAMARIA; HU, 1998; HUK; NANOBASHVILI; ORLJANSKI, 1998; LIU et al., 1998; JONESCHILD et al., 1999; LEFER et al., 1999; MESSINA et al., 2000; BARKER et al., 2001; IKEBE et al., 2001; NAKAMURA; YOKOYAMA; ITOMAN, 2001; HALLSTROM et

al., 2002; IKEBE et al., 2002; OZAKI et al., 2002; NANOBASHVILI et al., 2004; ZIMIANI et al., 2005).

Para o estudo dos efeitos do  $\cdot\text{NO}$  na LIR têm sido utilizados, freqüentemente, métodos indiretos em virtude da elevada instabilidade do  $\cdot\text{NO}$  sob tensões fisiológicas de  $\text{O}_2$ . São exemplos, o uso de inibidores de NOS, L-arginina, doadores de  $\cdot\text{NO}$ , animais transgênicos, análise da expressão de isoformas de NOS e a quantificação de metemoglobina ou de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  pela reação de Griess. Contudo, estes ensaios fornecem evidências limitadas e, por vezes, requerem interpretações complexas (KHANNA; COWLED; FITRIDGE, 2005).

A inibição enzimática da síntese de  $\cdot\text{NO}$  tem sido pouco estudada sob condições fisiológicas. Desta forma, ainda não se sabe qual o impacto destas medidas sobre a cinética do  $\cdot\text{NO}$ , nem os seus efeitos sistêmicos (KHANNA; COWLED; FITRIDGE, 2005). Em estudo realizado por Wang et al. (2001) foi relatado que a inibição crônica da NOS pelo LNAME provocou progressiva e severa redução de massa muscular e de velocidade de locomoção em ratos, sugerindo a importância do  $\cdot\text{NO}$  para a função muscular.

Mesmo os modelos transgênicos podem gerar resultados duvidosos devido aos possíveis mecanismos compensatórios. Em estudo realizado por Kanno et al. (2000), foi observado que camundongos transgênicos deficientes de eNOS ou nNOS apresentavam expressão aumentada de iNOS, possivelmente para suprir a deficiência das isoformas constitutivas.

Outra ferramenta de análise indireta é a suplementação com L-arginina, substrato a partir do qual o  $\cdot\text{NO}$  é sintetizado através de uma reação catalisada pela NOS. Entretanto, em estudo realizado por Messina et al. (2000), foi observada diminuição da expressão de eNOS durante o desenvolvimento da LIR, tornando-se indetectável na fase tardia de reperfusão. Além disso, há relatos de que na LIR ocorre síntese de  $\cdot\text{NO}$  independente de NOS. Foi demonstrado que a redução de  $\text{NO}_2^-$  a  $\cdot\text{NO}$  aumenta 100 vezes sob baixo pH, condição encontrada em tecidos isquêmicos. Além do pH ácido, foi observado que os tecidos isquêmicos contêm equivalentes redutores não-enzimáticos que reduzem  $\text{NO}_2^-$ , aumentando a produção de  $\cdot\text{NO}$  de 40 a 4000 vezes em relação ao valor máximo gerado pela NOS fisiologicamente (SAMOUILOV; KUPPUSAMY; ZWEIER, 1998). Além disso, Lepore et al. (1999), usando um modelo de LIR em músculo esquelético de ratos, evidenciaram redução de pH e geração de  $\cdot\text{NO}$  insensível aos inibidores de NOS LNAME e S-metilisotiouréia.

A análise da expressão das diferentes isoformas de NOS também é bastante utilizada para a investigação do papel do  $\cdot\text{NO}$  na LIR. Técnicas imuno-histoquímicas utilizando anticorpos policlonais anti-NOS e NADPH diaforase, assim como a RT-PCR, têm sido exploradas no estudo da expressão de NOS, sob condições fisiológicas e fisiopatológicas, em músculo esquelético de roedores (WANG et al., 2001; GUNJI et al., 2003; ZIMIANI et al., 2005) e humanos (FRANDSEN; LOPEZ-FIGUEROA; HELLSTEN, 1996).

Outra forma de estimar a síntese de  $\cdot\text{NO}$  é o doseamento de seus produtos de degradação,  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$ , através da reação de Griess. Esta reação consiste em uma seqüência de reações envolvendo  $\text{NO}_2^-$ , sulfanilamida e N-(1-naftil)-etilenodiamina, através das quais é formado um composto que pode ser detectado espectrofotometricamente a 540 nm. Uma vez que o  $\text{NO}_2^-$  é susceptível à oxidação a  $\text{NO}_3^-$ , a sensibilidade deste método pode ser aumentada com o uso de agentes redutores, tais como vanádio (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001) e cádmio (PETSUL; GREENWAY; HASWELL, 2001; SASTRY et al., 2002; DZIEDZIC et al., 2003) ou de enzimas redutases (DZIEDZIC et al., 2003). Porém, este ensaio é considerado pouco específico para o  $\cdot\text{NO}$ . Greenberg et al. (1995) evidenciaram que nitrocompostos análogos de L-arginina, tais como LNAME, AG e LNNA, interferem em ensaios de Griess. Por outro lado, o  $\text{NO}_2^-$  é um freqüente contaminante encontrado na água, além de ser um produto do metabolismo de certas bactérias (ARCHER et al., 1995).

A reação entre  $\cdot\text{NO}$  e oxi-hemoglobina, formando metemoglobina e  $\text{NO}_3^-$ , também é explorada para estimar a síntese de  $\cdot\text{NO}$ . Entretanto, tem sido considerado um método pouco sensível (KIKUCHI et al., 1993).

Diante das limitações apresentadas, o emprego de técnicas de análise direta contribuiria para a elucidação do envolvimento do  $\cdot\text{NO}$  na LIR. Alguns estudos têm utilizado métodos diretos, como sensores porfirínicos (HALLSTROM et al., 2002; NANOBASHVILI et al., 2004) e ressonância paramagnética eletrônica (KOSAKA, 1999; LEPORE et al., 1999).

A detecção eletroquímica através de sensores porfirínicos permite a avaliação direta de  $\cdot\text{NO}$  em sistemas biológicos (KHANNA; COWLED; FITRIDGE, 2005). Geralmente, estes sensores são posicionados nas paredes de artérias. Este método é altamente sensível, porém, é incapaz de detectar  $\cdot\text{NO}$  em raios superiores a 50  $\mu\text{m}$  (BROVKOVYCH et al., 1999).

A ressonância paramagnética eletrônica é considerada uma técnica altamente específica capaz de quantificar radicais livres e espécies reativas que contenham elétrons desemparelhados (FOSSEY; LEFORT; SORBA, 1995). Entretanto, apresenta baixa sensibilidade. A determinação de  $\cdot\text{NO}$  por ressonância paramagnética eletrônica consiste na

reação com a deoxi-hemoglobina, formando um composto que contém um elétron desemparelhado, a hemoglobina nitrosilada (KOSAKA, 1999).

Procedimentos analíticos baseados em medidas de quimiluminescência caracterizam-se por apresentar alta sensibilidade e ampla faixa de resposta linear (LEITE; FATIBELLO FILHO; ROCHA, 2004).

Luminescência é um termo empregado para descrever a emissão de radiação quando uma molécula ou átomo no estado excitado decai para o seu estado fundamental (DODEIGNE; THUNUS; LEJEUNE, 2000). Os vários tipos de luminescência são caracterizados em função da fonte de energia empregada para se obter o estado excitado. Na quimiluminescência, a energia de excitação é proporcionada por uma reação química, sendo a emissão de radiação observada geralmente nas regiões do visível ou próximo do infravermelho (SCHROEDER; YEAGER, 1978; MERENYI; LIND; ERIKSEN, 1990).

Há aproximadamente duas décadas, a quimiluminescência gerada pela oxidação do luminol tem sido explorada para o estudo de radicais livres e espécies reativas (BRESTEL, 1985; RADI; RUBBO e PRODANOV, 1989), incluindo o ONOO<sup>-</sup> (WANG et al., 1991; RADI et al., 1993).

Uma técnica altamente sensível e específica para a detecção de <sup>•</sup>NO foi desenvolvida por Kikuchi et al. (1993), baseada na quimiluminescência dependente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-luminol.

No presente estudo, adaptamos a técnica originalmente descrita por Kikuchi et al. (1993) para a análise de <sup>•</sup>NO em homogenatos de músculo estriado esquelético de animais submetidos à LIR ou à caquexia.

## **1.5 •NO E LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO: ESTUDOS EXPERIMENTAIS**

Inúmeros estudos relatando a participação do <sup>•</sup>NO na LIR do músculo esquelético têm sido revisados e discutidos nos últimos anos (JORDAN; ZHAO; VINTEN-JOHANSEN, 1999; LEPORE et al., 2000; MOORE; CAINE, 2000; ANAYA- PRADO et al., 2002; BLAISDELL, 2002; KHANNA; COWLED; FITRIDGE, 2005).

Diferentes protocolos experimentais de isquemia-reperfusão, espécies de animais e métodos de análise têm sido utilizados para a investigação do papel do <sup>•</sup>NO na LIR. Entretanto, ainda existem controvérsias quanto à natureza deste envolvimento, se protetora ou

deletéria (BLEBEA et al., 1996; KNIGHT et al., 1997; WANG et al., 1997; ZHANG et al., 1997; CORDEIRO; SANTAMARIA; HU, 1998; HUK; NANOBASHVILI; ORLJANSKI, 1998; LIU et al., 1998; JONESCHILD et al., 1999; LEFER et al., 1999; MESSINA et al., 2000; BARKER et al., 2001; IKEBE et al., 2001; NAKAMURA; YOKOYAMA; ITOMAN, 2001; HALLSTROM et al., 2002; IKEBE et al., 2002; OZAKI et al., 2002; NANOBASHVILI et al., 2004; ZIMIANI et al., 2005).

Diversos estudos têm sugerido que o  $\text{NO}$  apresenta efeitos anti-inflamatórios, provavelmente amenizando as alterações vasculares que ocorrem na LIR. Ozaki et al. (2002) observaram que camundongos transgênicos expressando eNOS em grande quantidade, quando submetidos a 30 min de oclusão da artéria femoral seguida por 1 ou 4 h de reperfusão, apresentavam lesão muscular menos intensa e manutenção da integridade vascular. Além disso, foi evidenciado redução da expressão de moléculas de adesão ao endotélio, diminuição da adesão neutrofílica e, conseqüentemente, diminuição da lesão tecidual.

Por outro lado, Lefer et al. (1999) constataram em camundongos deficientes de eNOS maior severidade das anormalidades vasculares, tais como a expressão aumentada de moléculas de adesão e a maior ocorrência de “rolling” de leucócitos em relação aos animais do tipo selvagem.

A suplementação de L-arginina em um modelo de LIR provocada por retalho miocutâneo em suínos diminuiu a infiltração de neutrófilos, que foi estimada segundo a atividade da mieloperoxidase, além de prevenir a necrose tecidual (CORDEIRO; SANTAMARIA; HU, 1998). Em contraste, neste mesmo modelo, a citoproteção mediada pela L-arginina foi eliminada pela administração de LNAME.

O tratamento com L-arginina reduziu o edema intersticial muscular em um modelo de isquemia (2,5 h) e reperfusão (2 h) em pata posterior de coelhos (HUK; NANOBASHVILI; ORLJANSKI, 1998). Foi relatado, ainda, em um modelo semelhante que a infusão de L-arginina a partir dos 30 min finais de isquemia reduziu o edema intersticial e a obstrução de vasos (NANOBASHVILI et al., 2004).

Resultados semelhantes foram observados com a utilização de doadores de  $\text{NO}$ . Com a administração de S-nitroso-cisteína (SNAC), houve a recuperação das funções circulatória e contrátil do músculo esquelético de ratos submetidos à isquemia (5 h) e reperfusão (1,5 h) (LIU et al., 1998). Foi relatado, ainda, que o tratamento com nitroprussiato preveniu o vasoespasmó em um modelo de isquemia (4 h) e reperfusão (2 h) em ratos (WANG et al., 1997). Foi observado em um modelo de isquemia (1,5 h) e reperfusão (3 h) em



ratos diminuição da função contrátil do músculo esquelético, que ocorreu de forma dependente da concentração de L-NMMA (JONESCHILD et al., 1999).

Foi constatada a diminuição de  $\text{NO}_2^-$  e  $\text{NO}_3^-$  no sangue venoso de coelhos durante a isquemia (6 h) e a reperfusão (1 h), sendo que esta redução foi acompanhada pelo aumento da mortalidade dos animais (BLEBEA et al., 1996).

Em modelos experimentais de isquemia (2,5 h) e reperfusão (2 h) utilizando coelhos, o  $\text{NO}$  foi detectado continuamente através de sensores porfirínicos. Foi observado aumento de  $\text{NO}$  nos primeiros minutos de isquemia, que foi seguido por progressiva redução, tornando-se inferior à concentração basal até o final da reperfusão. O tratamento com L-arginina (NANOBASHVILI et al., 2004) ou S-nitroso albumina sérica humana (HALLSTROM et al., 2002) restaurou a concentração de  $\text{NO}$ , promovendo a redução do edema e das alterações histológicas do músculo esquelético, além de melhorar o fluxo sanguíneo durante a reperfusão.

Em estudo realizado por Messina et al. (2000), foi demonstrado redução da expressão da eNOS durante a fase tardia de isquemia até longos períodos de reperfusão, tornando-se indetectável após 16 h.

Estes estudos sugerem a ação benéfica do  $\text{NO}$ , pois a redução de sua síntese provocaria uma série de alterações vasculares, incluindo aderência ao endotélio aumentada, não reperfusão e formação de edema, culminando em disfunção e morte celulares na LIR.

Entretanto, outros estudos têm relatado evidências dos efeitos citotóxicos do  $\text{NO}$  na LIR. Foi demonstrado em um modelo de isquemia (70 min) e reperfusão (24h) que camundongos deficientes de iNOS apresentam maior resistência (aumento de 30%) às alterações provocadas pela LIR. Para que estes animais apresentassem o mesmo percentual de necrose muscular dos animais do tipo selvagem (cerca de 40%), o tempo de isquemia teve de ser prolongado até 90 min (BARKER et al., 2001).

Ikebe et al. (2001) verificaram que a infusão de L-NMMA a partir do quinto minuto de isquemia até 2 horas de reperfusão melhorou a função contrátil do músculo gastrocnêmio em um modelo de isquemia (3 h) e reperfusão (24 h) em ratos. A administração simultânea de S-nitrosoglutationa, um doador de  $\text{NO}$ , inibiu os benefícios proporcionados pelo L-NMMA neste mesmo modelo, sugerindo a participação do  $\text{NO}$  na disfunção muscular observada na LIR (IKEBE et al., 2002).

Resultados semelhantes foram observados com o uso de outros inibidores de NOS. Knight et al. (1997) evidenciaram aumento da viabilidade celular no músculo gastrocnêmio de camundongos em um modelo de isquemia (1,5 h) e reperfusão (24 h) com o

uso de LNAME 30 min antes da reperfusão. No mesmo modelo, a administração de nitro-metil-L-ornitina ou metilisotioréia reduziu o grau de necrose no músculo esquelético de roedores (ZHANG et al., 1997). Foi relatado, ainda, que o uso de 3-aminometilbenzil-acetamidina, um inibidor seletivo de iNOS, reduziu o extravasamento de neutrófilos, o edema e a vasoconstrição em músculo cremáster de ratos submetidos a 5 h de isquemia e 1,5 h de reperfusão (ZHANG et al., 2003).

Além disso, foi detectado aumento de  $\text{NO}_2^-$  no sangue de coelhos em um modelo de isquemia (4 h) e reperfusão (2 h) (NAKAMURA; YOKOYAMA; ITOMAN, 2001).

Com base nestes estudos, tem sido proposta a ação deletéria do  $\cdot\text{NO}$  durante o desenvolvimento da LIR, possivelmente através da reação com o  $\text{O}_2^-$ , formando  $\text{ONOO}^-$ , um potente agente lipoperoxidante (ZIMIANI et al., 2005).

Portanto, os estudos realizados até o momento apresentam resultados conflitantes quanto à participação do  $\cdot\text{NO}$  na patogênese da LIR. Sendo assim, este estudo pretende elucidar o envolvimento do  $\cdot\text{NO}$  durante o desenvolvimento da LIR do músculo esquelético.

## **1.6 CAQUEXIA: ASPECTOS GERAIS**

A caquexia é uma manifestação freqüente em inúmeras condições clínicas, incluindo câncer, AIDS, doenças auto-imunes, falência renal, diabetes, doenças pulmonares obstrutivas e gastrintestinais crônicas, além de participar do processo fisiológico de envelhecimento (TISDALE, 2000; HASSELGREN; WRAY; MAMMEN, 2002; COSTELLI et al., 2005).

Indivíduos com caquexia apresentam intensa perda de massa corpórea, inicialmente em decorrência da anorexia (TISDALE, 2001). No entanto, esta síndrome possui etiologia complexa e multifatorial, sendo a diminuição de ingestão alimentar somente um de seus componentes (FEARON; MOSES, 2002).

Enquanto na anorexia o tecido muscular é poupado através da mobilização de triacilglicerol do tecido adiposo, na caquexia ocorre uma complexa relação de competição por nutrientes entre o tumor e o hospedeiro, caracterizada pela proteólise acelerada do músculo esquelético e pelo aumento da gliconeogênese a partir de aminoácidos,

possivelmente em favor do crescimento tumoral (YOUNES; NOGUCHI, 2000; TISDALE, 2001; ARGILÉS et al., 2005).

Alterações neuro-endócrinas, assim como a produção de uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e a liberação de fatores caquéticos pelo tumor induzem um estado hipermetabólico no hospedeiro, causando um balanço energético e nitrogenado negativo, resultando em perda funcional e de massa em diversos órgãos. Desta forma, sintomas incluindo anorexia, perda de massa corpórea e muscular, astenia e anemia surgem como reflexos destas alterações, sendo responsáveis pela redução da qualidade e expectativa de vida em indivíduos com caquexia (YOUNES; NOGUCHI, 2000; TISDALE, 2001; FEARON; MOSES, 2002; ARGILÉS et al., 2003; ARGILÉS et al., 2005).

As principais alterações metabólicas e os mediadores envolvidos na caquexia associada ao câncer são mostrados, respectivamente, nas tabelas 2 e 3.

**Tabela 2** – Alterações metabólicas encontradas na caquexia associada ao câncer

| <i>Alterações metabólicas</i> |  |
|-------------------------------|--|
|                               | Resistência à insulina (LUNDHOLM; HOLM; SCHERSTEN, 1978)   |
|                               | Intolerância à glicose (HOLROYDE; REICHARD, 1981)  |
|                               | Aumento da gliconeogênese:   |
| Carboidratos                  | Substratos:  |
|                               | Lactato (Ciclo de Cori) (HOLROYDE et al., 1975)  |
|                               | Alanina (LUNDHOLM; HOLM; SCHERSTEM, 1979)  |
|                               | Glicerol (LUNDHOLM et al., 1982)   |
|                               | Diminuição da síntese de proteínas no músculo esquelético (EMERY; LOVELL; RENNIE, 1984)  |
|                               | Aumento da proteólise:   |
| Proteínas                     | Sistema proteolítico dependente de calpaína (HASSELGREN; WRAY; MAMMEN, 2002; BARTOLI; RICHARD, 2005; COSTELLI et al., 2005)                      |
|                               | Sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma (ARGILÉS; LÓPEZ-SORIANO, 1996; HASSELGREN; WRAY; MAMMEN, 2002; CAO; KIM; LECKER, 2005) |
|                               | Sistema proteolítico lisossomal (HASSELGREN; WRAY; MAMMEN, 2002; BECHET et al., 2005)  |
|                               | Aumento da lipólise:   |
|                               | Mediadores:  |
| Lipídios                      | LMF (KHAN; TISDALE, 1999)  |
|                               | AIS (ISHIKO et al., 1999)  |
|                               | Toxo-hormônio L (MASUNO; YAMASAKI; OKUDA, 1981)  |

AIS: Substância Indutora de Anemia; LMF: Fator Mobilizador de Lipídios.

**Tabela 3 – Principais mediadores envolvidos na caquexia associada ao câncer**

| <i>Mediador</i>  | <i>Origem</i> | <i>Alteração observada na caquexia</i> | <i>Efeito</i>  | <i>Consequência biológica</i>                         |
|------------------|---------------|--|--|---|
| CRH              | Hospedeiro    | Aumento                                | Aumento da supressão do apetite (ARGILÉS et al., 2005)   | Anorexia  |
| Glicocorticóides | Hospedeiro    | Aumento (BESEDOVSKY et al., 1985)      | Aumento da degradação protéica (HASSELGREN, 1999b)   | Perda de massa muscular                               |
| Grelina          | Hospedeiro    | Diminuição                             | Diminuição do apetite (HANADA et al., 2004)  | Anorexia  |
| Triptofano       | Hospedeiro    | Aumento                                | Aumento da atividade serotoninérgica no hipotálamo e supressão do apetite (CANGIANO et al., 1994)  | Anorexia  |
| IL-1             | Hospedeiro    | Aumento                                | Diminuição da concentração / atividade do neuropeptídeo Y (CHANCE et al., 1994; KING et al., 2000)   | Anorexia  |
| TNF- $\alpha$    | Hospedeiro    | Aumento                                | Bloqueio do estímulo do apetite pelo neuropeptídeo Y (PLATA-SALAMAN, 2000)<br>Ativação do NF- $\kappa$ B (BAEUERLE, 2000)<br>Aumento da atividade dos sistemas proteolíticos dependentes de ubiquitina-proteassoma e calpaína (COSTELLI et al., 2001) através da ativação das vias do NF- $\kappa$ B e API (PENNER et al., 2001; COSTELLI et al., 2005; MOORE-CARRASCO et al., 2007) | Perda de massa muscular                               |
| IL-6             | Hospedeiro    | Aumento                                | Aumento da atividade dos sistemas proteolíticos dependentes de ubiquitina-proteassoma e calpaína (COSTELLI et al., 2001)   | Perda de massa muscular                               |
| IFN- $\gamma$    | Hospedeiro    | Aumento                                | ND   | Severa perda de massa corpórea (MATTHYS et al., 1991) |
| CNTF             | Hospedeiro    | Aumento                                | ND   | Perda de massa corpórea (WANG; FORSBERG, 2000)        |
| LIF              | Hospedeiro    | Aumento                                | ND   | Perda de massa corpórea (ARGILÉS et al., 2005)        |
| PIF              | Tumor         | Presença                               | Aumento da atividade do sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma, através da ativação do NF- $\kappa$ B (SMITH; WYKE; TISDALE, 2004; WYKE; TISDALE, 2005) ou via HETE (SMITH; LORITE; TISDALE, 1999)  | Perda de massa muscular                               |
| LMF              | Tumor         | Presença                               | Estimulação da atividade da adenilato ciclase e aumento de lipólise (KHAN; TISDALE, 1999)  | Perda de massa corpórea                               |
| AIS              | Tumor         | Presença                               | Supressão funcional de eritrócitos e células imunocompetentes, diminuição da ingestão alimentar, atividade lipolítica (ISHIKO et al., 1999)  | Anemia<br>Perda de massa corpórea                     |
| Toxo-hormônio L  | Tumor         | Presença                               | Mobilização de lipídios, involução do timo (MASUNO; YAMASAKI; OKUDA, 1981)   | Perda de massa corpórea<br>Imunossupressão            |

AIS: Substância Indutora de Anemia; CNTF: Fator Neurotrófico Ciliar; CRH: Hormônio Liberador de Corticotrofina; HETE: ácido hidroxieicosatetraenóico; IFN- $\gamma$ : Interferon  $\gamma$ ; IL-1: Interleucina 1; IL-6: Interleucina 6; LIF: Fator Inibidor de Leucemia; LMF: Fator Mobilizador de Lipídios; ND: Não Determinado; NF- $\kappa$ B: Fator Nuclear  $\kappa$ B; PIF: Fator Indutor de Proteólise; TNF- $\alpha$ : Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$ .

Na caquexia, a degradação protéica constitui o principal mecanismo de perda de massa corpórea. Três sistemas proteolíticos têm sido implicados na intensa depleção protéica observada em condições catabólicas, tal como a caquexia associada ao câncer: 1) sistema proteolítico dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ ; 2) sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma; 3) sistema proteolítico lisossomal.

Brevemente, o sistema proteolítico dependente de  $\text{Ca}^{2+}$  é composto por cisteína proteases, também conhecidas como calpaínas ou proteases neutras ativadas pelo  $\text{Ca}^{2+}$ . As calpaínas existem no citosol na forma inativa, sendo ativadas pelo influxo de  $\text{Ca}^{2+}$  em concentrações da ordem de  $\mu\text{M}$  (calpaína  $\mu$  ou 1) ou  $\text{mM}$  (calpaína  $m$  ou 2) (COSTELLI et al., 2005).

As calpaínas  $\mu$  e  $m$  são expressas em uma variedade de tecidos, enquanto a calpaína 3, também conhecida como calpaína p94, é expressa predominantemente no tecido muscular. Em virtude de seu potencial deletério, a atividade das calpaínas também é regulada pela calpastatina, um inibidor endógeno destas proteases (BARTOLI; RICHARD, 2005; COSTELLI et al., 2005).

Assim como para as calpaínas, a atividade do sistema dependente de ubiquitina-proteassoma é altamente regulada. Um dos requisitos para que se inicie a degradação protéica por esta via é a marcação prévia pela ubiquitina, processo também denominado ubiquitinação.

Segundo Hasselgren, Wray e Mammen (2002), certas características na porção N-terminal dos aminoácidos arginina, lisina, histidina, fenilalanina, leucina, triptofano, tirosina e isoleucina podem tornar as proteínas que os contêm susceptíveis à ubiquitinação e, conseqüentemente, à degradação pelo sistema dependente de ubiquitina-proteassoma.

Estudos têm sugerido que a ação prévia de calpaínas sobre os sarcômeros, liberando actina e miosina, desestabilizaria as porções N-terminais de alguns aminoácidos destas proteínas, tornando-as alvo de ubiquitinação (HASSELGREN, 1999a; HASSELGREN, WRAY, MAMMEN, 2002).

O processo de ubiquitinação de proteínas é regulado pelas enzimas de ativação de ubiquitina (E1), conjugação de ubiquitina (E2) e ubiquitina-ligase (E3). Uma vez ubiquitinadas, as proteínas são reconhecidas e degradadas pelo proteassoma 26S, uma protease multicatalítica dependente de ATP ou, alternativamente, os conjugados de ubiquitina podem ser desfeitos pela ação de hidrolases ubiquitina-específicas ou isopeptidases, (ARGILÉS; LÓPEZ-SORIANO, 1996).

A ação de peptidases, como a tripeptídeo peptidase, tem sido implicada na fase final da degradação protéica. Uma vez que pelo sistema dependente de ubiquitina-proteassoma são gerados peptídeos, estas enzimas seriam necessárias para a degradação a aminoácidos (TOMKINSON, 1999).

Ao contrário das vias anteriores presentes no citosol, a proteólise pela via lisossomal ocorre no interior de vesículas contendo altas concentrações de hidrolases ácidas, incluindo proteases, glicosidases, lipases, nucleases e fosfatases. Dentre as proteases, destacam-se as catepsinas. Este sistema proteolítico está envolvido na degradação de proteínas incorporadas à célula por endocitose, pinocitose ou fagocitose, além de ser responsável pela renovação de lipídios e proteínas de membrana (BECHET et al., 2005).

Sob condições fisiológicas, os três sistemas proteolíticos participam de eventos como crescimento, diferenciação, regeneração e morte celulares. Entretanto, existem evidências do envolvimento destas vias no processo de perda de massa muscular observado na caquexia. Foi detectado aumento da expressão de m-calpaína em músculo esquelético de ratos com tumor de Yoshida AH-130 (TEMPARIS et al., 1994), além de aumento da atividade de outras isoformas de calpaínas (COSTELLI et al., 2001).

Usando o mesmo modelo de caquexia, a depleção protéica foi significativamente inibida pela leupeptina, um inibidor de cisteína protease (TESSITORE; COSTELLI; BACCINO, 1994).

Por outro lado, há relatos de aumento da concentração de conjugados de ubiquitina, assim como da expressão e atividade de componentes do sistema dependente de ubiquitina-proteassoma no músculo esquelético de animais com caquexia induzida por tumores (LLOVERA et al., 1994; GOMES-MARCONDES; TISDALE, 2002; HASSELGREN; FISCHER, 2001; PRICE, 2003).

Foi relatado, ainda, aumento da expressão de catepsinas em músculo esquelético de ratos com caquexia induzida por tumor (DEVAL et al., 2001).

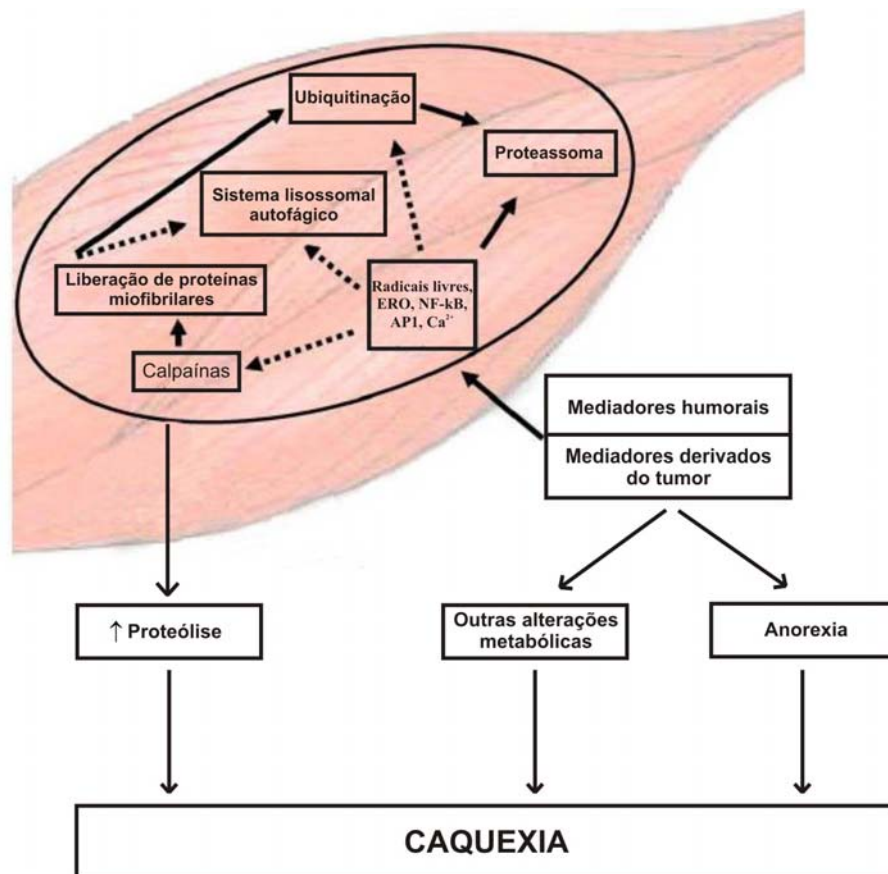
A degradação protéica na caquexia é regulada por diversos mediadores, tais como hormônios, neurotransmissores, receptores, citocinas e fatores de transcrição.

Neste sentido, radicais livres e ERO também têm sido implicados na modulação da proteólise. Segundo Schreck, Rieber e Baeuerle (1991) e Los et al. (1995), o  $H_2O_2$  e outras ERO são capazes de ativar o NF- $\kappa$ B, um dos fatores de transcrição envolvidos na regulação dos sistemas proteolíticos dependentes de  $Ca^{2+}$  ou de ubiquitina-proteassoma.

Além disso, foi observado que a atividade das enzimas E2 do sistema dependente de ubiquitina-proteassoma é alterada pela indução de estresse oxidativo *in vitro* (JAHNGEN-HODGE et al., 1997; SHANG; GONG; TAYLOR, 1997; OBIN et al., 1997).

Portanto, os mecanismos responsáveis pela acentuada perda de massa corpórea e muscular são complexos, incluindo tanto alterações metabólicas, quanto redução de ingestão alimentar. Dentre as alterações metabólicas, tem se tornado alvo de intensa investigação o metabolismo oxidativo, em virtude da existência de estudos relatando seus efeitos sobre a proteólise e, conseqüentemente, sobre a perda de massa.

A figura 3 esquematiza os principais mecanismos envolvidos na perda de massa muscular observada na caquexia associada ao câncer.



**Figura 3** – Esquema ilustrativo mostrando as interações entre os sistemas proteolíticos e as principais anormalidades observadas durante o desenvolvimento da caquexia associada ao câncer. Estímulos extracelulares induzem diferentes vias intracelulares de sinalização, muitas das quais ainda desconhecidas (setas descontínuas), resultando em intensa proteólise muscular em decorrência da ativação dos sistemas proteolíticos, anorexia e outras anormalidades metabólicas, levando à caquexia. Adaptado de Argilés et al. (2003) e Costelli et al. (2005).

## 1.7 CAQUEXIA ASSOCIADA AO CÂNCER: IMPORTÂNCIA CLÍNICA

Pacientes com caquexia associada ao câncer apresentam maior crescimento tumoral, menor resposta à quimioterapia, assim como baixa qualidade e expectativa de vida (TISDALE, 2000).

A maciça resposta catabólica no músculo esquelético constitui um ponto crítico nestes pacientes, pois a proteólise miofibrilar compromete ambas as funções contráteis e de reserva do tecido, causando fadiga e fraqueza musculares (HASSELGREN; WRAY; MAMMEN, 2002; COSTELLI et al., 2005).

Além disso, outros músculos podem ser comprometidos pela depleção protéica. Quando a proteólise atinge os músculos cardíacos e respiratórios, podem ocorrer, respectivamente, falência cardíaca (BARREIRO et al., 2005) e aumento do risco de complicações pulmonares (HASSELGREN; WRAY; MAMMEN, 2002).

Segundo Tisdale (2000), 30% de perda de massa corpórea são invariavelmente fatais. De acordo com Warren (1932) e Andreyev et al. (1998), a caquexia é responsável por quase um terço das mortes de pacientes com câncer.

Somente em 2000, cerca de 6 milhões de pessoas morreram em decorrência desta doença. No mesmo ano, aproximadamente 10 milhões de novos casos de câncer foram registrados em todo o mundo e, com o aumento da prevalência do tabagismo e de outros estilos de vida prejudiciais à saúde, a expectativa é que este número aumente mais de 50% nos próximos anos, alcançando 15 milhões em 2020 (OMS, 2003).

No Brasil, a incidência de câncer em 2006 foi de 472050 casos, sendo 14490 destes no estado do Paraná (BRASIL, 2005).

Sendo assim, a compreensão dos mecanismos envolvidos na caquexia contribuiria para intervenções clínicas mais efetivas em pacientes acometidos por esta síndrome.

Muitos esforços têm sido realizados com a finalidade de limitar os efeitos da caquexia em pacientes com câncer (FEARON; MOSES, 2002; ARGILÉS et al., 2003; ARGILÉS et al., 2005). Os mais comuns são o uso de antiinflamatórios esteroidais e não esteroidais, hormônios, inibidores da síntese de citocinas, suplementação com ácido eicosapentanóico e intervenções nutricionais. Existem relatos de aumento do apetite com estas estratégias, entretanto, estas não se mostraram capazes de impedir a acelerada perda de massa



em pacientes com câncer (TISDALE, 2001; FEARON; MOSES, 2002; ARGILÉS et al., 2005).

Resultados mais promissores têm sido observados, experimentalmente, com o uso do formoterol (BUSQUETS et al., 2004), um agonista  $\beta$ 2-adrenérgico, e do inibidor Bowman-Birk (BBI) (MORRIS et al., 2005), com atividade sobre diversas serina proteases. Ambas as drogas mostraram ser capazes de diminuir significativamente a proteólise do músculo esquelético e, conseqüentemente, a perda de massa corpórea. Tem sido relatado, ainda, que o tratamento crônico com óleo de peixe reduz o crescimento tumoral em um modelo de caquexia induzida por tumor de Walker-256 (PINTO et al., 2004). Usando o mesmo modelo, outro estudo verificou que o tratamento com agentes anabolizantes, tais como insulina e clenbuterol, e com naproxeno, um inibidor da síntese de prostaglandinas, isoladamente ou associados, diminui significativamente o crescimento tumoral e a perda de massa corpórea (PIFFAR et al., 2003).

## **1.8 CAQUEXIA E ESTRESSE OXIDATIVO: ESTUDOS EXPERIMENTAIS**

Radicais livres e ERO são produzidos constantemente pelas células, principalmente na cadeia respiratória. Sob condições fisiológicas, estas substâncias são mantidas pelas defesas antioxidantes naturais em concentrações não tóxicas (para revisão, ver FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Entretanto, alterações causadas por condições patológicas podem romper este equilíbrio, induzindo diversos efeitos deletérios. O termo “estresse oxidativo” tem sido freqüentemente utilizado para designar os efeitos tóxicos gerados por este desequilíbrio.

A produção excessiva de  $\cdot$ NO pode contribuir, potencialmente, para estes efeitos deletérios através de reações formando ERN (BUCK; CHOJKIER, 1996; BARREIRO et al., 2005; ZIMIANI et al., 2005). Nestas circunstâncias, é também utilizado o termo “estresse nitrosativo”.

Por apresentarem concentrações extremamente reduzidas em amostras biológicas ( $\sim 10^{-11}$ M), assim como pela elevada instabilidade que possuem, radicais livres, ERO e ERN são dificilmente detectados diretamente (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Desta forma, as lesões provocadas pela reação destes compostos com biomoléculas diversas são freqüentemente utilizadas como marcadores de sua produção. Dentre os métodos

disponíveis para a avaliação de estresse oxidativo e/ou nitrosativo, os mais utilizados baseiam-se na quantificação de produtos gerados pela cadeia lipoperoxidativa, tais como malondialdeído (MDA) (GOMES-MARCONDES; TISDALE, 2002), 4-hidroxi-2-nonenal (BARREIRO et al., 2005) e hidroperóxidos lipídicos (GONZÁLEZ-FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991).

$\text{NO}$ , estresse nitrosativo e oxidativo têm recebido bastante atenção em virtude do possível envolvimento na caquexia associada ao câncer, conforme relatado por alguns estudos. Buck e Chojkier (1996) mostraram que a administração de  $\text{TNF-}\alpha$  em camundongos induziu severa perda de massa corpórea, aumento de aductos de MDA no músculo esquelético e desdiferenciação celular. No mesmo estudo, tanto a perda de massa, quanto a concentração de aductos de MDA e as alterações histológicas foram reduzidas, significativamente, pelo uso de  $\alpha$ -tocoferol, um antioxidante, ou LNNA, um inibidor de NOS.

Matthews e Neale (1987) e Hennet, Richter e Peterhans (1993) propuseram que o aumento da produção de radicais livres e de ERO na mitocôndria seria um mecanismo envolvido na citotoxicidade induzida pelo  $\text{TNF-}\alpha$ , confirmando o envolvimento do estresse oxidativo na caquexia induzida por esta citocina.

Gomes-Marcondes e Tisdale (2002) observaram que a indução de estresse oxidativo em cultura de mioblastos, que foi evidenciada pelo aumento da concentração de MDA, é acompanhada pelo aumento da expressão e da atividade de componentes do sistema proteolítico dependente de ubiquitina-proteassoma, um dos principais responsáveis pela intensa proteólise observada na caquexia.

Em modelos experimentais de caquexia induzida por tumores, também tem sido observado estresse oxidativo e/ou nitrosativo, tanto no músculo esquelético, como em outros tecidos. Camundongos caquéticos com tumor MAC 16 mostraram concentração aumentada de MDA no músculo gastrocnêmio (GOMES-MARCONDES; TISDALE, 2002).

Em outro estudo, foi observado aumento da concentração de aductos de MDA, grupos carbonilas e 3-nitrotirosina no músculo gastrocnêmio de ratos com caquexia induzida pelo tumor de Yoshida AH -130 (BARREIRO et al., 2005).

Ratos com tumor de Walker-256 apresentaram concentração aumentada de MDA e hidroperóxidos lipídicos, além de redução da concentração de antioxidantes no músculo gastrocnêmio (GUARNIER, 2006) e no fígado (SUZUKAWA, 2005). Freitas et al. (2001) também encontraram concentração aumentada de MDA em diferentes regiões do cérebro de ratos, utilizando o mesmo modelo.

Conforme o exposto, considerável número de estudos experimentais têm sugerido a participação do estresse oxidativo e/ou nitrosativo na caquexia associada ao câncer. Portanto, um dos objetivos propostos por este estudo foi investigar o papel do  $\cdot\text{NO}$  e, conseqüentemente, do estresse nitrosativo na caquexia induzida pelo tumor de Walker-256.

## 2 OBJETIVOS

- Adequar a metodologia descrita por Kikuchi et al. (1993) para a quantificação de  $\cdot\text{NO}$  em homogenato de músculo esquelético;
- Investigar o envolvimento do  $\cdot\text{NO}$  na lesão por isquemia-reperfusão induzida pela aplicação de torniquete e na caquexia induzida pelo tumor de Walker-256.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Foram utilizados 63 ratos Wistar machos (200 a 300g) fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos em gaiolas de propileno com dimensões de 16x34x40 cm em número não superior ao de 4 animais por gaiola. Os animais permaneceram em ambiente com temperatura controlada, sob ciclo de claro/escuro de 12 h, sendo alimentados *ad libitum* com água e alimento completo para camundongos e ratos (Nuvital Nutrientes, Curitiba-PR, Brasil) até o início da experimentação. Foram utilizados 33 animais para o estudo da lesão de isquemia-reperfusão e 30, para o estudo da caquexia.

#### 3.2 REAGENTES

Albumina sérica bovina (Sigma); Aminoguanidina (Sigma), azul de Tripan (Vetec Química Final); Carbogênio 5 (CO<sub>2</sub> 5%; O<sub>2</sub> 95% - Aga, São Paulo); Desferal<sup>®</sup> (mesilato de desferrioxamina, Ciba); Éter etílico (Nuclear); Reagente fenólico de Folin-Ciocalteus (Merck); KCl (Reagen Quimibrás); KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck); KI (Reagen Quimibrás); Heparin<sup>®</sup> (heparina sódica 5000 UI, Cristália); H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Synth); H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Quimex); Hypnol<sup>®</sup> (pentobarbital sódico 3%, Fontoveter); LNAME (Fluka); Luminol (5-Amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinadiona, Sigma); N<sub>2</sub> (Air Liquide Brasil LTDA); NaCl (Reagen Quimibrás); Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Merck); Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck); NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck); NaKC<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>6</sub>.H<sub>2</sub>O (Sigma); NaNO<sub>2</sub> (Aldrich Chemical); NaOH (Merck); terc-butil hidroperóxido (Sigma).

### 3.3 MODELO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO

Foi adotado um modelo de isquemia parcial para a indução de LIR em músculo esquelético através da aplicação de torniquete em pata posterior de ratos. Este modelo foi realizado conforme descrito por Concannon, Kester e Welsh (1992), com poucas alterações.

### 3.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA-REPERFUSÃO

Brevemente, animais previamente anestesiados pela inalação de éter etílico tiveram a pata posterior esquerda medida com o auxílio de um paquímetro (Mitutoyo, Japão) (figura 4) e, a seguir, enfaixada no sentido distal-proximal com um dreno de Penrose para o exsangüinamento da pata, conforme mostrado na figura 5. Posteriormente, foi aplicado um torniquete de nylon na porção proximal da mesma pata para a indução de isquemia. A seguir, o dreno de Penrose e a anestesia pela inalação de éter foram removidos. A isquemia foi caracterizada por palidez ou cianose, paralisia e ausência ou pouca variação do volume da pata imediatamente abaixo do torniquete. Após 4 h de isquemia, o torniquete foi removido para o restabelecimento do fluxo sanguíneo, que foi acompanhado por formação de edema. A pata foi reperfundida por 1, 2 ou 4 h.

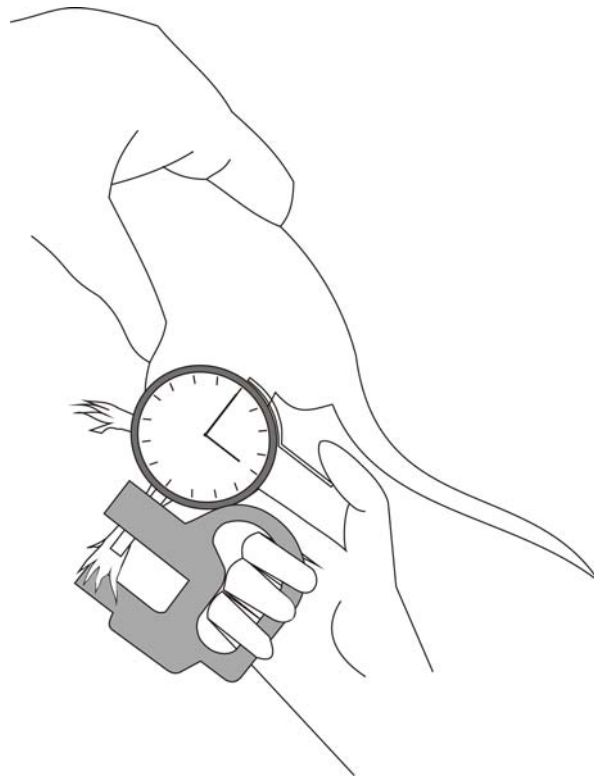
Foram utilizados inibidores de NOS (NG-nitro-L-arginina-metilester – LNAME, 20mg/kg ou Aminoguanidina – AG, 50mg/kg) ou um agente quelante de ferro (Desferrioxamina – DFO, 60mg/kg), que foram administrados intraperitonealmente (ip) 1 h antes da remoção do torniquete. A seguir, a pata foi reperfundida por 4 h.

O LNAME (GARDINER et al., 1990; MUELLER; FOLEY; HASSER, 2005) e a AG (METCALF; JUNGERSTEN; LISANDER, 2002), quando administrados nas doses supracitadas, são considerados inibidores seletivos para cNOS e iNOS, respectivamente.

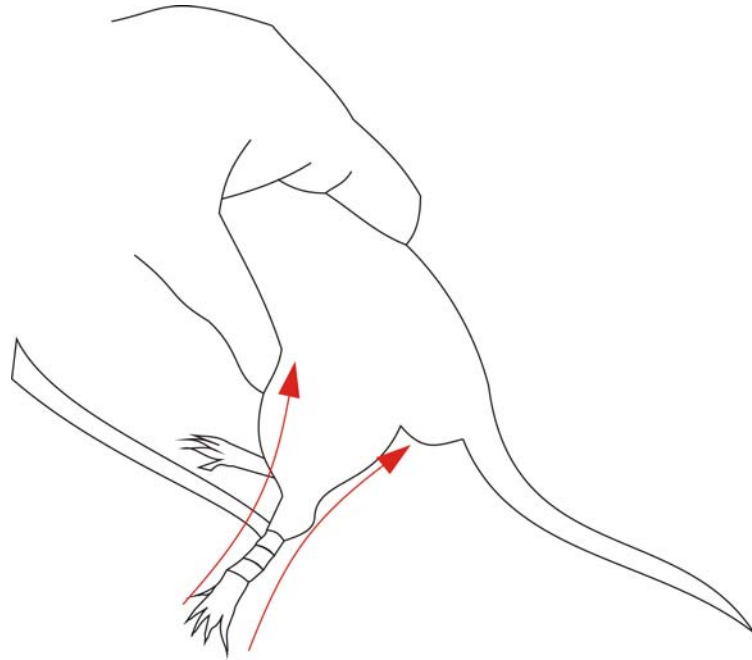
Foi realizado, ainda, um grupo controle que consistiu de animais não submetidos à isquemia.

Durante a realização deste protocolo experimental, ilustrado na figura 6, a pata posterior esquerda foi medida utilizando um paquímetro (figura 4) para avaliar a formação de edema.

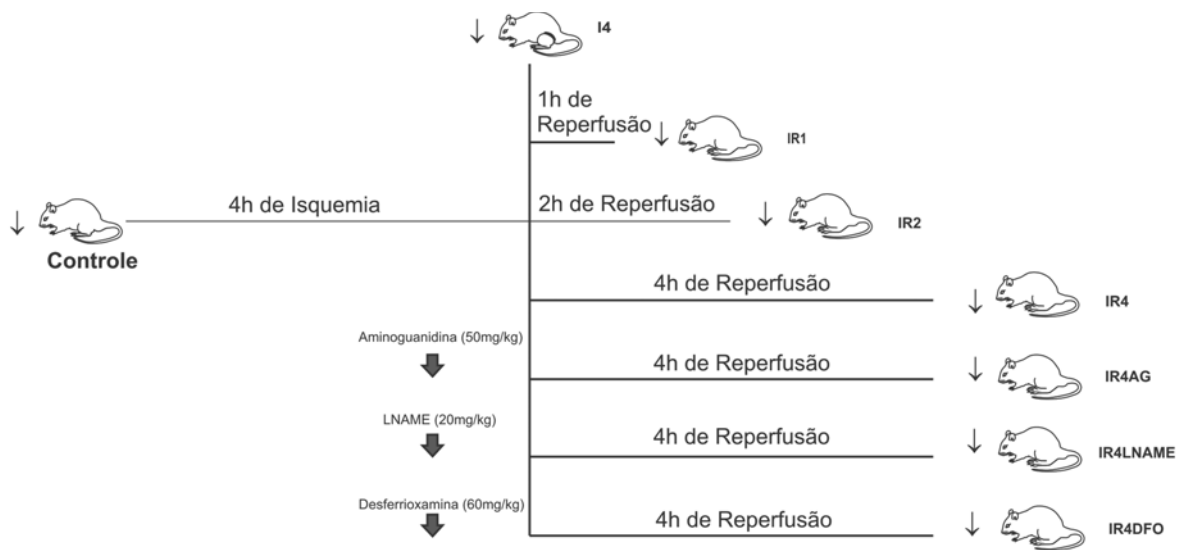
Os animais foram anestesiados com Hypnol<sup>®</sup> (pentobarbital sódico), que foi administrado ip na dose de 50mg/kg para a excisão do músculo gastrocnêmio. Após a coleta do tecido, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical. O músculo foi estocado em nitrogênio líquido até análise.



**Figura 4** – Avaliação da formação de edema durante a realização do protocolo experimental de isquemia-reperusão em ratos. Com o auxílio de um paquímetro, as espessuras das patas dos animais foram medidas antes de induzir isquemia (I0), após 4 h de isquemia (I4) e após 1 (R1), 2 (R2) e 4 (R4) h de reperusão.



**Figura 5** – Exsangüinamento pré-isquemia. A pata posterior esquerda foi enfaixada com um dreno de Penrose até a porção proximal. Após a aplicação do torniquete para a indução de isquemia, a faixa foi removida.



↓ Administração ip, 1h antes de iniciar a reperfusão

↓ Anestesia com pentobarbital (50mg/kg), ip; Exerese do músculo; Sacrifício.

**Figura 6** – Protocolo Experimental de Isquemia-Reperfusão em Ratos. Controle (n = 3), I4 (n = 3), IR1(n = 4), IR2 (n = 3), IR4 (n = 5), IR4AG (n = 5), IR4LNAME (n = 5), IR4DFO (n = 5).



### 3.5 MANUTENÇÃO DO TUMOR DE WALKER-256

O tumor de Walker-256, um carcinossarcoma mamário de ocorrência espontânea em ratos Wistar, foi mantido em laboratório através de passagens semanais de  $2 \times 10^6$  células viáveis para a cavidade abdominal de ratos Wistar adultos machos. Brevemente, cerca de 6 mL de PBS heparinizado foram inoculados ip para a remoção do líquido ascítico. Após centrifugação a  $545 \times g$ , durante 15 min e a  $4^\circ C$ , a fração composta por células tumorais foi removida e adicionada a igual volume de PBS heparinizado. A viabilidade celular foi determinada em câmara de Neubauer, através do método de exclusão pelo azul de Tripán.

### 3.6 MODELO EXPERIMENTAL DE CAQUEXIA

Foi adotado um modelo experimental de caquexia induzida por câncer, utilizando o tumor de Walker-256. Este modelo foi realizado conforme descrito por Pereira et al. (2004), com poucas modificações.

### 3.7 PROTOCOLO EXPERIMENTAL DE CAQUEXIA

A caquexia foi induzida em ratos através da inoculação de 0,5 mL de suspensão de células tumorais ( $8 \times 10^7$  células viáveis) subcutaneamente (sc) na porção lateral da pata posterior direita. Estes animais foram divididos em 4 grupos experimentais, conforme o tempo decorrido após o implante do tumor: 3 (T3), 5 (T5), 10 (T10) e 14 (T14) dias (Figura 7). A ingestão alimentar destes animais foi acompanhada diariamente. Foram realizados, ainda, 2 grupos T5 tratados diariamente com AG (50 mg/kg) ou LNAME (20 mg/kg) ip.

Para verificar o efeito do inóculo de PBS e da diminuição da ingestão apresentada pelos animais experimentais (Figura 19), foram realizados grupos controles PBS / Pair Fed. Para tanto, os animais foram inoculados, sc, com 0,5 mL de PBS na porção lateral da pata posterior direita e alimentados de forma semelhante à ingestão apresentada pelos grupos experimentais durante 3 (PBS / *ad libitum*), 5 (PBS / Pair Fed 5), 10 (PBS / Pair Fed

10) e 14 dias (PBS / Pair Fed 14). Foram realizados, ainda, grupos controles que consistiram de animais inoculados com 0,5 mL de PBS e tratados com inibidores de NOS durante o mesmo período e de forma similar aos experimentais para verificar o efeito do uso de AG ou LNAME sobre as massas corpórea e muscular (figura 7).

Os animais foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg) ip para a excisão dos músculos gastrocnêmios das patas esquerdas. A seguir, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical. Os músculos foram estocados em N<sub>2</sub> líquido até análise.

### 3.8 INDICADORES DE CAQUEXIA

As perdas de massa corpórea e de massa muscular (%) foram utilizadas como parâmetros para a avaliação do desenvolvimento de caquexia durante os diferentes estágios de crescimento tumoral.

A perda de massa corpórea foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$PMC (\%) = 100 \times [MC_i - MC_f + MT + (GDMC \times n)] / [MC_i + (GDMC \times n)]$$

Onde:

GDMC: ganho diário de massa corpórea;

MC<sub>f</sub>: massa corpórea final;

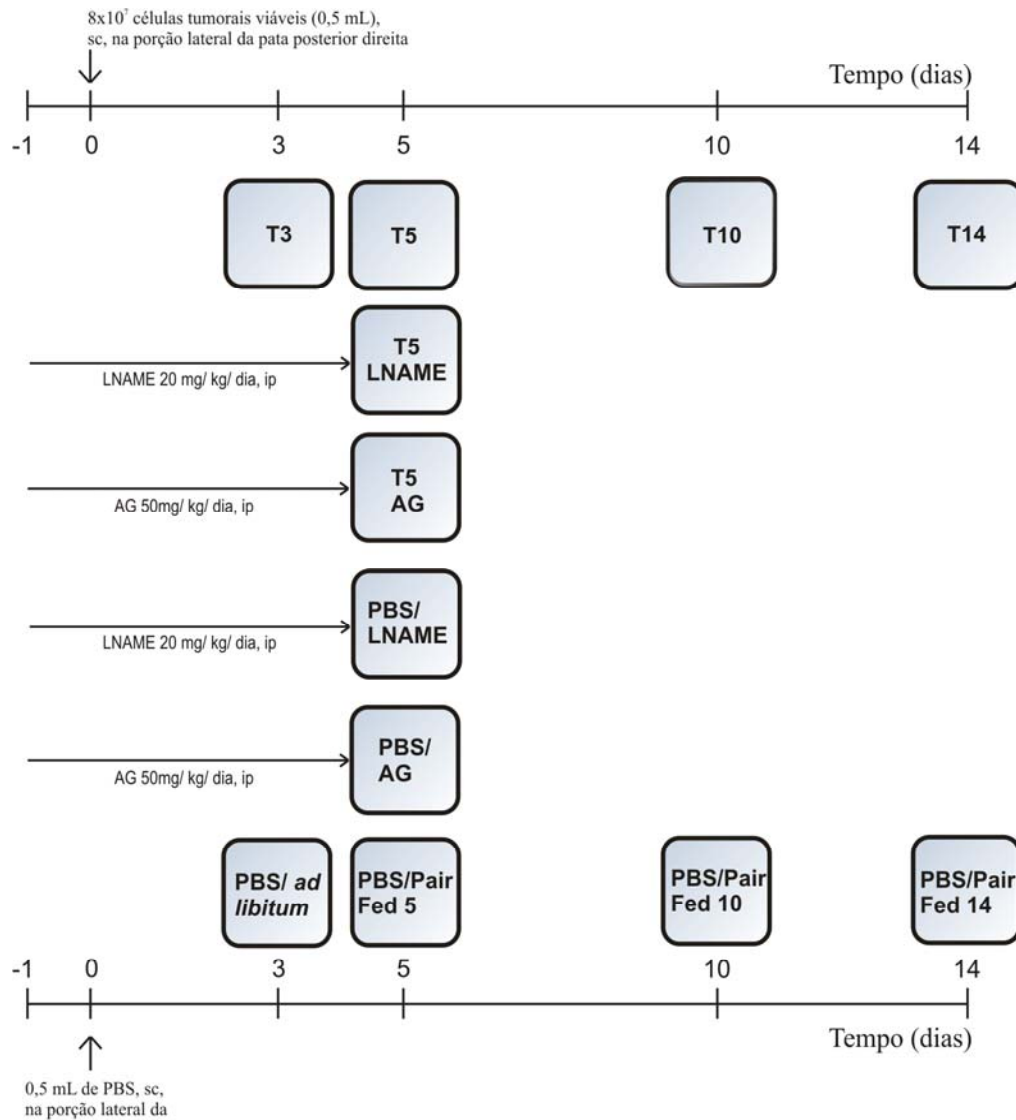
MC<sub>i</sub>: massa corpórea inicial;

MT: massa tumoral;

n: número de dias após o inóculo de células tumorais.

Para este cálculo, foi utilizada a média de GDMC obtida através do acompanhamento da ingestão alimentar apresentada pelos animais do grupo controle PBS / *ad libitum* durante 14 dias.

A perda de massa muscular (%) foi calculada usando os valores de massa dos músculos gastrocnêmios, em relação à média apresentada pelos animais do grupo controle PBS / *ad libitum*.



**Figura 7** – Protocolo experimental de caquexia induzida pelo tumor de Walker-256 em ratos. 0,5 mL de suspensão de células tumorais ( $8 \times 10^7$  células) foi inoculado sc na porção lateral da pata posterior direita de ratos Wistar e 3 (T3), 5 (T5), 10 (T10) e 14 (T14) dias após, os animais foram anestesiados com pentobarbital (50 mg/kg, ip) para a excisão e análise dos músculos gastrocnêmios contralaterais. Foram realizados grupos controles em que os animais foram inoculados com 0,5 mL de PBS, como descrito anteriormente, e alimentados de forma semelhante à ingestão apresentada pelos animais experimentais durante 3 (PBS / *ad libitum*), 5 (PBS / Pair Fed 5), 10 (PBS / Pair Fed 10) e 14 dias (PBS / Pair Fed 14). AG (50 mg/kg, ip) ou LNAME (20 mg/kg, ip) foi administrado diariamente desde o dia anterior ao inóculo de células tumorais ou de PBS, até o 5º dia após. Cada grupo experimental foi comparado com o respectivo grupo controle PBS/ Pair Fed. T3 (n=3), T5 (n=3), T10 (n=3), T14 (n=3), PBS/ *ad libitum* (n=3), PBS / Pair Fed 5 (n=3), PBS / Pair Fed 10 (n=3), PBS / Pair Fed 14 (n=3), PBS/ AG (n=3), PBS/ LNAME (n=3).

### 3.9 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-LUMINOL

A produção de  $\dot{\text{N}}\text{O}$  foi quantificada no músculo gastrocnêmio, em ambos os modelos experimentais, através de uma técnica baseada na reação de quimiluminescência iniciada em presença de  $\dot{\text{N}}\text{O}$ , H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luminol, detectável a 302 nm, conforme descrito por Kikuchi et al. (1993), com poucas alterações.

#### 3.9.1 Curva Padrão de $\dot{\text{N}}\text{O}$

$\dot{\text{N}}\text{O}$  400 pM foi sintetizado em laboratório conforme descrito por Tsukada et al. (2003), através de uma reação de redução de NO<sub>2</sub><sup>-</sup> em meio ácido, à 25°C. Nesta reação, foram utilizados 1,8mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1M / KI 0,1M e 7,2mL de NaNO<sub>2</sub> 0,1mM.

A solução de  $\dot{\text{N}}\text{O}$  400 pM foi diluída com tampão Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 mM pH 8,5 até obter concentrações na faixa de 20,80 a 355,55 aM.

Todas as soluções utilizadas foram previamente degaseificadas com N<sub>2</sub> durante 10 min.

#### 3.9.2 Curva de Tecido

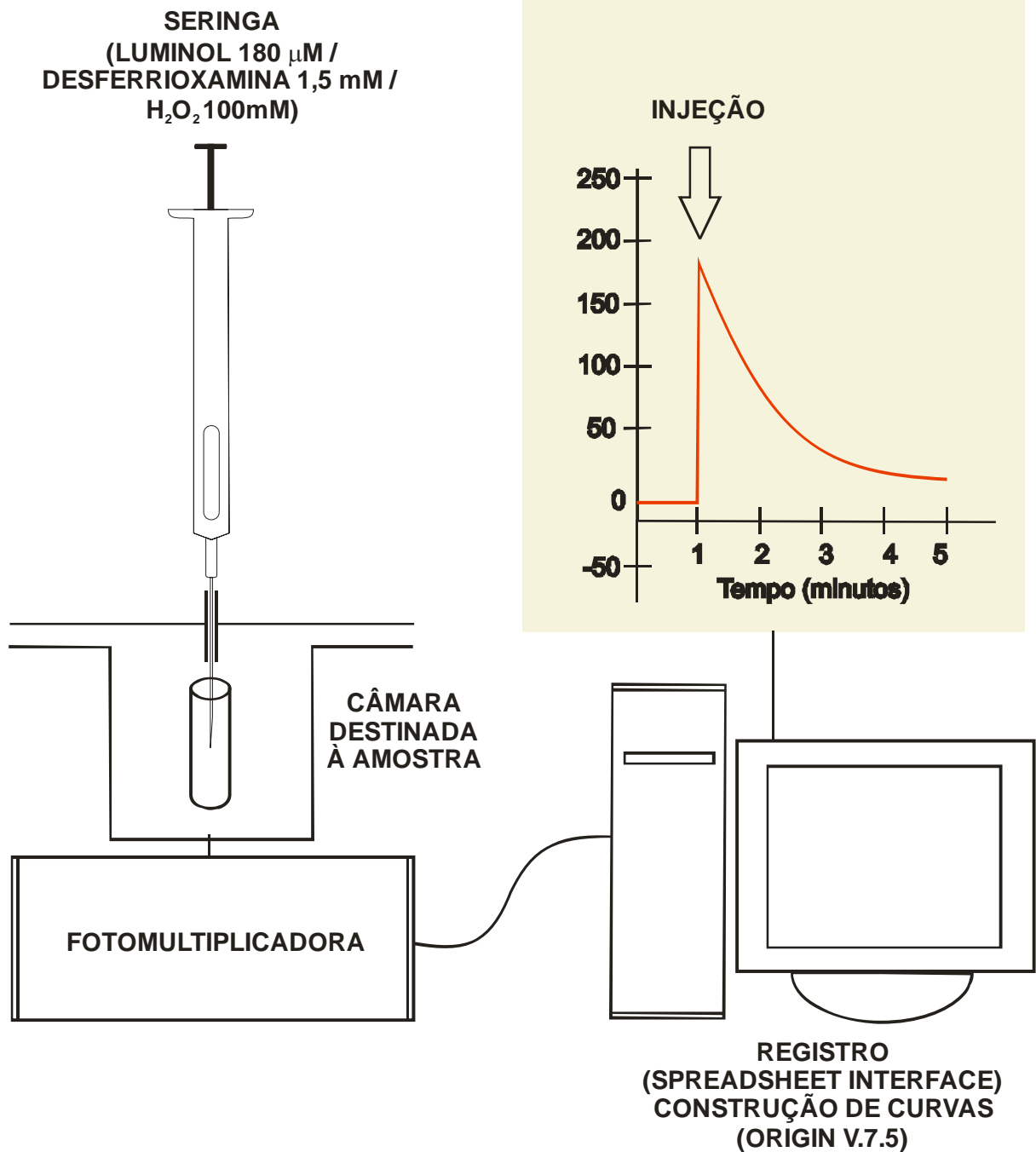
Durante a padronização da técnica, foram avaliadas amostras de tecido nas concentrações de 0,00125 a 0,05% (m/v). Os músculos gastrocnêmios foram homogeneizados em tampão Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 mM, pH 8,5, previamente degaseificado com N<sub>2</sub>, utilizando um homogeneizador modelo Ultraturrax (Marconi, Brasil), através de um ciclo único de homogeneização realizado à aproximadamente 25°C, durante 45 s.

Para as análises, foi adotada a concentração de 0,0025%.

### 3.9.3 Reação de Quimiluminescência

Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  de uma solução composta por Luminol 360  $\mu\text{M}$  / DFO 3 mM a igual volume de  $\text{H}_2\text{O}_2$  200 mM. Ambas as soluções foram preparadas com  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 mM, pH 8,5, previamente degaseificado com  $\text{N}_2$ . A mistura foi incubada à aproximadamente 25°C, sob leve agitação, durante 5 min. Após este período, 20  $\mu\text{L}$  da solução (Luminol 180  $\mu\text{M}$  / DFO 1,5 mM /  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM) foram adicionados a 800  $\mu\text{L}$  de amostra de tecido ou de solução padrão de  $\cdot\text{NO}$  através de uma seringa de precisão (Hamilton, EUA). O espectro de quimiluminescência foi monitorado durante 5 minutos, utilizando um luminômetro modelo TD 20/20 (Turner Designs, EUA) com capacidade de detecção em comprimentos de onda de 300 a 650nm e 68,5% de sensibilidade. O luminômetro foi conectado a um microcomputador através do programa Spreadsheet Interface v1.0, possibilitando o registro da quimiluminescência emitida. O programa Origin v7.5 foi utilizado para a construção das curvas de quimiluminescência, que foram analisadas quanto à altura e à área. Cada amostra de tecido foi analisada em triplicata.

Os procedimentos descritos anteriormente estão representados na figura 8.



**Figura 8** – Representação esquemática da análise de  $\dot{\text{NO}}$  através de quimiluminescência. A reação foi iniciada pela injeção de 20  $\mu\text{L}$  de Luminol 180  $\mu\text{M}$  / DFO 1,5 mM /  $\text{H}_2\text{O}_2$  100 mM /  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 mM pH 8,5 em 800  $\mu\text{L}$  de amostra de tecido ou solução padrão de  $\dot{\text{NO}}$ . O espectro de quimiluminescência foi monitorado durante 5 min em ambiente com temperatura controlada (aproximadamente 25°C). A concentração de  $\dot{\text{NO}}$  foi determinada segundo a altura e a área sob as curvas de quimiluminescência.

### **3.9.4 Adição de Excesso de $\cdot\text{NO}$ Em Amostras de Tecido**

Para avaliar o efeito de excesso de  $\cdot\text{NO}$  sobre a emissão de quimiluminescência,  $\cdot\text{NO}$  376 pM foi adicionado ao homogenato de músculo gastrocnêmio, preparado como descrito anteriormente. A solução de  $\cdot\text{NO}$  376 pM teve o pH corrigido para 8,5 antes de sua utilização. A amostra de tecido com a adição de  $\cdot\text{NO}$  em excesso foi analisada em triplicata.

### **3.9.5 Saturação de Amostras de Tecido com Oxigênio**

Homogenato de músculo gastrocnêmio, preparado como descrito anteriormente, foi degaseificado durante 30 min, utilizando carbogênio ( $\text{CO}_2$  5%,  $\text{O}_2$  95%). A amostra de tecido foi analisada em triplicata.

## **3.10 ENSAIO DE QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR T-BUTIL HIDROPERÓXIDO**

A lesão lipoperoxidativa foi avaliada no músculo gastrocnêmio, no modelo experimental de caquexia, através da reação de quimiluminescência iniciada pelo t-butil hidroperóxido em presença de hidroperóxidos lipídicos, conforme descrito por Gonzalez-Flecha, Llesuy e Boveris (1991), com poucas modificações.

### **3.10.1 Amostra de Tecido**

Foram preparados homogenatos de tecido com  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mM / KCl 120 mM, pH 7,4, nas concentrações de 1 a 10% (m/v). Os músculos gastrocnêmios foram homogeneizados em banho de gelo ( $0^\circ\text{C}$ ), através de 1 ciclo de homogeneização de 45 s, utilizando o homogeneizador modelo Ultraturrax (Marconi, Brasil). A seguir, os homogenatos

foram centrifugados a 600xg, a 4°C, durante 15 min, utilizando a centrífuga modelo Jouan BR4i Multifunction (Thermo Electron Corporation, EUA). Os sobrenadantes foram mantidos em banho de gelo até a análise.

Para as análises, foi adotada a concentração de 1% de tecido.

### **3.10.2 Reação de Quimiluminescência**

980 µL dos sobrenadantes obtidos através da centrifugação de homogenatos de músculo a 600xg, a 4°C, durante 15 min foram incubados a 37°C, durante 5 min. Posteriormente, foram adicionados 20 µL de t-butil hidroperóxido 146, 56 mM. O espectro de quimiluminescência foi monitorado durante 80 min, utilizando o luminômetro modelo TD 20/20 (Turner Designs, EUA), com capacidade de detecção em comprimentos de onda de 300 a 650nm e 68,5% de sensibilidade. O luminômetro foi conectado a um microcomputador através do programa Spreadsheet Interface v1.0, possibilitando o registro da quimiluminescência emitida. O programa Origin v7.5 foi utilizado para a construção das curvas de quimiluminescência, que foram analisadas quanto à altura e área. Cada amostra de tecido foi analisada em triplicata.

### **3.11 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA**

As proteínas totais das amostras destinadas à análise de quimiluminescência induzida pelo t-butil hidroperóxido foram quantificadas através do método descrito por Lowry et al. (1951) e modificado por Miller (1959). Cada amostra de tecido foi analisada em duplicata. A média das análises em duplicata foi utilizada para o cálculo da concentração de proteínas totais nas amostras. Albumina sérica bovina 116 µg/ mL foi utilizada como solução padrão.



### 3.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

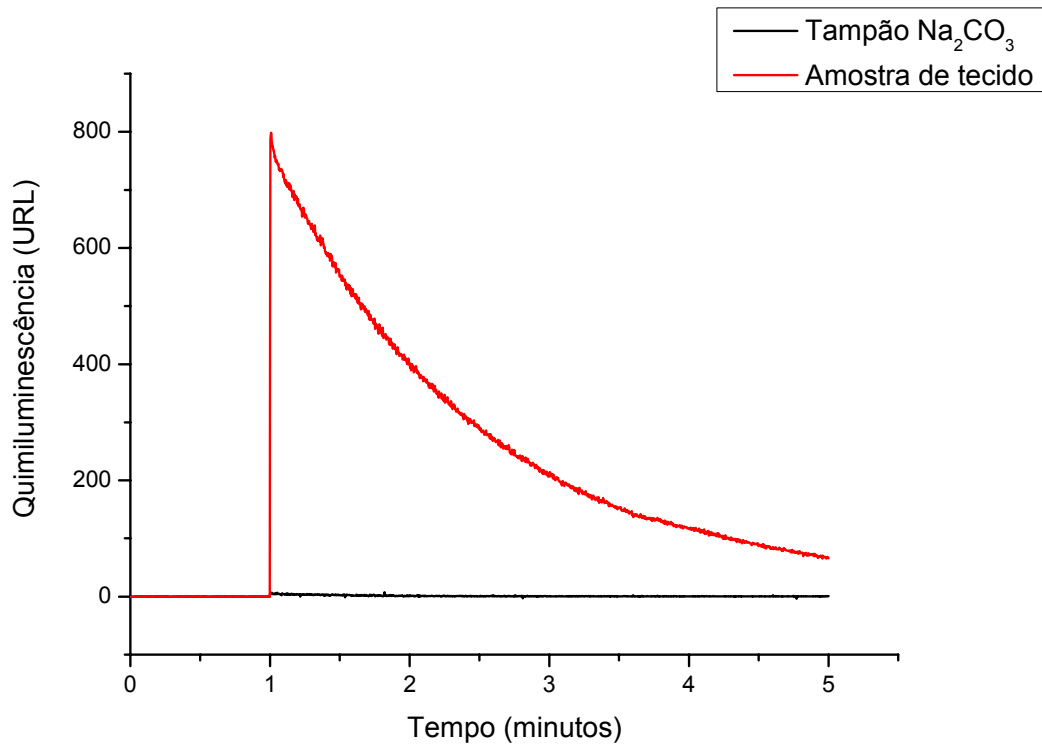
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM. Os dados foram analisados usando o programa GraphPad InStat v3.05, através dos testes One Way ANOVA e comparação múltipla de Tukey-Kramer. Foram considerados valores significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

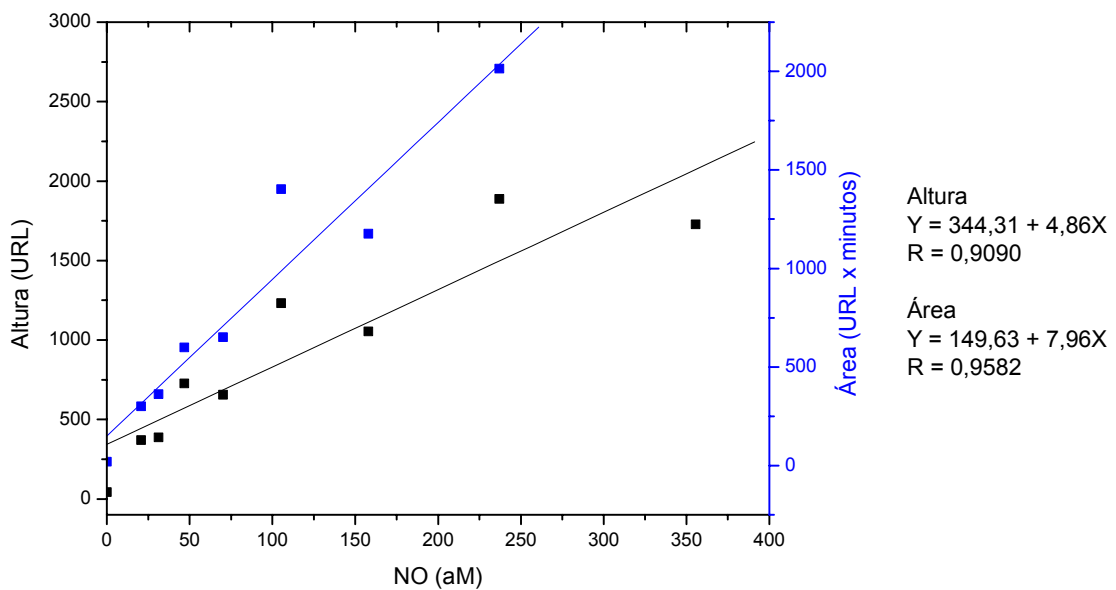
### 4.1 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-LUMINOL

A emissão gerada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi uma das dificuldades encontradas durante a padronização deste método. Inicialmente, considerável emissão de quimiluminescência era observada imediatamente após a adição de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ao luminol, mesmo na ausência de amostra de tecido (dados não mostrados). Contudo, esta emissão pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mostrou-se breve, sendo extinta 5 min após o início da reação. Sendo assim, para remover a interferência pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as soluções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e luminol foram misturadas e incubadas sob leve agitação durante 5 min antes da sua utilização. Conforme ilustrado na figura 9, que representa as emissões observadas na presença ou ausência de amostra de tecido, com o procedimento de incubação durante 5 min a quimiluminescência iniciada pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (tampão) foi reduzida para cerca de 20 URL, tornando-se insignificante quando comparada à emissão apresentada pelo tecido, que foi de aproximadamente 800 URL.

Na figura 10, estão representadas as curvas-padrão de <sup>•</sup>NO. O aumento da concentração de <sup>•</sup>NO padrão (20,80 a 355,55 aM) foi acompanhado pelo aumento linear de emissão, demonstrando a elevada sensibilidade deste método. Tanto a altura, quanto a área sob as curvas de quimiluminescência apresentaram elevada correlação com a concentração de <sup>•</sup>NO (valores de R, respectivamente, iguais a 0,9090 e 0,9582). No entanto, em concentrações superiores a 355,55 aM foi observado inibição da quimiluminescência.



**Figura 9** – Gráfico representativo da emissão de quimiluminescência pela amostra de tecido. As soluções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM e luminol 360 μM / DFO 3 mM foram misturadas e incubadas durante 5 min sob leve agitação antes da sua utilização na análise. Este procedimento minimizou a emissão pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na ausência de amostra de tecido.



**Figura 10** – Curva-padrão de  $\text{NO}$  representada segundo a altura ou a área sob as curvas de quimiluminescência. As equações das retas foram determinadas através de regressão linear. Os coeficientes angulares foram utilizados para o cálculo da concentração de  $\text{NO}$  nas amostras.  $R$  é o coeficiente de correlação. Os valores correspondem às médias de análises em triplicata.

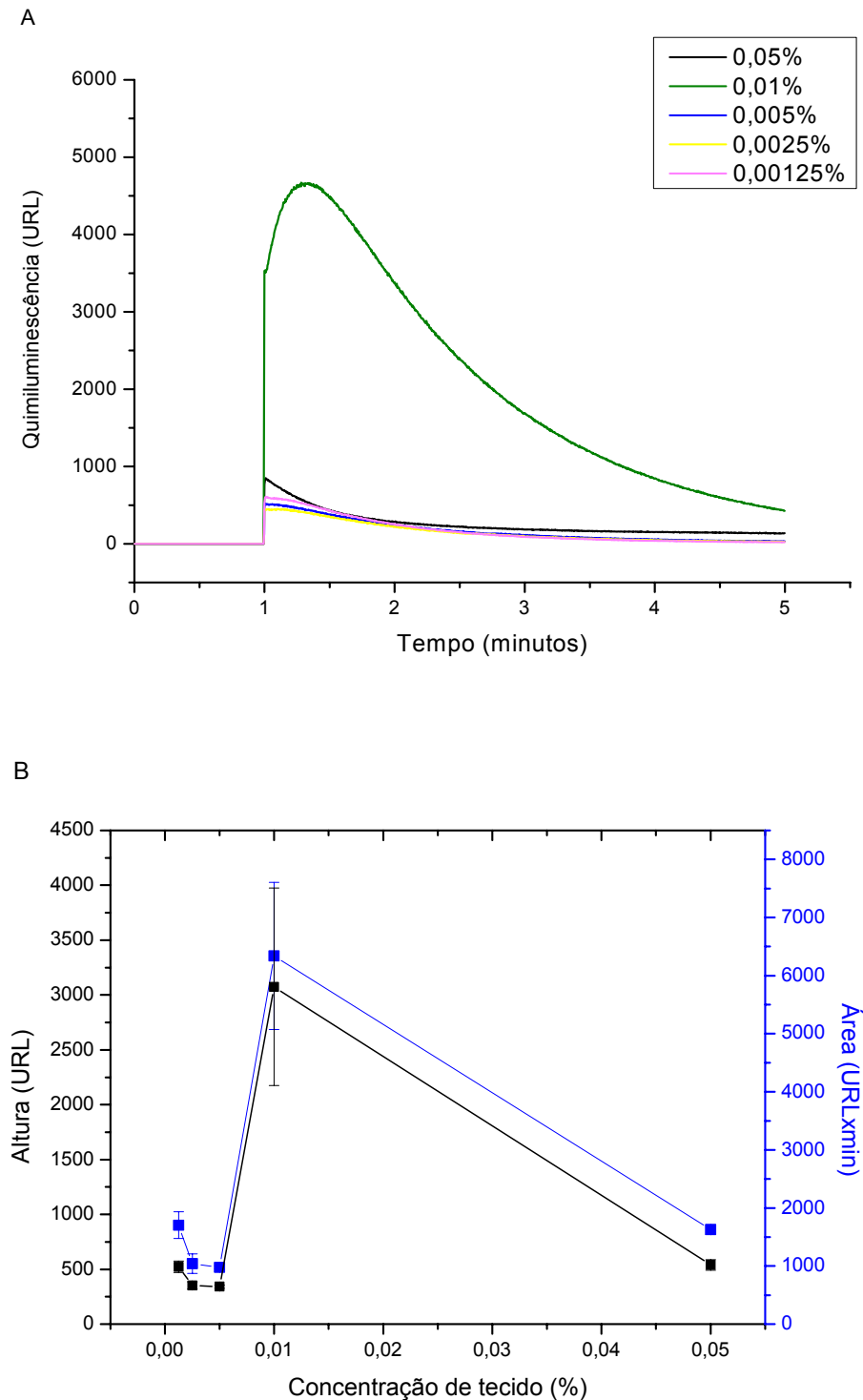
Um dos fatores que influenciam a quimiluminescência é a concentração de amostra utilizada nos ensaios. De acordo com a concentração adotada, a quimiluminescência pode não reproduzir a condição verdadeira do tecido, produzindo um efeito chamado “quench”, caracterizado pela inibição parcial ou total da emissão. Com a finalidade de estabelecer a concentração de tecido ideal para a análise, foram avaliadas diferentes concentrações de tecido. A figura 11A ilustra a quimiluminescência emitida por diferentes concentrações de tecido e a figura 11B correlaciona os valores de altura e área sob as curvas de quimiluminescência com a concentração de tecido. A emissão aumentou de forma dependente da concentração entre 0,00125 e 0,005%. Inversamente ao anterior, houve diminuição dependente da concentração entre 0,01 e 0,05%, caracterizando a inibição da quimiluminescência a partir da concentração de 0,01%. Foi adotada para as análises a concentração de 0,0025%.

A figura 12 mostra o efeito da saturação de uma amostra de tecido com  $\text{O}_2$  sobre a quimiluminescência. A emissão foi diminuída de  $480,47 \pm 49,10$  URL para  $66,17 \pm 7,72$  URL, após a saturação da amostra com  $\text{O}_2$ .

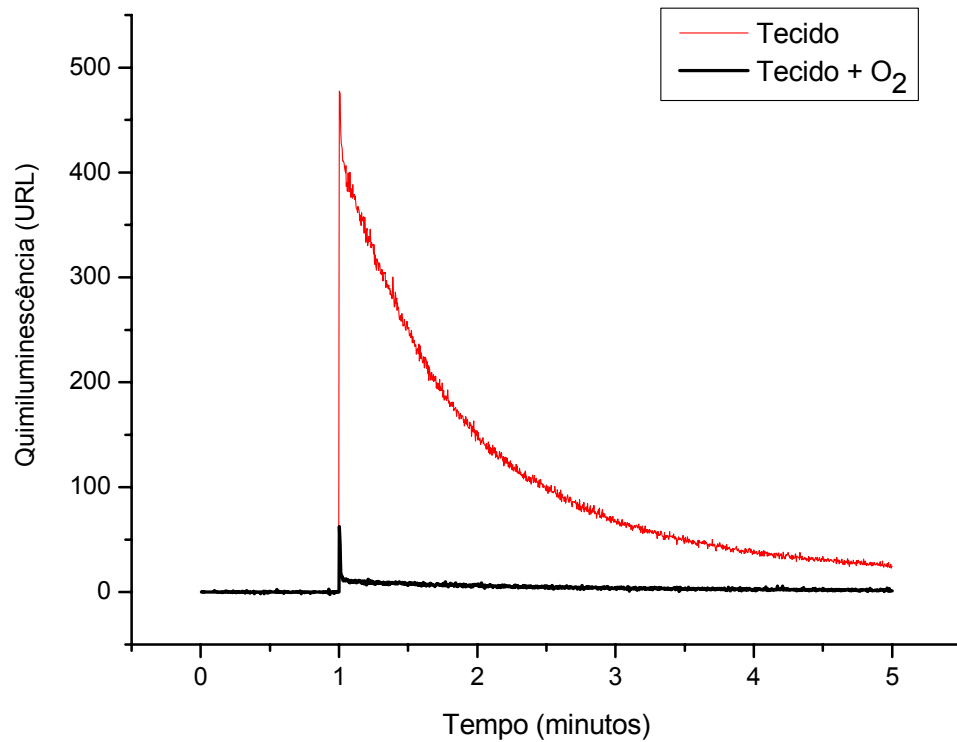
Na figura 13, estão representadas as curvas de quimiluminescência obtidas da análise em triplicata de uma amostra de tecido. As emissões apresentadas pela análise em triplicata foram altamente reprodutíveis (Altura:  $456,70 \pm 33,90$  URL).

A figura 14 mostra o efeito do tempo decorrido entre a homogeneização do tecido e o início de sua análise sobre a emissão de quimiluminescência. Houve diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) da quimiluminescência emitida pela amostra de tecido, passando de  $480,47 \pm 49,10$  URL quando analisada imediatamente após o seu preparo, para  $266,63 \pm 23,54$  URL após 1h.

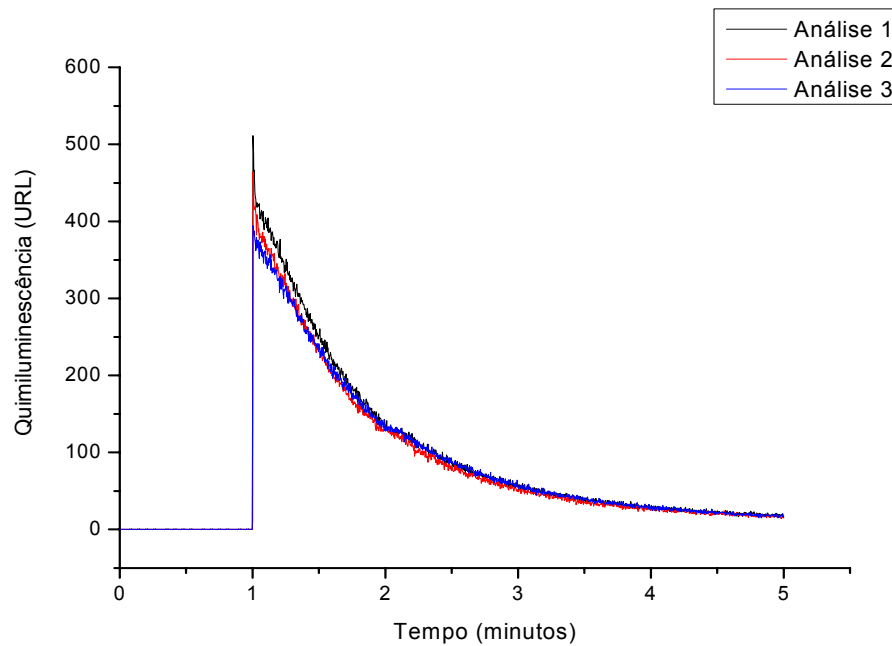
A figura 15 mostra o efeito da adição de excesso de  $\cdot\text{NO}$  sobre a quimiluminescência emitida por uma amostra de tecido. A emissão apresentada pelo tecido ( $480,47 \pm 49,10$  URL) foi extinta com o aumento da concentração de  $\cdot\text{NO}$  para  $376$  pM ( $6,50 \pm 0,25$  URL).



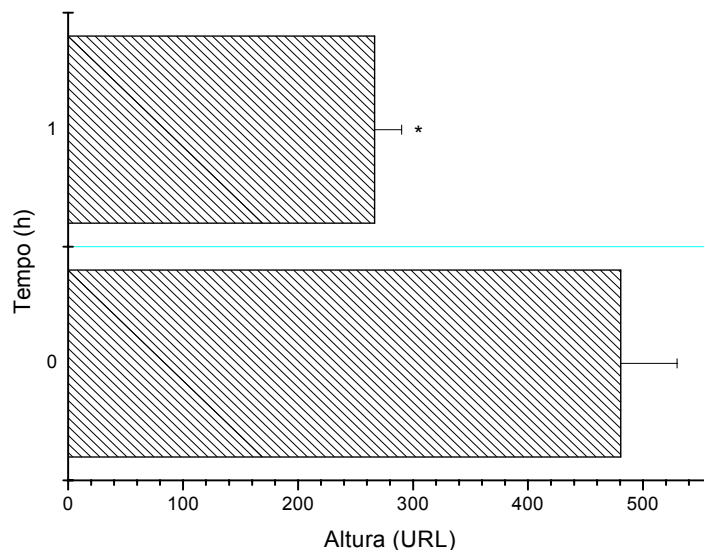
**Figura 11** – Quimiluminescência emitida por diferentes concentrações de tecido. A: Correlação com as curvas de quimiluminescência. B: Correlação com a altura e a área sob as curvas de quimiluminescência. Os homogenatos de músculo foram preparados em tampão  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2mM, pH 8,5, degaseificado com  $\text{N}_2$ . Foram testadas diferentes concentrações de tecido (m/v), variando de 0,00125 a 0,05%, com a finalidade de definir a concentração ideal (livre de “quençh”) para a análise de  $\cdot\text{NO}$ . Os valores mostrados correspondem às médias  $\pm$  EPM, obtidos de análises em triplicata



**Figura 12** – Efeito da saturação de uma amostra de tecido com O<sub>2</sub> sobre a quimiluminescência. Uma amostra de tecido obtida de um animal do grupo Controle foi preparada na concentração de 0,0025% (m/v), utilizando Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2 mM, pH 8,5 e, a seguir, foi degaseificada com O<sub>2</sub> durante 30 min. As curvas correspondem às curvas médias obtidas de análises em triplicata.

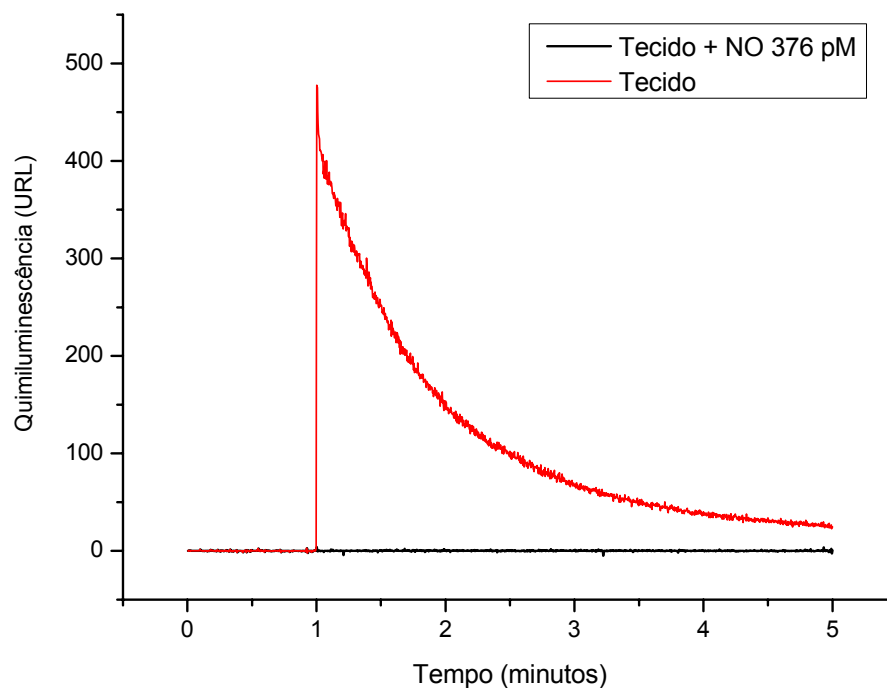


**Figura 13** – Representação das curvas de quimiluminescência obtidas da análise em triplicata de uma amostra de tecido. Para o preparo da amostra, foi adotada a concentração de tecido de 0,0025% (m/v). Os homogenatos foram preparados em tampão  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2mM, pH 8,5 degaseificado com  $\text{N}_2$ , usando o músculo de um animal do grupo Controle.



**Figura 14** – Efeito do tempo sobre a quimiluminescência. Uma amostra de tecido obtida de um animal do grupo Controle foi preparada na concentração de 0,0025% (m/v), utilizando  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2 mM, pH 8,5. A amostra foi analisada em triplicata imediatamente após o seu preparo (0h) e após 1h. Os valores correspondem às médias  $\pm$  EPM de análises em triplicata. Os dados foram analisados utilizando o teste t pareado. \* $p < 0,01$  em relação a 0h.

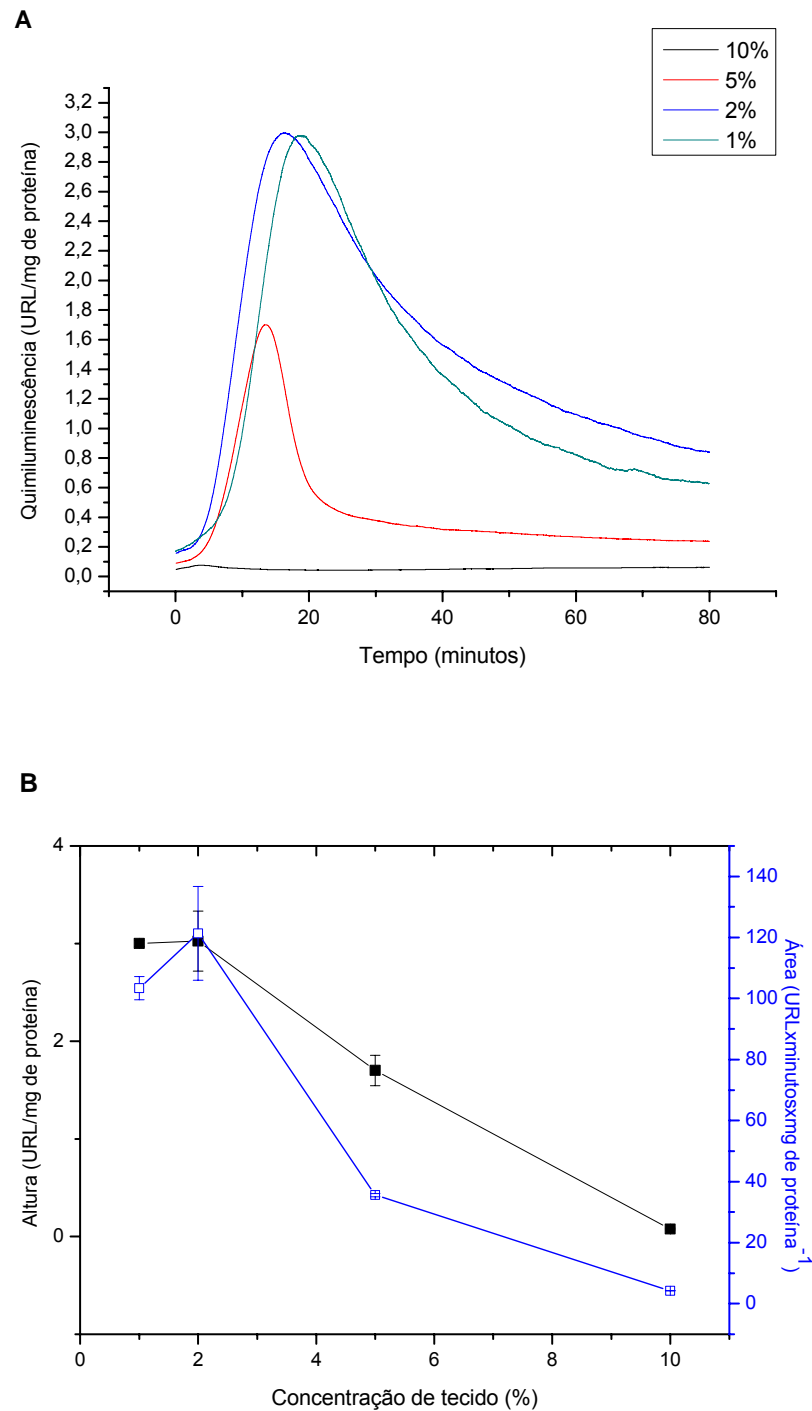




**Figura 15** – Efeito da adição de excesso de  $\cdot\text{NO}$  sobre a quimiluminescência. O  $\cdot\text{NO}$  foi sintetizado através de uma reação de redução de  $\text{NO}_2^-$  em meio ácido.  $\cdot\text{NO}$  padrão 376 pM, com o pH previamente ajustado para 8,5, foi adicionado a uma amostra de tecido de um animal do grupo Controle. A amostra de tecido foi preparada na concentração de 0,0025% (m/v), utilizando  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2mM, pH 8,5. As curvas apresentadas correspondem às curvas médias obtidas de análises em triplicata.

#### 4.2 ENSAIO DE QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR T-BUTIL HIDROPERÓXIDO

A figura 16A mostra a quimiluminescência emitida por diferentes concentrações de tecido (m/v). A figura 16B correlaciona os valores de altura e área sob as curvas de quimiluminescência com a concentração de tecido. A emissão diminuiu de forma dependente da concentração entre 2 e 10%, caracterizando a ocorrência de “quench” nesta faixa de concentração. Por outro lado, entre 1 e 2% não houve alteração da intensidade de quimiluminescência emitida. Desta forma, foi adotada para as análises a concentração de 1%.



**Figura 16** – Quimiluminescência induzida por t-butil hidroperóxido emitida por diferentes concentrações de tecido. A: Correlação com as curvas de quimiluminescência. B: Correlação com a altura e a área sob as curvas de quimiluminescência. O músculo gastrocnêmio de um animal experimental (T5) foi homogeneizado em  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mM / KCl 120 mM, pH 7,4, utilizando concentrações de tecido variáveis (1 a 10% m/v). Os homogenatos obtidos foram centrifugados a 600xg, a 4°C, durante 15 min. Os sobrenadantes foram utilizados para a análise de quimiluminescência. Os valores correspondem às médias de análises em duplicata  $\pm$  EPM.

### 4.3 ENVOLVIMENTO DO $\dot{\text{NO}}$ NA LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO

Neste estudo, utilizamos o ensaio de quimiluminescência induzida pelo sistema  $\text{H}_2\text{O}_2$ -luminol para a quantificação de  $\dot{\text{NO}}$  em amostras de tecido.

Ao analisarmos amostras de hemolisado através deste método, elevada emissão de quimiluminescência foi observada (dados não mostrados), demonstrando a presença de altas concentrações de  $\dot{\text{NO}}$  nos eritrócitos. O procedimento de exsangüinamento pré-isquemia foi adotado com a finalidade de evitar o acúmulo de sangue na pata submetida à isquemia e o fenômeno de não reperfusão. Desta forma, a interferência do sangue na análise de  $\dot{\text{NO}}$  do músculo esquelético foi removida (dados não mostrados), assegurando também a reperfusão do tecido. A medida da formação de edema de pata foi utilizada para estimar o acúmulo de sangue na pata submetida à LIR experimental. Foram utilizados para a análise de  $\dot{\text{NO}}$  somente os animais que apresentaram edema após a reperfusão.

A tabela 4 mostra os valores de edema de pata (%) apresentados durante a realização do protocolo de isquemia-reperfusão experimental em ratos. Após a isquemia, o edema foi mínimo, não alcançando 6%. A partir do início da reperfusão, como esperado, o edema aumentou progressiva e acentuadamente. Após a primeira hora de reperfusão, o edema atingiu 60%, permanecendo neste patamar até o final das 4h de reperfusão. Com o uso de AG ou LNAME 1h antes do início da reperfusão, houve uma tendência de diminuição do edema, embora não tenha havido diferenças significativas em relação ao grupo não tratado. O tratamento com DFO não alterou a formação de edema.

**Tabela 4** – Edema de pata observado em animais submetidos à isquemia-reperfusão experimental (%)

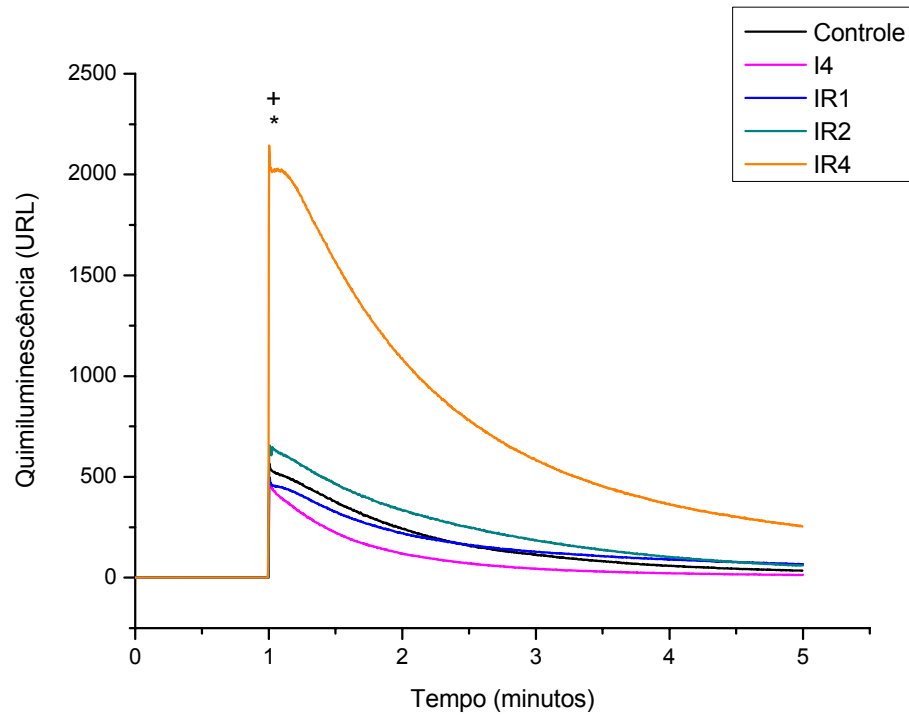
|             | I4          | R1            | R2            | R4            |
|-------------|-------------|---------------|---------------|---------------|
| Não tratado | 3,90 ± 1,41 | 60,79 ± 10,82 | 52,70 ± 9,71  | 62,01 ± 11,81 |
| AG          | 3,56 ± 1,57 | 38,57 ± 12,27 | 35,02 ± 13,12 | 46,36 ± 13,21 |
| LNAME       | 4,14 ± 1,88 | 43,81 ± 9,74  | 66,30 ± 7,02  | 53,72 ± 8,94  |
| DFO         | 5,71 ± 1,56 | 63,27 ± 9,68  | 64,99 ± 7,70  | 61,11 ± 5,87  |

As patas foram medidas antes da indução de isquemia, após 4 h de isquemia (I<sub>4</sub>) e após 1 (R<sub>1</sub>) 2 (R<sub>2</sub>) e 4 h (R<sub>4</sub>) de reperfusão. O edema foi calculado pelo aumento (%) da medida de espessura da pata em relação à medida realizada antes da indução de isquemia. Aminoguanidina (AG – 50mg/kg), LNAME (20mg/kg) e desferrioxamina (DFO – 60mg/kg) foram administrados ip 1 h antes de iniciar a reperfusão. Após a reperfusão, houve aumento significativo (p<0,001) na formação de edema. O tratamento com as drogas supracitadas não reverteram o desenvolvimento do edema. Não tratado (n=13), AG (n=5), LNAME (n=5), DFO (n=5).

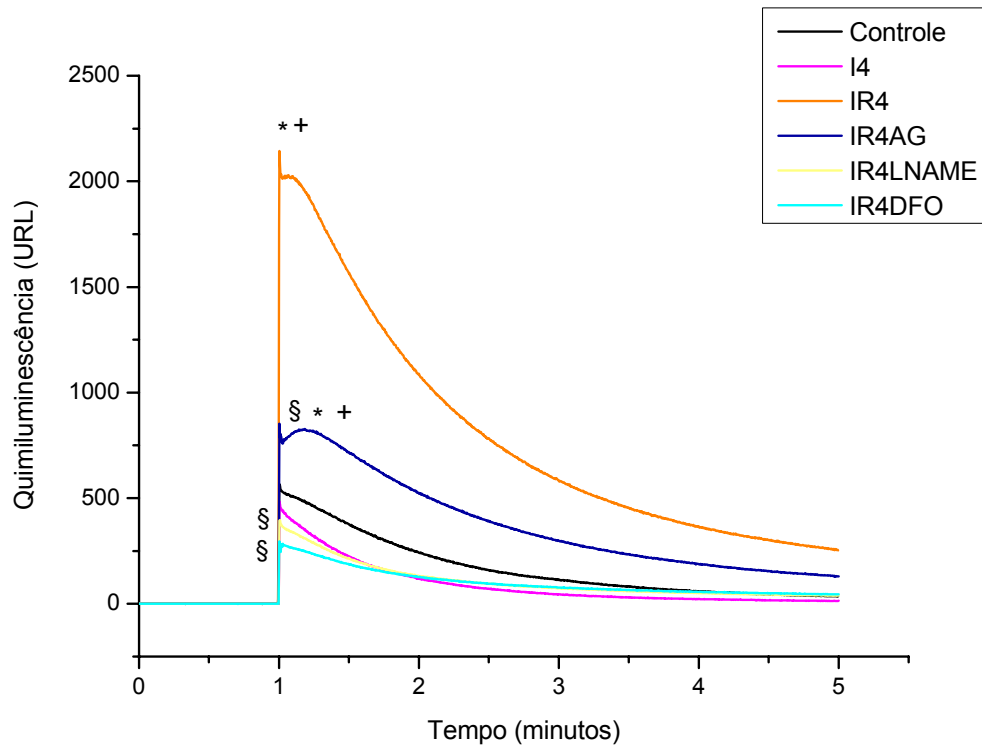
A figura 17 representa as curvas de quimiluminescência iniciada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-luminol dos grupos controle e experimentais. A isquemia com duração de 4 h não alterou a emissão de quimiluminescência em relação ao grupo Controle. 1 e 2 h de reperfusão também não modificaram o perfil de quimiluminescência. Entretanto, foi evidenciado aumento marcante na emissão após 4 h de reperfusão ( $p < 0,001$ ).

A figura 18 ilustra o efeito do uso de inibidores de NOS ou de quelante de ferro sobre a quimiluminescência iniciada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-luminol, emitida após 4 h de reperfusão. Houve redução significativa ( $p < 0,001$ ) de emissão de quimiluminescência com o uso de AG ( $p < 0,001$ ). Por outro lado, com a utilização de LNAME ou de DFO houve bloqueio do aumento observado após 4 h.

Na tabela 5, estão expressos os valores de <sup>•</sup>NO em músculo esquelético de ratos (fmol / g de tecido) para os grupos controle e experimental, calculados a partir da altura ou da área sob as curvas de quimiluminescência iniciada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-luminol. Utilizando ambos os parâmetros, a quimiluminescência revelou aumento de aproximadamente 4 vezes na concentração de <sup>•</sup>NO após 4 h de reperfusão (Altura:  $18,25 \pm 2,04$ ; Área:  $16,36 \pm 2,60$ ) em relação ao grupo Controle (Altura:  $4,73 \pm 0,243$ ; Área:  $3,52 \pm 0,14$ ). O tratamento com AG reduziu significativamente a concentração de NO (Altura:  $8,08 \pm 0,69$ ; Área:  $7,76 \pm 0,05$ ) após 4 h de reperfusão. O aumento observado após 4 h de reperfusão foi inibido pelo LNAME (Altura:  $3,33 \pm 0,29$ ; Área:  $2,24 \pm 0,18$ ) e pela DFO (Altura:  $2,83 \pm 0,30$ ; Área:  $2,12 \pm 0,27$ ) até o valor basal, representado pelo grupo controle. Nem a isquemia, nem as 2 primeiras horas de reperfusão, entretanto, alteraram a concentração de <sup>•</sup>NO no músculo esquelético de ratos.



**Figura 17** – Comparação entre as curvas de quimiluminescência iniciada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-luminol, obtidas pelos grupos controle e experimentais. O grupo Controle consistiu de animais que não foram submetidos à isquemia; I4, de animais submetidos a 4 h de isquemia; IR1, de animais submetidos a 1 h de reperfusão; IR2, de animais submetidos a 2 h de reperfusão; IR4, de animais submetidos a 4 h de reperfusão. \*p<0,001 em relação ao grupo Controle. + p<0,001 em relação ao grupo I4. Controle (n = 9), I4 (n = 9), IR1 (n = 12), IR2 (n = 9), IR4 (n = 15).



**Figura 18** – Efeito dos inibidores de NOS e do quelante de ferro sobre a quimiluminescência iniciada por  $H_2O_2$ -luminol, emitida pelo músculo esquelético após 4 h de reperfusão. O grupo Controle consistiu de animais que não foram submetidos à isquemia; I4, de animais submetidos a 4 h de isquemia; IR4, de animais submetidos a 4 h de reperfusão. IR4AG, IR4LNAME e IR4DFO, respectivamente de animais tratados com AG (50mg/kg), LNAME (20mg/kg), DFO (60mg/kg) ip 1 h antes de iniciar as 4 h de reperfusão. \* $p < 0,001$  em relação ao Controle. +  $p < 0,001$  em relação a I4. §  $p < 0,001$  em relação a IR4. Controle (n = 9), I4 (n = 9), IR4 (n = 15), IR4AG (n = 15), IR4LNAME (n = 15), IR4DFO (n = 15).

**Tabela 5** – Concentração de  $\dot{N}O$  em músculo esquelético de ratos submetidos à isquemia-reperfusão experimental

| Grupos   | $\dot{N}O$ (fmol / g de tecido) |                           |
|----------|---------------------------------|---------------------------|
|          | Altura                          | Área                      |
| Controle | 4,73 ± 0,24 <sup>a*</sup>       | 3,52 ± 0,14 <sup>a*</sup> |
| I4       | 4,16 ± 0,99 <sup>a*</sup>       | 1,91 ± 0,31 <sup>a*</sup> |
| IR1      | 4,26 ± 0,32 <sup>a*</sup>       | 3,57 ± 0,23 <sup>a*</sup> |
| IR2      | 5,84 ± 1,27 <sup>a*</sup>       | 4,92 ± 1,36 <sup>a*</sup> |
| IR4      | 18,25 ± 2,04 <sup>b</sup>       | 16,36 ± 2,60 <sup>b</sup> |
| IR4AG    | 8,08 ± 0,69 <sup>c*</sup>       | 7,76 ± 0,05 <sup>c*</sup> |
| IR4LNAME | 3,33 ± 0,29 <sup>a*</sup>       | 2,24 ± 0,18 <sup>a*</sup> |
| IR4DFO   | 2,83 ± 0,30 <sup>a*</sup>       | 2,12 ± 0,27 <sup>a*</sup> |

Os valores de  $\dot{N}O$  foram calculados a partir dos coeficientes angulares das retas obtidas por regressão linear, utilizando como parâmetros a altura e a área sob as curvas de quimiluminescência iniciada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-luminol, resultantes das análises das soluções de  $\dot{N}O$  padrão. O grupo Controle consistiu de animais que não foram submetidos à isquemia; I4, de animais submetidos a 4 h de isquemia; IR1, de animais submetidos a 1 h de reperfusão; IR2, de animais submetidos a 2 h de reperfusão; IR4, de animais submetidos a 4 h de reperfusão; IR4AG, IR4LNAME e IR4DFO, respectivamente, de animais tratados com AG (50mg/kg), LNAME (20mg/kg), DFO (60mg/kg) ip 1 h antes de iniciar as 4 h de reperfusão. Letras distintas correspondem a valores significativamente diferentes. \* p<0,001 em relação a IR4. Controle (n = 9), I4 (n = 9), IR1 (n = 12), IR2 (n = 9), IR4 (n = 15), IR4AG (n = 15), IR4LNAME (n = 15), IR4DFO (n = 15).

#### 4.4 ENVOLVIMENTO DO $\dot{N}O$ NA CAQUEXIA INDUZIDA PELO TUMOR DE WALKER-256

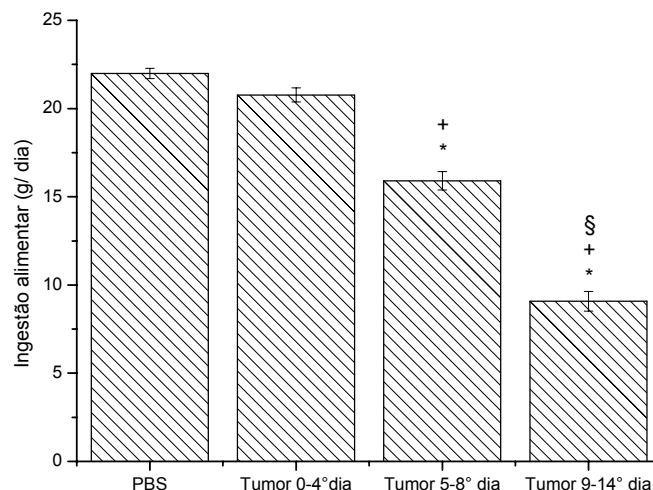
A figura 19 mostra a ingestão alimentar (g/dia) apresentada pelos animais com tumor de Walker-256 ao longo de 14 dias. Não houve diferença com relação à ingestão alimentar até o 4º dia após o implante do tumor (20,77 ± 0,40), quando comparada com a apresentada pelos animais controles inoculados com PBS e alimentados *ad libitum* (21,98 ± 0,29). Entre o 5º e o 8º dias, entretanto, a ingestão alimentar foi reduzida para cerca de 70% (15,90 ± 0,52) em relação ao controle, diminuindo até 42% (9,08 ± 0,56) entre o 9º e o 14º dias.

O tratamento com AG não alterou a ingestão alimentar diária dos animais inoculados com PBS (19,85 ± 0,83). Entretanto, com o LNAME houve redução significativa (13,13 ± 0,44; p<0,001) em relação ao grupo alimentado *ad libitum* (21,98 ± 0,29) (figura 20).

A figura 21 representa os indicadores de caquexia apresentados pelos grupos experimentais e pelos respectivos controles PBS/ Pair Fed. Pouca perda de massa

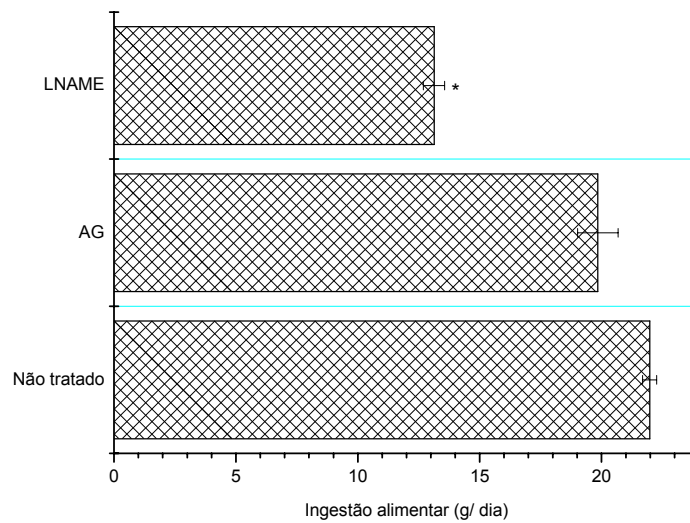
corpórea (%) foi observada em T3 ( $1,30 \pm 0,61$ ). A partir do 5º dia após o implante do tumor, contudo, houve aumento progressivo da perda de massa corpórea. Em T5, a perda de massa corpórea foi de  $10,66 \pm 1,24$ , alcançando, respectivamente,  $20,15 \pm 0,25$  e  $19,88 \pm 0,64$  em T10 e T14. Quando avaliada a perda de massa muscular (%), observamos perda considerável a partir de T3 ( $7,36 \pm 2,76$ ), chegando a  $11,63 \pm 2,21$  em T5 e a  $35,38 \pm 1,60$  e  $33,09 \pm 22,91$ , respectivamente, em T10 e T14. A restrição alimentar visando simular a anorexia observada nos grupos experimentais promoveu significativa perda de massa corpórea e de massa muscular em PBS/ Pair Fed 10 (perda de massa corpórea:  $11,35 \pm 1,08$ ; perda de massa muscular:  $5,26 \pm 0,38$ ) e PBS/ Pair Fed 14 (perda de massa corpórea:  $17,96 \pm 1,20$ ; perda de massa muscular:  $9,11 \pm 1,03$ ). Por outro lado, a perda de massa corpórea foi mínima em PBS/ Pair Fed 5 ( $2,53 \pm 1,46$ ) e, quando avaliada a massa muscular, houve ganho de massa em vez de perda ( $-7,56 \pm 1,03$ ). As perdas de massa corpórea e muscular nos grupos experimentais foram significativamente superiores ( $p < 0,001$ ) em relação às apresentadas pelos grupos controles PBS/ Pair Fed.

Os animais inoculados com PBS e tratados com LNAME apresentaram perdas de massa corpórea ( $4,73 \pm 1,15$ ) e muscular ( $17,83 \pm 4,79$ ) superiores às do grupo Pair Fed 5 ( $-7,56 \pm 1,03$  e  $2,53 \pm 1,46$ , respectivamente). Por outro lado, pouca perda de massa corpórea e muscular foi observada com o uso de AG (figura 22).

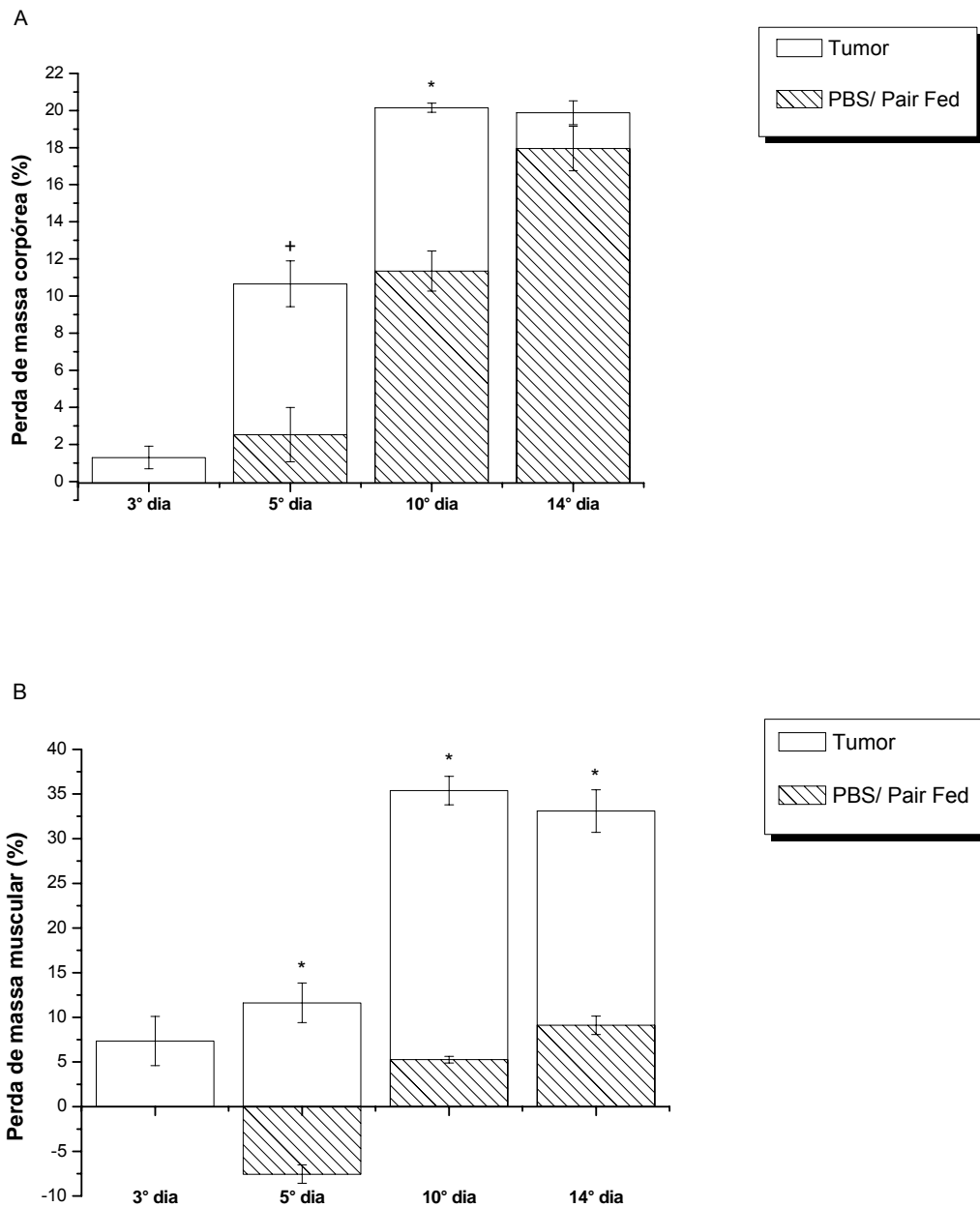


**Figura 19** – Ingestão alimentar apresentada pelos ratos com caquexia induzida pelo tumor de Walker-256. Os animais foram inoculados com 0,5mL de PBS ou  $8 \times 10^7$  células tumorais sc na porção lateral da pata posterior direita e alimentados *ad libitum*. Durante 14 dias, a ingestão alimentar destes animais foi monitorada diariamente. \*  $p < 0,001$  em relação ao PBS; +  $p < 0,001$  em relação ao Tumor 0-4º dia; §  $p < 0,001$  em relação ao Tumor 5-8º dia.

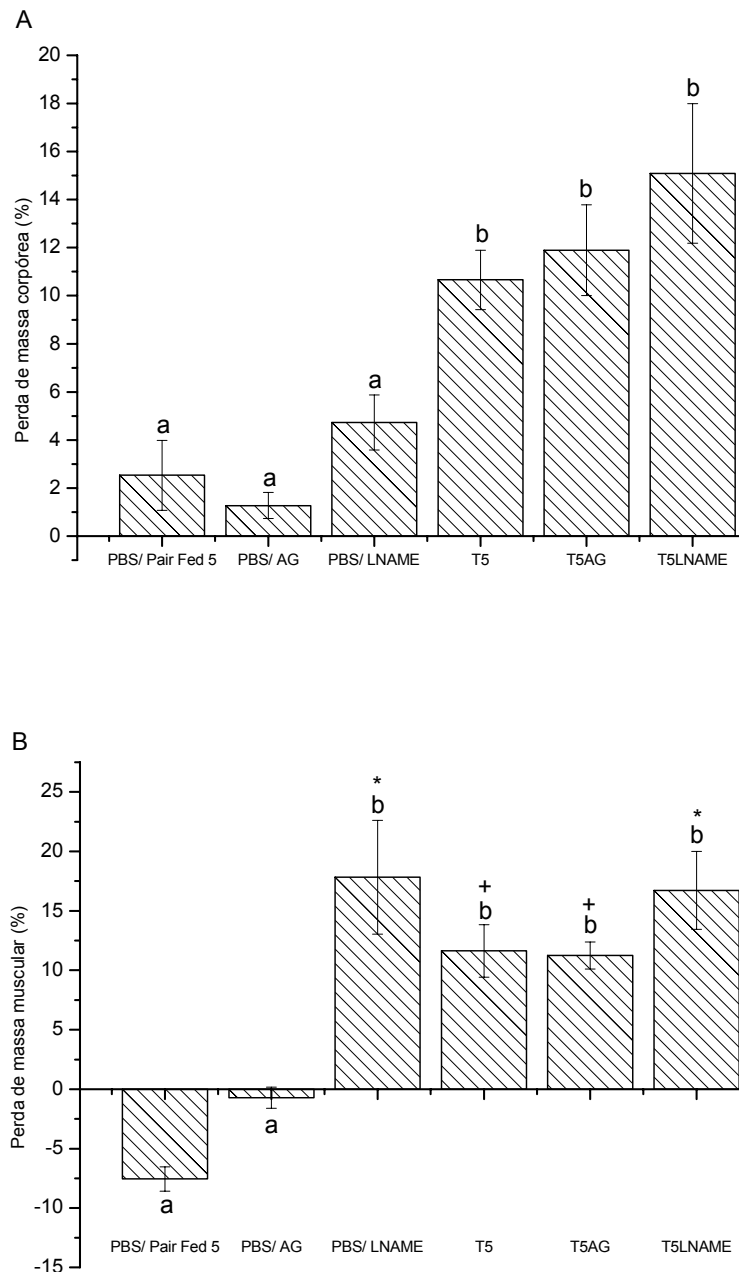




**Figura 20** – Ingestão alimentar apresentada por animais tratados com inibidores de NOS. Ratos Wistar machos adultos inoculados sc com 0,5 mL de PBS na porção lateral da pata posterior direita foram tratados com AG (50 mg/kg) ou LNAME (20 mg/kg) ip, durante 6 dias, e tiveram a ingestão alimentar monitorada diariamente. A ingestão alimentar diária destes animais foi comparada com a apresentada por animais não tratados e inoculados com PBS, conforme descrito anteriormente, e alimentados *ad libitum* durante 14 dias.  
\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo não tratado. PBS/ não tratado (n=3); PBS/ AG (n=3); PBS/ LNAME (n=3).



**Figura 21** – Estabelecimento da caquexia em ratos com tumor de Walker-256. Ratos Wistar machos foram inoculados com 0,5 mL de suspensão de células tumorais ( $8 \times 10^7$  células) ou com 0,5 mL de PBS sc na porção lateral da pata posterior direita. Os animais inoculados com PBS foram alimentados de forma semelhante (Pair Fed) à ingestão apresentada pelos grupos experimentais. Após 3, 5, 10 ou 14 dias, os animais foram pesados e anestesiados com pentobarbital ip (50 mg/kg) para a excisão dos músculos gastrocnêmios contralaterais. A caquexia foi avaliada através de dois indicadores: A) Perda de massa corpórea e B) Perda de massa muscular, calculados conforme descrito em materiais e métodos. \*  $p < 0,001$  e <sup>+</sup>  $p < 0,05$  em relação aos respectivos grupos controles PBS/ Pair Fed. PBS/ Pair Fed 5 (n=3); PBS/ Pair Fed 10 (n=3); PBS/ Pair Fed 14 (n=3); T3 (n=3); T5 (n=3); T10 (n=3); T14 (n=3).



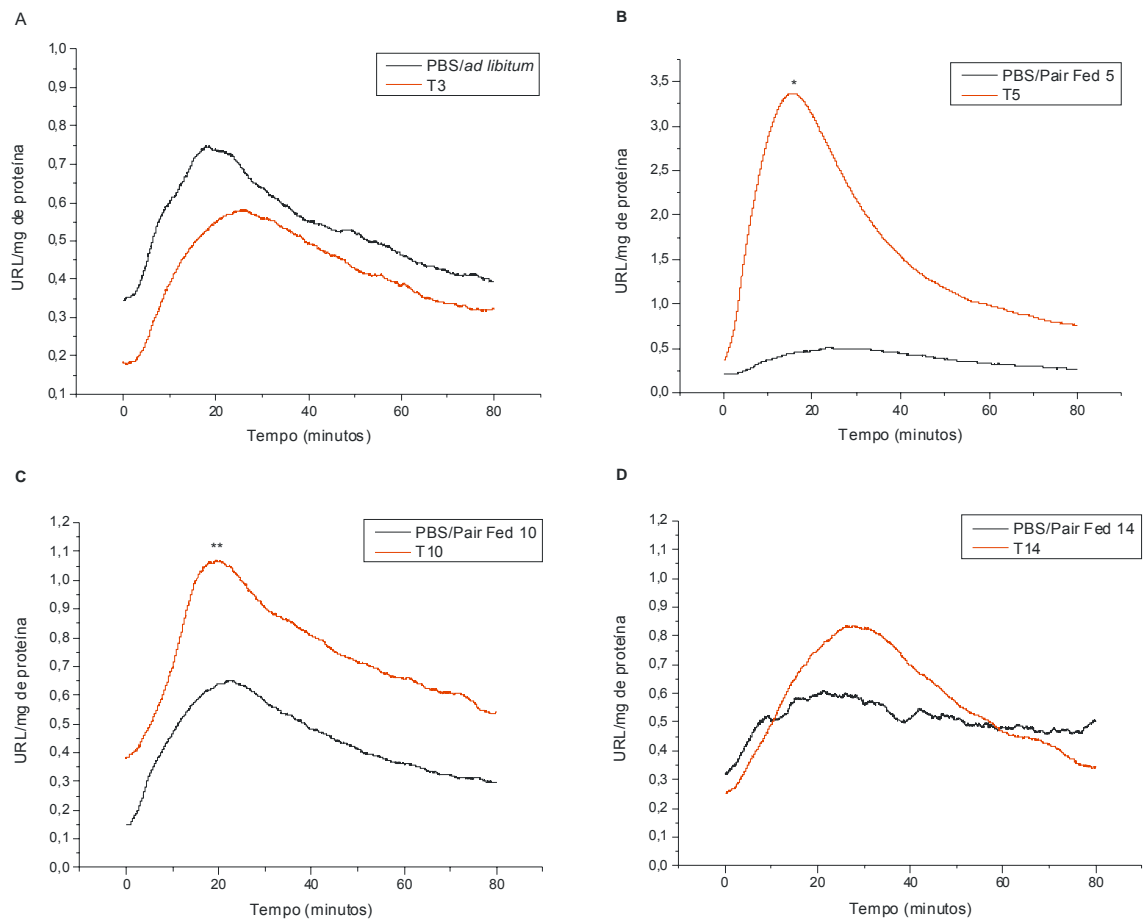
**Figura 22** – Efeito dos inibidores de NOS sobre as perdas de massa corpórea (A) e muscular (B). Animais inoculados sc, com 0,5 mL de PBS ou  $8 \times 10^7$  células tumorais viáveis, na porção lateral da pata posterior direita foram tratados diariamente com AG (50 mg/kg) ou LNAME (20 mg/kg) durante 6 dias. Letras diferentes correspondem a valores significativamente diferentes. \*  $p < 0,001$  em relação a PBS/ Pair Fed 5; +  $p < 0,01$  em relação a PBS/ Pair Fed 5. PBS/ Pair Fed 5 (n=2); PBS/ AG (n=3); PBS/ LNAME (n=3); T5 (n=3); T5AG (n=3); T5LNAME (n=3).

A figura 23 ilustra a quimiluminescência induzida por t-butil hidroperóxido, emitida pelos grupos controles e experimentais. A quimiluminescência induzida por t-butil hidroperóxido reflete a concentração de hidroperóxidos lipídicos formados durante lesões peroxidativas causadas por estresse oxidativo e/ou nitrosativo. Cada grupo experimental foi comparado com o respectivo controle PBS/ Pair Fed. Em T3, a concentração de hidroperóxidos lipídicos não foi alterada. Por outro lado, em T5 houve aumento marcante (7 vezes). Em T10, a concentração de hidroperóxidos lipídicos permaneceu aumentada (2 vezes) em relação ao respectivo controle PBS/ Pair Fed, porém foi inferior à observada em T5, retornando a basal em T14.

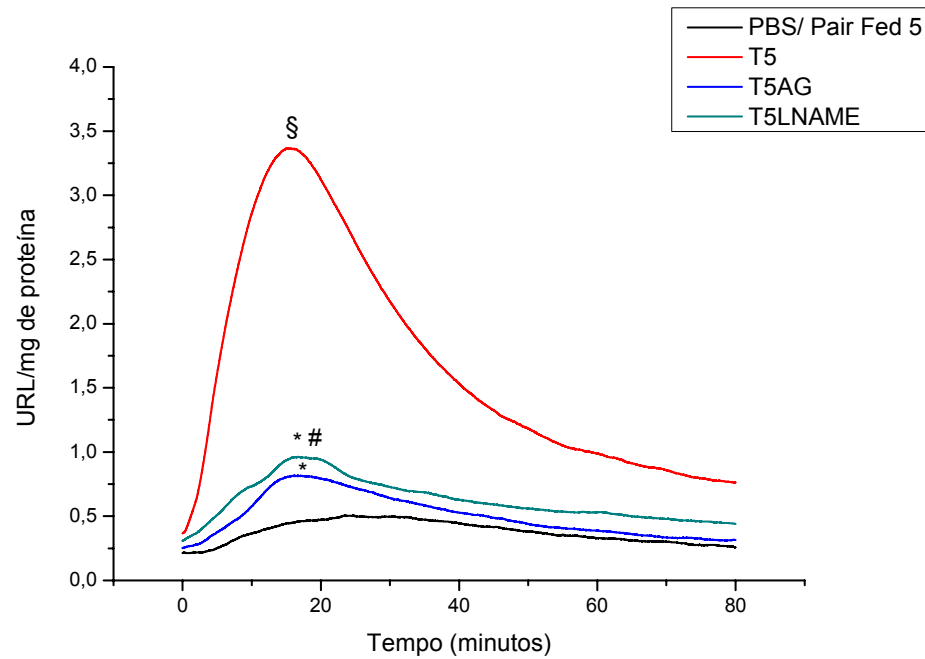
A figura 24 mostra o efeito do uso de inibidores de NOS sobre a concentração de hidroperóxidos lipídicos no músculo esquelético de animais do grupo T5. A AG e o LNAME bloquearam o aumento da concentração de lipoperóxidos.

A figura 25 mostra as curvas de quimiluminescência induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-luminol, que se correlaciona diretamente com a concentração de <sup>•</sup>NO, dos grupos controles e experimentais. A restrição alimentar a qual os animais dos grupos controles PBS/ Pair Fed foram submetidos resultou em decréscimo de emissão em relação ao grupo PBS/ *ad libitum*. Por isso, cada grupo experimental foi comparado com o respectivo grupo PBS/ Pair Fed. A emissão foi diminuída aproximadamente 4 vezes em T3, aumentando cerca de 2 vezes em T5. Em T10 e T14, contudo, a emissão não foi alterada no músculo esquelético.

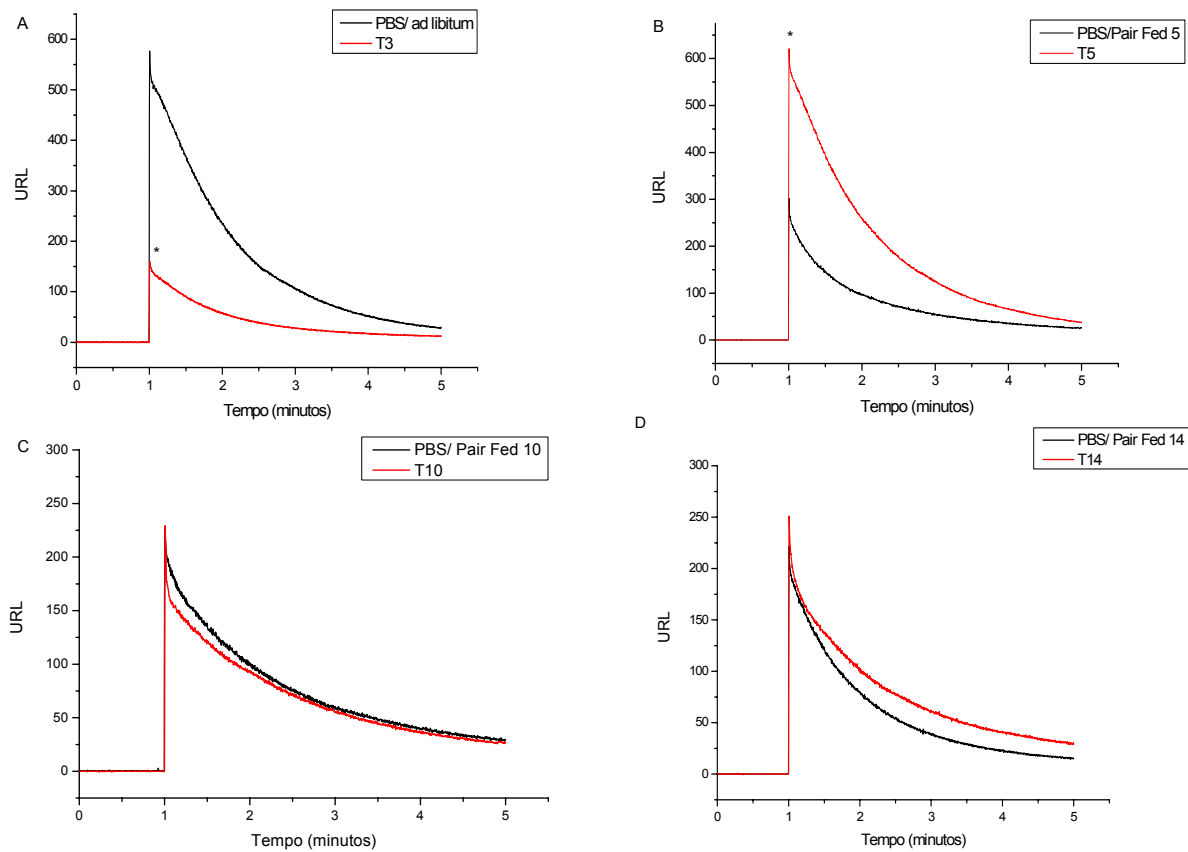
A figura 26 mostra o efeito dos inibidores de NOS sobre a emissão de quimiluminescência induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-luminol, observada em T5. Tanto a AG, quanto o LNAME evitaram o aumento de quimiluminescência observado em T5.



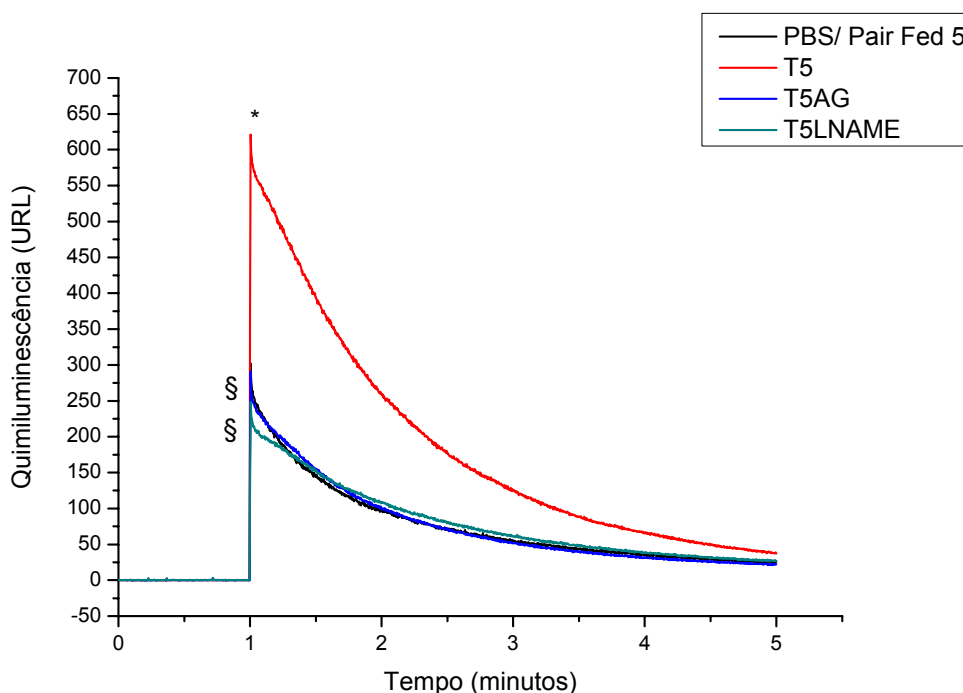
**Figura 23** – Quimiluminescência induzida por t-butil hidroperóxido para avaliação de lesão lipoperoxidativa em músculo esquelético de ratos com tumor de Walker-256. A: T3xPBS/ *ad libitum*; B: T5xPBS/ Pair Fed 5; C: T10xPBS/ Pair Fed 10; D: T14xPBS/ Pair Fed 14. Ratos Wistar machos foram inoculados com 0,5 mL de PBS ou de suspensão de células tumorais, contendo  $8 \times 10^7$  células, sc na porção lateral da pata posterior direita. Os animais inoculados com PBS foram alimentados de forma semelhante (Pair Fed) à ingestão apresentada pelos animais experimentais durante 3, 5, 10 ou 14 dias. Após estes intervalos de tempo, os músculos gastrocnêmios contralaterais foram removidos e homogeneizados em  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mM / KCl 120 mM, pH 7,4 (1% m/v). Os homogenatos obtidos foram centrifugados a  $600 \times g$ , a  $4^\circ\text{C}$ , durante 15 min e os sobrenadantes foram utilizados para a análise de quimiluminescência. \*  $p < 0,001$  em relação a PBS/Pair Fed 5; \*\*  $p < 0,05$  em relação a PBS/ Pair Fed 10. PBS/ *ad libitum* (n=6); PBS/ Pair Fed 5 (n=6); PBS/ Pair Fed 10 (n=6); PBS/ Pair Fed 14 (n=6); T3 (n=9); T5 (n=9); T10 (n=9); T14 (n=9).



**Figura 24** – Efeito dos inibidores de NOS sobre a quimiluminescência induzida por t-butil hidroperóxido em músculo esquelético de ratos 5 dias após o implante do tumor de Walker-256. Animais inoculados com  $8 \times 10^7$  células tumorais, sc, na porção lateral da pata posterior direita foram tratados com AG (50mg/kg) ou LNAME (20mg/kg), ip, um dia antes do inóculo e nos 5 dias posteriores. Após este período, os músculos gastrocnêmios contralaterais foram removidos e homogeneizados em  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  30 mM / KCl 120 mM, pH 7,4 (1% m/v). Os homogenatos obtidos foram centrifugados a 600xg, a 4°C, durante 15 min e os sobrenadantes foram utilizados para a análise de quimiluminescência. §  $p < 0,001$  em relação a PBS/Pair Fed 5; #  $p < 0,05$  em relação a PBS/Pair Fed 5; \*  $p < 0,001$  em relação a T5. PBS/ Pair Fed 5 (n=6); T5 (n=9); T5AG (n=9); T5LNAME (n=9).



**Figura 25** – Quimiluminescência induzida por  $H_2O_2$ -luminol para quantificação de  $^{\bullet}NO$  em músculo esquelético de ratos com tumor de Walker-256. A: T3xPBS/ *ad libitum*; B: T5xPBS/ Pair Fed 5; C: T10xPBS/ Pair Fed 10; D: T14xPBS/ Pair Fed 14. Ratos Wistar machos foram inoculados com 0,5 mL de PBS ou de suspensão de células tumorais, contendo  $8 \times 10^7$  células, sc na porção lateral da pata posterior direita. Os animais inoculados com PBS foram alimentados de forma semelhante (Pair Fed) à ingestão apresentada pelos animais experimentais durante 3, 5, 10 ou 14 dias. Os músculos gastrocnêmios foram homogeneizados em  $Na_2CO_3$  2 mM, pH 8,5 (0,05% m/v) e diluídos 20 vezes para a análise de quimiluminescência. \*  $p < 0,001$  em relação ao respectivo grupo PBS/Pair Fed. PBS/ *ad libitum* (n=6); PBS/ Pair Fed 5 (n=6); PBS/ Pair Fed 10 (n=6); PBS/ Pair Fed 14 (n=6); T3 (n=9); T5 (n=9); T10 (n=9); T14 (n=9)



**Figura 26** – Efeito dos inibidores de NOS sobre a quimiluminescência induzida por  $H_2O_2$ -luminol em músculo esquelético de ratos 5 dias após o implante do tumor de Walker-256. Animais inoculados com  $8 \times 10^7$  células tumorais sc na porção lateral da pata posterior direita foram tratados com AG (50mg/kg) ou LNAME (20mg/kg), ip, um dia antes do inóculo e nos 5 dias posteriores. Os músculos gastrocnêmios foram homogeneizados em  $Na_2CO_3$  2 mM, pH 8,5 (0,05% m/v) e diluídos 20 vezes para a análise de quimiluminescência. \*  $p < 0,001$  em relação a PBS/ Pair Fed 5; §  $p < 0,001$  em relação a T5. PBS/ Pair Fed 5 (n=6); T5 (n=9); T5AG (n=9); T5LNAME (n=9).

Na tabela 6, estão expressas as concentrações de  $\dot{NO}$  (fmol/g de tecido) no músculo esquelético de ratos durante o estabelecimento da caquexia induzida por tumor de Walker-256. A restrição alimentar simulando a anorexia observada nos animais experimentais (PBS/ Pair Fed) resultou em decréscimo da concentração de  $\dot{NO}$  para  $2,52 \pm 0,25$  (PBS/ Pair Fed 5),  $1,96 \pm 0,14$  (PBS/ Pair Fed 10) e  $1,84 \pm 0,11$  (PBS/ Pair Fed 14) em relação ao grupo PBS/ *ad libitum* ( $4,81 \pm 0,18$ ). Para descartar este efeito, os grupos experimentais foram comparados com os respectivos grupos controles PBS/ Pair Fed. A concentração de  $\dot{NO}$  foi reduzida em T3 ( $1,35 \pm 0,15$ ), aumentando significativamente ( $p < 0,001$ ) em T5 ( $5,20 \pm 0,48$ ), momento em que as perdas de massa corpórea e muscular tornaram-se significativas. Por outro lado, a concentração de  $\dot{NO}$  não foi modificada em T10 ( $1,92 \pm 0,08$ ) e T14 ( $2,13 \pm 0,32$ ). O aumento observado em T5 foi inibido até o valor basal ( $2,52 \pm 0,25$ ) pela AG ( $2,41 \pm$



0,20) e pelo LNAME ( $2,06 \pm 0,18$ ). Entretanto, estes inibidores não modificaram as perdas de massa corpórea e muscular observadas em T5. O crescimento tumoral (g) foi progressivo, aumentando de  $1,42 \pm 0,35$  em T3 até  $19,16 \pm 0,56$  e  $18,97 \pm 3,19$ , respectivamente, em T10 e T14. Com o uso dos inibidores de NOS, houve aumento significativo ( $p < 0,001$ ) da massa tumoral para  $7,44 \pm 0,66$  (AG) e  $10,34 \pm 0,42$  (LNAME), em relação à apresentada pelo grupo T5 não tratado ( $4,32 \pm 0,59$ ).

**Tabela 6** – Concentração de  $\dot{\text{N}}\text{O}$  em músculo esquelético de ratos durante o estabelecimento da caquexia induzida por tumor de Walker-256

| Grupo                         | Músculo (g)                 | Tumor (g)                     | Perda de massa corpórea (%)   | Perda de massa muscular (%) | $\dot{\text{N}}\text{O}$ (fmol/g de tecido) |
|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|---|
| <b>PBS/ <i>ad libitum</i></b> | $1,22 \pm 0,04^a$           | ---                           | ---                           | ---                         | $4,81 \pm 0,18^a$                           |
| <b>PBS/Pair Fed 5</b>         | $1,39 \pm 0,05^a$           | ---                           | $2,53 \pm 1,46^a$             | $-7,56 \pm 1,03^a$          | $2,52 \pm 0,25^b$                           |
| <b>PBS/Pair Fed 10</b>        | $1,29 \pm 0,03^a$           | ---                           | $11,35 \pm 1,08^b$            | $5,26 \pm 0,38^b$           | $1,96 \pm 0,14^b$                           |
| <b>PBS/Pair Fed 14</b>        | $1,16 \pm 0,05^a$           | ---                           | $17,96 \pm 1,20^c$            | $9,11 \pm 1,02^c$           | $1,84 \pm 0,11^b$                           |
| <b>T3</b>                     | $1,05 \pm 0,09^b$           | $1,42 \pm 0,35^a$             | $1,30 \pm 0,61^a$             | $7,36 \pm 2,76^c$           | $1,35 \pm 0,15^{b\text{¥}}$                 |
| <b>T5</b>                     | $1,04 \pm 0,06^{b\text{§}}$ | $4,32 \pm 0,59^b$             | $10,67 \pm 1,24^{b\text{§}}$  | $11,63 \pm 2,21^{c*}$       | $5,20 \pm 0,48^{a*}$                        |
| <b>T5AG</b>                   | $1,09 \pm 0,06^b$           | $7,44 \pm 0,66^c$             | $11,90 \pm 1,89^b$            | $11,24 \pm 1,13^c$          | $2,41 \pm 0,20^{b\text{¶¶}}$                |
| <b>T5LNAME</b>                | $0,95 \pm 0,10^c$           | $10,34 \pm 0,42^d$            | $15,09 \pm 2,90^b$            | $16,71 \pm 3,28^c$          | $2,06 \pm 0,18^{b\text{¶¶}}$                |
| <b>T10</b>                    | $0,80 \pm 0,04^{c+}$        | $19,16 \pm 0,56^{c\text{¶¶}}$ | $20,15 \pm 0,24^{d\text{§§}}$ | $35,38 \pm 1,60^{d+}$       | $1,92 \pm 0,08^b$                           |
| <b>T14</b>                    | $0,85 \pm 0,03^{c\text{¶}}$ | $18,97 \pm 3,19^{c\text{¶¶}}$ | $19,88 \pm 0,64^d$            | $33,09 \pm 2,37^{d\#}$      | $2,13 \pm 0,32^b$                           |

O  $\dot{\text{N}}\text{O}$  foi quantificado em músculo esquelético de ratos por quimiluminescência, utilizando a altura das curvas. Os grupos controles consistiram de animais inoculados com 0,5mL de PBS, sc, na porção lateral da pata posterior direita e alimentados de forma semelhante (Pair Fed) à ingestão apresentada pelos animais inoculados com  $8 \times 10^7$  células tumorais. Os grupos T3, T5, T10 e T14 consistiram, respectivamente, de animais no 3º, 5º, 10º e 14º dia após o inóculo de células tumorais. Letras distintas correspondem a valores significativamente diferentes. ¥  $p < 0,001$  em relação a PBS/ *ad libitum*; \*  $p < 0,001$  em relação a PBS/Pair Fed 5; +  $p < 0,001$  em relação a PBS/Pair Fed 10; #  $p < 0,001$  em relação a PBS/Pair Fed 14; §  $p < 0,05$  em relação a PBS/Pair Fed 5; §§  $p < 0,05$  em relação a PBS/Pair Fed 10; ¶  $p < 0,05$  em relação a PBS/Pair Fed 14; ¶¶  $p < 0,001$  em relação a T5. PBS/ *ad libitum* (n=6); PBS/Pair Fed 5 (n=6); PBS/Pair Fed 10 (n=6); PBS/Pair Fed 14 (n=6); T3 (n=9); T5 (n=9); T5AG (n=9); T5LNAME (n=9); T10 (n=9); T14 (n=9).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-LUMINOL

Para que a técnica originalmente descrita por Kikuchi et al. (1993) fosse utilizada no estudo de ambos os modelos experimentais, foi necessária a sua padronização para a análise de  $\cdot\text{NO}$  em músculo esquelético. Sabe-se que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> reage com o luminol, causando moderada emissão de fótons (KIKUCHI et al., 1993; FERREIRA; ROSSI, 2002). Para evitar a emissão pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as soluções de luminol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram preparadas separadamente e, a seguir, misturadas na proporção 1:1. Posteriormente, a mistura foi incubada durante 5 minutos, sob leve agitação. Neste intervalo de tempo, a quimiluminescência iniciada pela reação entre o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e o luminol tornou-se reduzida e estável (figura 9). Adotando este procedimento, foi possível eliminar a interferência do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e assegurar que toda emissão gerada fosse resultado apenas de  $\cdot\text{NO}$  preexistente na solução padrão ou nas amostras de tecido analisadas.

Em soluções fisiológicas, o  $\cdot\text{NO}$  apresenta meia-vida extremamente curta (<6 segundos), sendo facilmente oxidado a NO<sub>2</sub><sup>-</sup> e NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (KELM et al., 1988).

A instabilidade do  $\cdot\text{NO}$  na presença de O<sub>2</sub>, assim como a alta reatividade com biomoléculas, torna a análise desta substância em amostras biológicas um desafio (ARCHER et al., 1995). Para superar esta limitação, inúmeras estratégias têm sido adotadas para prolongar a meia-vida do  $\cdot\text{NO}$ . Beckman et al. (1990) e Archer e Cowan (1991) propuseram que a adição da enzima SOD tornaria o  $\cdot\text{NO}$  relativamente estável por impedir a sua reação com o O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Malinski e Taha (1992) e Hallstrom et al. (2002), por outro lado, evitaram a degradação do  $\cdot\text{NO}$  analisando-o diretamente no local de sua síntese, através da implantação de microeletrodos na parede de artérias. Greenberg et al. (1990), Arroyo e Khono (1991) e Lepore et al. (1999) utilizaram a hemoglobina, um potente “scavenger” de  $\cdot\text{NO}$ , para a detecção de produtos estáveis de nitrosilação através de ressonância paramagnética eletrônica. Kikuchi et al. (1993), Kojima et al. (1997), Yao et al. (2002) e Tsukada et al. (2003), por sua vez, limitaram a exposição das amostras ao O<sub>2</sub>, utilizando métodos de perfusão de órgãos ou de microdiálise associados a sistemas fechados de análise por quimiluminescência.

Sabe-se que o  $\cdot\text{NO}$  difunde-se rapidamente do local onde foi produzido até os tecidos adjacentes para exercer seus efeitos. Além disso, o  $\cdot\text{NO}$  produzido pelo endotélio ou que alcança a circulação permeia os eritrócitos e reage com a oxi-hemoglobina, formando metemoglobina e  $\text{NO}_3^-$  (DEJAM et al., 2004). Para uma análise mais abrangente da produção de  $\cdot\text{NO}$  no músculo esquelético, optamos pela análise de homogenatos de tecido, apesar deste procedimento aumentar a susceptibilidade do  $\cdot\text{NO}$  à degradação oxidativa.

Archer et al. (1995) evidenciaram que a injeção de volumes de  $\cdot\text{NO}$ , na forma gasosa, em soluções aquosas expostas à atmosfera com 20% de oxigênio era acompanhada por degradação oxidativa dependente do tempo de exposição, chegando a aproximadamente 80% de perda após 10 min.

Ao saturarmos homogenatos de tecido com  $\text{O}_2$ , a quimiluminescência foi quase totalmente extinta (figura 12), mostrando que a exposição do  $\cdot\text{NO}$  a elevadas concentrações de  $\text{O}_2$  resulta em sua diminuição, possivelmente em decorrência de reações de oxidação.

Apesar da rapidez da realização da análise (5 min), este tempo de exposição ao  $\text{O}_2$  foi suficiente para provocar diminuição significativa de  $\cdot\text{NO}$ , o que foi evidenciado pela baixa reprodutibilidade apresentada pelo método inicialmente (dados não mostrados).

Contudo, a degaseificação com  $\text{N}_2$  das soluções utilizadas tanto para curva padrão de  $\cdot\text{NO}$ , quanto para o preparo dos reagentes e da amostra de tecido, impediu a rápida degradação oxidativa do  $\cdot\text{NO}$  através da remoção de parte do  $\text{O}_2$  presente nas soluções. Este procedimento resultou em elevada reprodutibilidade do método (figura 13). O gás  $\text{N}_2$  é inerte e parece não interferir na reação de quimiluminescência, mostrando-se uma ferramenta útil em condições experimentais em que a exposição ao oxigênio não pode ser evitada.

Apesar da relativa estabilidade conferida pela degaseificação com  $\text{N}_2$ , procurou-se proceder às análises imediatamente após a homogeneização do tecido, pois foi observado que havia diminuição de cerca de 50% da quimiluminescência quando a amostra de tecido era analisada 1h após o seu preparo (figura 14).

Conforme as condições de análise adotadas, a quimiluminescência pode ser inibida total ou parcialmente. Apesar dos mecanismos responsáveis por este fenômeno não terem sido totalmente elucidados, sabe-se que ele está associado ao excesso de substâncias reacionais ou interferentes. Além das concentrações dos reagentes e da amostra, outros fatores influenciam a quimiluminescência, tal como a temperatura e o pH (FERREIRA; ROSSI, 2002; ROBARDS; WORSFOLD, 1992). Desta forma, o estabelecimento das condições de análise é essencial para a validação de métodos baseados em reações de quimiluminescência.

Neste estudo, adotamos as condições de análise descritas por Kikuchi et al. (1993) e reproduzidas por Tsukada et al. (2003) e Yavuz et al. (2003), visto que foram consideradas condições ideais para esta análise.

Utilizamos uma solução de  $\cdot\text{NO}$  para a construção da curva padrão. Em concentrações de  $\cdot\text{NO}$  superiores a 355,55 aM, a reação de quimiluminescência foi inibida consideravelmente (dados não mostrados). Na faixa de concentração de 20,80 a 355,55 aM, por outro lado, a emissão de fótons correlacionou-se linearmente com a concentração de  $\cdot\text{NO}$  padrão, confirmando a elevada especificidade e sensibilidade para esta substância mencionadas em outros estudos (KIKUCHI et al., 1993; TSUKADA et al., 2003; YAVUZ et al., 2003). Constatamos, ainda, que tanto a altura, quanto a área sob as curvas de quimiluminescência, são parâmetros satisfatórios para esta análise, uma vez que apresentaram elevada correlação com a concentração de  $\cdot\text{NO}$  padrão (figura 10).

Ao testarmos diferentes concentrações de tecido, foi observado inibição da quimiluminescência na concentração de 0,05%. Na faixa de concentração de 0,00125 a 0,005%, entretanto, houve aumento proporcional de emissão (ver figura 11). Com base no exposto, foi adotada uma concentração intermediária e livre de inibição (0,0025%) para as análises.

Para induzir o efeito “quench” observado em concentrações superiores a 355,55 aM, excesso de  $\cdot\text{NO}$  (376 pM) foi adicionado a uma amostra de tecido (0,0025% m/v). Conforme o esperado, houve inibição total da emissão de quimiluminescência (figura 15), confirmando a importância do estabelecimento da concentração, tanto das amostras, quanto do  $\cdot\text{NO}$  padrão em análises através de quimiluminescência.

## 5.2 ENVOLVIMENTO DO $\text{NO}$ NA LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO

A LIR é caracterizada por eventos como edema, não reperfusão, produção de radicais livres, lipoperoxidação, infiltração de polimorfonucleares, disfunção e morte celulares (JORDAN; ZHAO; VINTEN-JOHANSEN, 1999; MOORE; CAINE, 2000; ARAÚJO, 2002; BLAISDELL, 2002).

Este estudo visa elucidar a participação do  $\text{NO}$  na LIR do músculo esquelético em ratos, possivelmente pela formação de  $\text{ONOO}^-$  e indução de lesão peroxidativa, utilizando medidas diretas desta substância, através de uma técnica altamente sensível e específica baseada na quimiluminescência induzida pelo sistema  $\text{H}_2\text{O}_2$ -luminol.

Para tanto, foi adotado o modelo de isquemia (4 h) e reperfusão (1-4 h) induzida por torniquete, pela simplicidade de execução e pela eficácia em promover lesão peroxidativa e as alterações histológicas esperadas nesta condição patológica (SARDINHA, 1994; ARAÚJO, 2002; ZIMIANI et al., 2005).

Houve aumento marcante (cerca de 4 vezes) da concentração de  $\text{NO}$  após 4 h de reperfusão, mas não após a isquemia. Estes resultados estão de acordo com estudo anterior, realizado em nosso laboratório, que evidenciou aumento de hidroperóxidos lipídicos no músculo gastrocnêmio, demonstrando aumento de lesão lipoperoxidativa, somente após a reperfusão (ZIMIANI et al., 2005). Além disso, justificam a maior severidade das lesões teciduais encontradas após o restabelecimento do fluxo sanguíneo, conforme relatado por outros autores (GOWER et al., 1989; KHANNA; COWLED; FITRIDGE, 2005). Zimiani et al. (2005) também verificaram que o tratamento com AG ou LNAME reduzia significativamente a lesão peroxidativa do músculo esquelético após a reperfusão, sugerindo o envolvimento do  $\text{NO}$  neste processo.

Existem estudos associando a expressão de iNOS com a menor sobrevivência do músculo esquelético após a reperfusão (ZHANG et al., 1997; BARKER et al., 2001). A expressão de iNOS é induzida por citocinas pró-inflamatórias que são liberadas durante a LIR. Vários estudos têm relatado a expressão desta isoforma após longos períodos de reperfusão. Zhang et al. (1997) observaram a expressão de iNOS em músculo esquelético de roedores a partir de 8 h de reperfusão em um modelo de isquemia (2 h) e reperfusão (24 h). Em modelo experimental semelhante, Messina et al. (2000) verificaram a expressão de iNOS em mastócitos a partir de 2 h e, em neutrófilos e macrófagos, após 24 h de reperfusão. Entretanto, o  $\text{NO}$  não foi quantificado diretamente nestes estudos.

No presente estudo, foi observado aumento de  $\cdot\text{NO}$  após 4 h de reperfusão, sendo significativamente reduzido pela AG, um inibidor seletivo de iNOS. Anteriormente, utilizando o mesmo modelo experimental deste estudo, foi observado que a iNOS tornava-se expressa no músculo gastrocnêmio somente após 4 h de reperfusão (ZIMIANI et al., 2005). Nossos dados, portanto, evidenciam a participação do  $\cdot\text{NO}$  gerado pela iNOS na fase tardia de reperfusão, mediando peroxidação lipídica no músculo esquelético.

Possivelmente, as isoformas constitutivas também contribuam para este processo, pois o aumento da concentração de  $\cdot\text{NO}$  após 4 h de reperfusão foi bloqueado pelo LNAME, um inibidor seletivo de cNOS. Estudos têm observado, recentemente, que tanto a proteína quanto o RNAm de NOS são expressos constitutivamente no músculo esquelético (STAMLER; MEISSNER, 2001). A nNOS em músculo esquelético de roedores concentra-se na superfície de membrana das fibras do tipo II, estando ausente nas do tipo I. A eNOS, por outro lado, está co-localizada na região da mitocôndria em fibras musculares de ratos (GUNJI et al., 2003). O músculo gastrocnêmio, utilizado no presente estudo, é considerado um músculo misto, sendo composto tanto por fibras musculares tipo I (ou vermelhas), quanto por fibras tipo II (ou brancas).

Além disso, tem sido demonstrado em modelo experimental de sepse que a ativação inicial de cNOS, em macrófagos, exerce efeitos pró-inflamatórios, contribuindo para a expressão e atividade de iNOS (CONNELLY et al., 2003; CONNELLY; MADHANI; HOBBS, 2005). Esta função moduladora exercida por cNOS sobre a expressão e atividade de iNOS pode explicar o bloqueio do aumento da concentração de  $\cdot\text{NO}$  após 4h pelo LNAME, mas não pela AG.

Por outro lado, o tratamento com DFO, um quelante específico de  $\text{Fe}^{2+}$ , reduziu a concentração de  $\cdot\text{NO}$  até o valor basal. Existem estudos abordando os efeitos citoprotetores de agentes quelantes de ferro através da inibição da cadeia de lipoperoxidação (GOWER et al., 1989; BECKMAN et al., 1990; RADY et al., 1991; LE et al., 1994). Um dos mecanismos propostos para este efeito é a inibição da síntese de  $\cdot\text{OH}$  pela reação de Fenton-Haber-Weiss, que requer  $\text{Fe}^{2+}$ . Entretanto, segundo Beckman et al. (1990), a reação de Fenton-Haber-Weiss pode ser limitada *in vivo* em virtude da baixa constante de reação de redução de  $\text{Fe}^{3+}$  a  $\text{Fe}^{2+}$ . Estes autores propuseram, ainda, que a síntese *in vivo* de  $\cdot\text{OH}$  ocorreria predominantemente pela degradação do HOONO a radicais  $\cdot\text{OH}$  e  $\cdot\text{NO}_2$ . Neste sentido, tem sido proposta a hipótese de que o efeito preventivo contra a lipoperoxidação, atribuído à DFO, se deve à capacidade deste quelante  $\text{Fe}^{2+}$ -específico em formar complexos com ONOO $\cdot$  ou HOONO (BECKMAN et al., 1990; RADY et al., 1991). Contudo, não há

relatos sobre uma possível influência da DFO sobre a concentração de  $\cdot\text{NO}$ . Sendo assim, a DFO promoveu a diminuição da concentração de  $\cdot\text{NO}$  através de um mecanismo até o presente momento desconhecido.

Com base nestes resultados, evidenciamos a ação deletéria do  $\cdot\text{NO}$  na LIR do músculo estriado esquelético, através de sua síntese aumentada e dependente de NOS na fase tardia de reperfusão, possivelmente gerando  $\text{ONOO}^-$  e outras ERN, promovendo lesão peroxidativa.

### **5.3 ENVOLVIMENTO DO $\cdot\text{NO}$ NA CAQUEXIA INDUZIDA PELO TUMOR DE WALKER-256**

Lesões celulares desencadeadas por radicais livres, ERO e ERN estão presentes no processo fisiológico de envelhecimento (FORSTER et al., 1996), assim como em condições patológicas como doenças cardiovasculares (MOORE; CAINE, 2000; ANAYA-PRADO et al., 2002; BLAISDELL, 2002), neurodegenerativas (BENZI; MORETTI, 1995) e câncer (FREITAS et al., 2001; BARREIRO et al., 2005; SUZUKAWA, 2005; GUARNIER, 2006).

Estudos prévios têm relatado a participação do estresse oxidativo e nitrosativo na patogênese da caquexia (BUCK; CHOJKIER, 1996; FREITAS et al., 2001; GOMES-MARCONDES; TISDALE, 2002; BARREIRO et al., 2005; SUZUKAWA, 2005; GUARNIER, 2006), síndrome altamente debilitante que acomete indivíduos em estágios avançados de câncer, cuja principal característica é a severa perda de massa corpórea, principalmente de massa muscular (FEARON; MOSES, 2002).

Para investigarmos o envolvimento do  $\cdot\text{NO}$  e do estresse nitrosativo neste processo, foram utilizadas técnicas de quimiluminescência altamente sensíveis e específicas para a quantificação de  $\cdot\text{NO}$  (KIKUCHI et al., 1993) e para a estimativa da concentração de hidroperóxidos lipídicos (GONZALEZ-FLECHA; LLESUY; BOVERIS, 1991) nos músculos gastrocnêmios de ratos com caquexia induzida por tumor de Walker-256.

Foi adotado o modelo experimental de caquexia induzida por tumor de Walker-256 devido a sua capacidade de provocar intensa perda de massa corpórea e muscular em seu hospedeiro, além de alterações significativas no metabolismo oxidativo e/ou nitrosativo em diferentes tecidos (TAYEK et al, 1986; FREITAS et al, 2001; SUZUKAWA, 2005; GUARNIER et al, 2006).

Este tumor apresentou rápido crescimento, pesando até 19 g (aproximadamente 10% da massa corpórea) no 10º dia após o seu implante. O crescimento tumoral foi potencializado pelos inibidores de NOS AG e LNAME (tabela 6).

Pizato et al. (2005, 2006), utilizando o mesmo modelo de caquexia, observaram aumento da produção de  $\text{NO}$  por macrófagos e redução do crescimento tumoral em ratos suplementados com ácidos graxos poliinsaturados. Wallace et al. (2000), por sua vez, mostraram que dietas ricas em ácidos graxos poliinsaturados aumentavam a atividade citotóxica de macrófagos sobre células tumorais.

A importância do  $\text{NO}$  para as defesas do hospedeiro é bem estabelecida, participando de processos como fagocitose e regulação da resposta inflamatória (SALVEMINI, 1997; LIAUDET; SORIANO; SZABO, 2000; CONNELLY; MADHANI; HOBBS, 2005). Considerando estas propriedades, a inibição da síntese de  $\text{NO}$  através do uso de inibidores de NOS pode ter prejudicado a resposta imunológica contra o tumor, permitindo o seu crescimento.

Por ter sido observado redução progressiva de ingestão alimentar nos animais com tumor de Walker-256 (figura 19), foram realizados grupos Pair Fed para avaliar a contribuição da anorexia para as perdas de massa corpórea e muscular nos animais caquéticos, assim como para verificar se a redução de ingestão alimentar alterava as concentrações de  $\text{NO}$  e hidroperóxidos lipídicos no músculo esquelético.

As perdas de massa muscular e corpórea observadas nos animais experimentais foram acentuadamente maiores que as apresentadas pelos animais Pair Fed (figura 21), demonstrando que outros mecanismos além da anorexia estão envolvidos na intensa perda de massa observada na caquexia.

Nos grupos PBS/ Pair Fed, foi observado diminuição da concentração de  $\text{NO}$  em relação aos animais alimentados *ad libitum* (tabela 6). Para descartar este efeito, os grupos experimentais foram comparados com os respectivos grupos controles PBS/ Pair Fed.

Em T3, houve diminuição significativa da concentração de  $\text{NO}$  no músculo esquelético, em relação ao grupo PBS/ *ad libitum* ( $p < 0,001$ ) (figura 25A), o que pode ter resultado de uma síntese de  $\text{NO}$  reduzida ou de um consumo excessivo de  $\text{NO}$  pela conversão a ERN, induzindo lesão lipoperoxidativa. Contudo, a concentração de hidroperóxidos lipídicos permaneceu inalterada (figura 23A), descartando a hipótese de consumo de  $\text{NO}$  aumentado.

Em T5, por outro lado, foi constatado aumento significativo da concentração de  $\text{NO}$  em relação ao grupo controle PBS/ Pair Fed 5 ( $p < 0,001$ ) (figura 25B),



possivelmente pela expressão de iNOS após indução pelo TNF- $\alpha$ , conforme relatado por outros autores (TISDALE, 2001; FEARON; MOSES, 2002; ARGILÉS et al., 2003; ARGILÉS et al., 2005). Este aumento foi acompanhado pelo aumento da concentração de hidroperóxidos lipídicos (figura 23B), demonstrando lesão lipoperoxidativa aumentada no músculo esquelético, possivelmente mediada pelo  $\cdot$ NO. O aumento da concentração de  $\cdot$ NO em T5 foi bloqueado pelos inibidores de NOS AG e LNAME (figura 26), mostrando a participação de ambas as isoformas indutível e constitutiva. Com a inibição da síntese de  $\cdot$ NO via cNOS e iNOS, houve redução significativa da lesão lipoperoxidativa do músculo esquelético (figura 24), comprovando o envolvimento do  $\cdot$ NO neste processo. Entretanto, quando comparado com o grupo PBS/ *ad libitum*, a concentração de  $\cdot$ NO não foi alterada em T5 (tabela 6). Conforme relatado por Guarnier (2006), que utilizou o mesmo modelo e protocolo de caquexia deste estudo, no 5º dia após o inóculo de células tumorais ocorreu redução significativa da capacidade antioxidante total no músculo esquelético. Sendo assim, esta concentração de  $\cdot$ NO, que seria fisiológica em animais saudáveis e alimentados *ad libitum*, pode ser deletéria naqueles que apresentam as defesas antioxidantes comprometidas, conforme demonstrado pelo aumento de lesão lipoperoxidativa no músculo esquelético em T5 (figura 23B).

Em T10, a concentração de  $\cdot$ NO no músculo esquelético retornou ao valor basal de PBS/ Pair Fed 10 (figura 25C), entretanto, a concentração de hidroperóxidos lipídicos permaneceu aumentada (figura 23C), possivelmente como reflexo das alterações observadas em T5. Por outro lado, a concentração de hidroperóxidos lipídicos diminuiu significativamente quando comparado com T5, provavelmente pelo “turnover” de fosfolípidios de membrana que deve ter ocorrido neste intervalo de tempo.

A concentração de  $\cdot$ NO permaneceu inalterada em T14 (figura 25D), enquanto a concentração de hidroperóxidos lipídicos retornou aos valores basais (23D). As concentrações de  $\cdot$ NO observadas em T10 e T14, entretanto, foram diminuídas em relação à apresentada por PBS/ *ad libitum* (tabela 6), possivelmente pela intensa redução de ingestão alimentar (para cerca de 58%), o que pode ter reduzido a disponibilidade de L-arginina para a síntese de  $\cdot$ NO via NOS.

Segundo Pereira et al. (2004), o consumo hepático de arginina para a produção de uréia está aumentado em ratos com caquexia induzida pelo tumor de Walker-256. Além disso, estudos clínicos e experimentais têm mostrado diminuição da síntese e aumento da degradação protéica no músculo esquelético, favorecendo o aumento da

gliconeogênese a partir de aminoácidos (TISDALE, 2000; TISDALE, 2001; HASSELGREN; WRAY; MAMMEN, 2002). Uma vez que o  $\cdot\text{NO}$  é sintetizado a partir deste aminoácido, a mobilização e o consumo de arginina para suprir a síntese hepática de uréia ou a gliconeogênese podem ter contribuído, também, para esta redução da concentração de  $\cdot\text{NO}$  no músculo esquelético em T10 e T14.

Segundo Radi et al. (1991) e Zimiani et al. (2005), elevadas concentrações de  $\cdot\text{NO}$  podem iniciar reações peroxidativas sobre lipídios através da formação de  $\text{ONOO}^-$ . Os produtos gerados na cadeia de lipoperoxidação, como MDA e outros aldeídos, por outro lado, podem reagir com proteínas, modificando-as estruturalmente (BUCK; CHOJKIER, 1996; BARREIRO et al., 2005). Além disso, outros alvos moleculares podem ser modificados através de reações de nitrosação e nitração, mediadas tanto pelo  $\text{ONOO}^-$ , como por outras ERN (LIAUDET; SORIANO; SZABO, 2000).

Apesar de outras espécies reativas e radicais livres inespecíficos também causarem peroxidação lipídica, os aumentos simultâneos das concentrações de  $\cdot\text{NO}$  e hidroperóxidos lipídicos, assim como o bloqueio de ambos com o uso de inibidores de NOS, comprovam a participação do  $\cdot\text{NO}$  na lesão peroxidativa observada no músculo esquelético de ratos com caquexia induzida pelo tumor de Walker-256.

Tem sido relatado que o estresse oxidativo e nitrosativo exerce funções regulatórias sobre a via de proteólise dependente de ubiquitina-proteassoma, acelerando a degradação protéica e a perda de massa muscular (REID; LI, 2001; GOMES-MARCONDES; TISDALE, 2002). Davies (1987) e Barreiro et al. (2005) sugeriram, ainda, que as alterações provocadas pelo estresse oxidativo e/ou nitrosativo nas proteínas as tornariam susceptíveis à degradação proteolítica. Segundo estudo prévio realizado em nosso laboratório (GUARNIER, 2006), ocorreu aumento significativo da concentração de grupos carbonilas, um marcador de alteração oxidativa em proteínas, no músculo esquelético dos animais 10 dias após o implante do tumor de Walker-256. No mesmo estudo, já no 5º dia, foi evidenciado aumento acentuado da concentração de atrogina, uma das enzimas responsáveis pela ubiquitinação de proteínas destinadas à proteólise via sistema dependente de ubiquitina-proteassoma.

No presente estudo, ao contrário do esperado, a prevenção da lesão lipoperoxidativa do músculo esquelético pelo tratamento com inibidores de NOS não amenizou as perdas de massa corpórea e muscular (figura 22), possivelmente em virtude da complexidade do modelo de caquexia induzida pelo tumor de Walker-256, no qual devem estar presentes diversos mecanismos de perda de massa além do estresse oxidativo e nitrosativo.

Para o maior conhecimento dos efeitos do uso crônico de inibidores de NOS sob condições fisiológicas, uma vez que já foram relatados prejuízo da função contrátil e perda de massa muscular em ratos tratados com LNAME (WANG et al., 2001) e redução do apetite em marsupiais após a inibição da síntese de  $^1\text{NO}$  pelo uso de LNMMA ou LNAME (VOZZO et al., 1999), foram realizados grupos controles que consistiram de animais inoculados com PBS, alimentados *ad libitum* e tratados com AG (50 mg/kg) ou LNAME (20 mg/kg), similarmente e durante o mesmo período que os experimentais.

Foi observado redução significativa de ingestão alimentar com o uso de LNAME em relação ao grupo não tratado (figura 20), conforme relatado anteriormente por Vozzo et al. (1999). Esta redução pode ter contribuído, parcialmente, para as perdas de massa corpórea e muscular observadas nos animais inoculados com PBS e tratados com LNAME (figura 22). Sendo assim, é possível que as perdas de massa corpórea e muscular observadas nos animais do grupo T5 não tenham sido alteradas pelo tratamento com LNAME (figura 22) porque esta droga, por si só, induz perda de massa. O LNAME deve apresentar mecanismos de perda de massa comuns aos da caquexia induzida pelo tumor de Walker-256, pois se fossem diferentes, as perdas de massa corpórea e muscular teriam sido potencializadas em T5LNAME.

Nossos resultados demonstram a participação do  $^1\text{NO}$  na lesão lipoperoxidativa do músculo esquelético de ratos com caquexia induzida pelo tumor de Walker-256, possivelmente pela formação de  $\text{ONOO}^-$  e outras ERN. Entretanto, mais estudos são necessários para a elucidação do envolvimento da peroxidação lipídica mediada pelo  $^1\text{NO}$  no processo de perda de massa muscular observado na caquexia associada ao câncer. Avaliações de proteólise e da expressão e/ou da atividade de componentes dos diferentes sistemas proteolíticos presentes no músculo esquelético podem ser úteis para a investigação do papel do estresse oxidativo e nitrosativo na caquexia induzida pelo tumor de Walker-256.

## 6 CONCLUSÃO

### 6.1 MÉTODO PARA QUANTIFICAÇÃO DE $\dot{\text{NO}}$

- O ensaio de quimiluminescência induzida pelo sistema  $\text{H}_2\text{O}_2$ -luminol mostrou-se altamente reprodutível, sensível e específico para a quantificação de  $\dot{\text{NO}}$  em homogenato de tecido.

### 6.2 MODELO EXPERIMENTAL DE LESÃO POR ISQUEMIA-REPERFUSÃO

- Não houve alteração significativa da concentração de  $\dot{\text{NO}}$  no músculo gastrocnêmio após 4 h de isquemia, nem após as duas primeiras horas de reperfusão. Após 4 h de reperfusão, entretanto, houve aumento de aproximadamente 4 vezes da concentração de  $\dot{\text{NO}}$ ;
- O aumento da concentração de  $\dot{\text{NO}}$  observado após 4h de reperfusão resultou da ativação das isoformas constitutiva e indutível de NOS, observado pela inibição destas isoformas pelo uso de inibidores seletivos, LNAME (cNOS) e AG (iNOS);
- A DFO diminuiu a concentração de  $\dot{\text{NO}}$  através de um mecanismo desconhecido. Mais estudos são necessários para a elucidação deste fenômeno;
- Nossos resultados representam a primeira evidência da participação direta do  $\dot{\text{NO}}$ , possivelmente formando  $\text{ONOO}^-$ , na LIR do músculo estriado esquelético.

### 6.3 MODELO EXPERIMENTAL DE CAQUEXIA INDUZIDA POR TUMOR DE WALKER-256

- No modelo experimental de caquexia induzida por tumor de Walker-256, foi observado progressiva redução da ingestão alimentar, caracterizando a anorexia, que teve início 5 dias após o implante do tumor;

- A anorexia não foi determinante para a acentuada perda de massa muscular observada nos animais caquéticos;
- Em T5, houve aumento da concentração de  $\cdot\text{NO}$ , possivelmente em decorrência da ativação das isoformas constitutiva e indutível de NOS, provocando lesões peroxidativas no músculo gastrocnêmio, conforme evidenciado pelo aumento da concentração de hidroperóxidos lipídicos e pelo bloqueio deste efeito utilizando AG e LNAME;
- A lesão peroxidativa permaneceu elevada em T10, retornando à concentração basal em T14;
- Estes eventos foram acompanhados por crescentes perdas de massa corpórea e muscular;
- Nossos resultados demonstram a participação do  $\cdot\text{NO}$  na lesão peroxidativa do músculo esquelético observada em ratos com caquexia induzida por tumor de Walker-256.

## REFERÊNCIAS

ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R. G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, v. 357, n. 3, p. 593-615, aug. 2001.

ALONSO-GALICIA, M.; DRUMMOND, H. A.; REDDY, K. K.; FALCK, J. R.; ROMAN, R. J. Inhibition of 20-HETE production contributes to the vascular responses to nitric oxide. **Hypertension**, Dallas, v. 29, n. 1, p. 320-325, jan. 1997.

ANAYA- PRADO, R.; TOLEDO-PEREYRA, L. H.; LENTSCH, A. B.; WARD, P. A. Ischemia/reperfusion injury. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 105, n. 2, p. 248-258, jun. 2002.

ANDREYEV, H. J.; NORMAN, A.R.; OATES, J.; CUNNINGHAM, D. Why do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for gastrointestinal malignancies? **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 34, n. 4, p. 503-509, mar. 1998.

ARANY, I.; BRYSK, M. M.; BRYSK, H.; TYRING, S. K. Regulation of inducible nitric oxide synthase mRNA levels by differentiation and cytokines in human keratinocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 220, n. 3, p. 618-622, mar. 1996.

ARAÚJO, E. M. C. **Estresse oxidativo induzido por isquemia e reperfusão em músculo soleus de rato: estudo histológico e bioquímico**. 2002. Tese (Doutorado em Fisiopatologia em Clínica Médica) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

ARCHER, S. L.; COWAN, N. J. Measurement of endothelial cytosolic calcium concentration and nitric oxide production reveals discrete mechanisms of endothelium-dependent pulmonary vasodilatation. **Circulation Research**, Baltimore, v. 68, n. 6, p. 1569-1581, jun. 1991.

ARCHER, S. L.; SHULTZ, P. J.; WARREN, J. B.; HAMPL, V.; DEMASTER, E. G. Preparation of standards and measurement of nitric oxide, nitroxyl and related oxidation products. **Methods: a companion to methods in enzymology**, San Diego, v. 7, n. 1, p. 21-34, feb. 1995.

ARGILÉS, J. M.; BUSQUETS, S.; GARCÍA-MARTÍNEZ, C.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. **Nutrition**, Burbank, v. 21, n. 9, p. 977-985, sep. 2005.

ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. The ubiquitin-dependent proteolytic pathway in skeletal muscle: its role in pathological states. **Trends of Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v. 17, n. 6, p. 223-226, jun. 1996.

ARGILÉS, J. M.; MOORE-CARRASCO, R.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Catabolic mediators as targets for cancer cachexia. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 8, n. 18, p. 838-844, sep. 2003.

ARROYO, C., KOHNO, M. Difficulties encountered in the detection of nitric oxide by spin trapping techniques: a cautionary note. **Free Radicals Research Communications**, Chur, v. 14, n. 2, p. 145-155, 1991.

BAEUERLE, P. A. Reactive oxygen species as costimulatory signals of cytokine-induced NF- $\kappa$ B activation pathways. In: SEN, C. K.; SIES, H.; BAEUERLE, P. A. **Antioxidant regulation of the genes**. San Diego: Academic Press, 2000. p. 181-187.

BARKER, J. E.; KNIGHT, K. R.; ROMEO, R.; HURLEY, J. V.; MORRISON, W. A.; STEWART, A. G. Targeted disruption of the nitric oxide synthase 2 gene protects against ischemia/reperfusion injury to skeletal muscle. **Journal of Pathology**, London, v. 194, n. 1, p. 109-115, may. 2001.

BARIE, P. S.; MULLINS, R. J. Experimental methods in the pathogenesis of limb ischemia. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 44, n. 3, p. 284-307, mar. 1988.

BARNES, P. J. Nuclear factor- $\kappa$ B. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 29, n. 6, p. 867-870, jun. 1997.

BARREIRO, E.; DE LA PUENTE, B.; BUSQUETS, S.; LÓPEZ-SORIANO, F. J.; GEA, J.; ARGILÉS, J. M. Both oxidative and nitrosative stress are associated with muscle wasting in tumour-bearing rats. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 579, n. 7, p. 1646-1652, mar. 2005.

BARTOLI, M.; RICHARD, I. Calpains in muscle wasting. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 37, n. 10, p. 2115-2133, oct. 2005.

BARTON JUNIOR, F. E.; SPICER, T. E.; BYRD, H. S. Head and neck reconstruction with the latissimus dorsi myocutaneous flap: anatomic observations and report of 60 cases. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 71, n. 2, p. 199-204, Feb. 1983.

BATES, T. E.; LOESCH, A.; BURNSTOCK, G.; CLARK, J. B. Immunocytochemical evidence for a mitochondrially located nitric oxide synthase in brain and liver. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 213, n. 3, p. 896-900, aug. 1995.

BAUER, P. M.; FUKUTO, J. M.; BUGA, G. M.; PEGG, A. E.; IGNARRO, L. J. Nitric oxide inhibits ornithine decarboxylase by S-nitrosylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 262, n. 2, p. 355-358, aug. 1999.

BAXTER, B. T.; MAHONEY, C.; JOHNSON, P. J.; SELMER, K. M.; PIPINOS, I. I.; ROSE, J.; NEFF, J. R. Concomitant Arterial and Venous Reconstruction with Resection of Lower Extremity Sarcomas. **Annals of Vascular Surgery**, Detroit, v. 21, n. 3, p. 272-279, may. 2007.

BECHET, D.; TASSA, A.; TAILLANDIER, D.; COMBARET, L.; ATTAIX, D. Lysosomal proteolysis in skeletal muscle. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 37, n. 10, p. 2098-2114, oct. 2005.

BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelium injury from nitric oxide and superoxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 87, n. 4, p. 1620-1624, feb. 1990.

BENZI, G.; MORETTI, A. Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? **Neurobiology of Aging**, Fayetteville, v. 16, n. 4, p. 661-674, jul-aug. 1995.

BESEDOVSKY, H. O.; DEL REY, A.; SCHARDT, M.; SORKIN, E.; NORMANN, S.; BAUMANN, J.; GIRARD, J. Changes in plasma hormone profiles after tumor transplantation into syngeneic and allogeneic rats. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 36, n. 2, p. 209-216, aug. 1985.

BLACKWELL, T. S.; CHRISTMAN, J. W. The role of nuclear factor-kB in cytokine gene regulation. **American Journal Respiratory Cell and Molecular Biology**, New York, v. 17, n. 1, p. 3-9, jul. 1997.

BLAISDELL, F. W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and reperfusion syndrome: a review. **Cardiovascular Surgery**, London, v. 10, n. 6, p. 620-630, dec. 2002.

BLEBEA, J.; BACIK, B.; STROTHMAN, G.; MYATT, L. Decreased nitric oxide production following extremity ischemia and reperfusion. **American Journal of Surgery**, New York, v. 172, n. 2, p. 158-161, aug. 1996.



BOLOTINA, V. M.; NAJIBI, S.; PALACINO, J. J.; PAGANO, P. J.; COHEN, R. A. Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. **Nature**, London, v. 368, n. 6474, p. 850-853, apr. 1994.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Instituto Nacional de Câncer, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005.

BRESTEL, E. P. Co-oxidation of luminol by hypochlorite and hydrogen peroxide. Implications for neutrophil chemiluminescence. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 126, n. 1, p. 482-488, jan. 1985.

BROOKES, P. S. Mitochondrial nitric oxide synthase. **Mitochondrion**, v. 3, n. 4, Amsterdam, p. 187-204, mar. 2004.

BROVKOVYCH, V.; STOLARCZYK, E.; OMAN, J.; TOMBOULIAN, P.; MALINSKI, T. Direct electrochemical measurement of nitric oxide in vascular endothelium. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 19, n. 1-2, p. 135-143, feb. 1999.

BROWN, G. C. Nitric oxide and mitochondrial respiration. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1411, n. 2-3, p. 351-369, may. 1999.

BRYAN, N. S. Nitrite in nitric oxide biology: Cause or consequence? A systems-based review. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 41, n. 5, p. 691-701, sep. 2006.

BUCHBINDER, D.; KARMODY, A. M.; LEATHER, R. P.; SHAH, D. M. Hypertonic mannitol: its use in the prevention of revascularization syndrome after acute arterial ischemia. **Archives of Surgery**, Chicago, v. 116, n. 4, p. 414-421, apr. 1981.

BUCK, M.; CHOJKIER, M. Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. **EMBO Journal**, Eynsham, v. 15, n. 8, p. 1753-1765, apr. 1996.

BUSQUETS, S.; FIGUERAS, M. T.; FUSTER, G.; ALMENDRO, V.; MOORE-CARRASCO, R.; AMETLLER, E.; ARGILÉS, J. M.; LÓPEZ-SORIANO, F. J. Anticachectic effects of formoterol: a drug for potential treatment of muscle wasting. **Cancer Research**, Chicago, v. 64, n. 18, p. 6725-6731, sep. 2004.

CANGIANO, C.; TESTA, U.; MUSCARITOLI, M.; MEGUID, M. M.; MULIERI, M.; LAVIANO, A.; CASCINO, A.; PREZIOSA, I.; CONVERSANO, L.; ROSSI FANELLI, F. Cytokines, tryptophan and anorexia in cancer patients before and after surgical tumor ablation. **Anticancer Research**, Athens, v. 14, n. 3B, p. 1451-1456, may-jun. 1994.

CAO, P. R.; KIM, H. J.; LECKER, S. H. Ubiquitin–protein ligases in muscle wasting. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 37, n. 10, p. 2088-2097, oct. 2005.

CASTELLO, P. R.; DAVID, P. S.; MCCLURE, T.; CROOK, Z.; POYTON, R. O. Mitochondrial cytochrome oxidase produces nitric oxide under hypoxic conditions: implications for oxygen sensing and hypoxic signaling in eukaryotes. **Cell Metabolism**, Cambridge, v. 3, n. 4, p. 277–287, apr. 2006.

CHANCE, W. T.; BALASUBRAMANIAN, A.; DAYAL, R. BROWN, J.; FISCHER, J. E. Hypothalamic concentration and release of neuropeptide Y into microdialysates is reduced in anorectic tumor-bearing rats. **Life Sciences**, Oxford, v. 54, n. 24, p. 1869-1874, 1994.

CHEN, L. Y.; MEHTA, L. L. Further evidence of the presence of constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms in human platelets. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, New York, v. 27, n. 1, p. 154-158, jan. 1996.

CLARK, R. S.; KOCHANNEK, P. M.; SCHWARZ, M. A.; SCHIDING, J. K.; TURNER, D. S.; CHEN, M.; CARLOS, T. M.; WATKINS, S. C. Inducible nitric oxide synthase expression in cerebrovascular smooth muscle and neutrophils after traumatic brain injury in immature rats. **Pediatric Research**, Basel, v. 39, n. 5, p. 784-790, may. 1996.

CONCANNON, M. J.; KESTER, C. G.; WELSH, C. F. Patterns of free radical production after tourniquet ischemia: implications for the hand surgeon. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 89, n. 5, p. 846-852, may. 1992.

CONNELLY, L.; JACOBS, A. T.; PALACIOS-CALLENDER, M.; MONCADA, S.; HOBBS, A. J. Macrophage endothelial nitric oxide synthase autoregulates cellular and pro-inflammatory protein expression. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 278, n. 29, p. 26480-26487, jul. 2003.

CONNELLY, L.; MADHANI, M.; HOBBS, A. Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) knock-out mice: A pro-inflammatory role for eNOS-derived NO in vivo. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 11, p. 10040-10046, jan. 2005.

COOPER, C. E. Nitric oxide and iron proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1411, n. 2-3, p. 290-309, may. 1999.

CORDEIRO, P. G.; SANTAMARIA, E.; HU, Q. Y. Use of a nitric oxide precursor to protect pig myocutaneous flaps from ischemia-reperfusion injury. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 102, n. 6, p. 2040-2049, nov. 1998.

CORMIER, J. M.; LEGRAIN, M. Hyperkalemia, very severe complication of acute ischemia syndromes of the limb. **Journal of Chronic Diseases**, Saint Louis, v. 83, p. 473-483, mar. 1962.

COSBY, K.; PARTOVI, K. S.; CRAWFORD, J. H.; PATEL, R. P.; REITER, C. D.; MARTYR, S.; YANG, B. K.; WACLAWIW, M. A.; ZALOS, G.; XU, X.; HUANG, K. T.; SHIELDS, H.; KIM-SHAPIRO, D. B.; SCHECHTER, A. N.; CANNON 3RD, R. O.; GLADWIN, M. T. Nitrite reduction to nitric oxide by deoxyhemoglobin vasodilates the human circulation. **Nature Medicine**, New York, v. 9, n. 12, p. 1498-1505, dec. 2003.

COSTA, L. F. **Isquemia e reperfusão da musculatura esquelética em coelhos: achados bioquímicos séricos e histológicos**. 1991. Tese (Doutorado em Cirurgia Cardiovascular) – Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

COSTELLI, P.; DE TULLIO, R.; BACCINO, F. M.; MELLONI, E. Activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis in the skeletal muscle and heart in cancer cachexia. **British Journal of Cancer**, London, v. 84, n. 7, p. 946-950, apr. 2001.

COSTELLI, P.; REFFO, P.; PENNA, F.; AUTELLI, R.; BONELLI, G.; BACCINO, F. M. Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis in muscle wasting. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 37, n. 10, p. 2134-2146, oct. 2005.

CROW, J. P.; YE, Y. Z.; STRONG, M.; KIRK, M.; BARNES, S.; BECKMAN, J. S. Superoxide dismutase catalyzes nitration of tyrosines by peroxynitrite in the rod and head domains of neurofilament-L. **Journal of Neurochemistry**, London, v. 69, n. 5, p. 1945-1953, nov. 1997.

CUTRUZZOLA, F. Bacterial nitric oxide synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1411, n. 2-3, p. 231-249, may. 1999.

DAVIES, K. J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, n. 20, p. 9914-9920, jul. 1987.

DEJAM, A.; HUNTER, C. J.; SCHECHTER, A. N.; GLADWIN, M. T. Emerging role of nitrite in human biology. **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, La Jolla, v. 32, n. 3, p. 423-429, may-jun. 2004.

DEVAL, C.; MORDIER, S.; OBLED, C.; BECHET, D.; COMBARET, L.; ATTAIX, D. et al. Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. **The Biochemical Journal**, London, v. 360, n. 1, p. 143-150, nov. 2001.

DODEIGNE, C.; THUNUS, L.; LEJEUNE, A. Chemiluminescence as diagnostic tool: a review. **Talanta**, London, v. 51, n. 3, p. 415-439, mar. 2000.

DZIEDZIC, B.; MAZANOWSKA-GAJDOWICS, J.; WALCZEWSKA, A.; SARNIAK, A.; NOWAK, D. Comparison of cadmium and enzyme-catalysed nitrate reduction for determination of  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  in breath condensate. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 335, n. 1-2, p. 65-74, sep. 2003.

EISERICH, J. P.; HRISTOVA, M.; CROSS, C. E.; JONES, A. D.; FREEMAN, B. A.; HALLIWELL, B.; VAN DER VLIET, A. Formation of nitric oxide derived inflammatory oxidants by myeloperoxidase in neutrophils. **Nature**, London, v. 391, n. 6665, p. 393-397, jan. 1998.

EMERY, P. W.; LOVELL, L.; RENNIE, M. J. Protein synthesis measured in vivo in muscle and liver of cachectic tumor-bearing mice. **Cancer Research**, Chicago, v. 44, n. 7, p. 2779-2784, jul. 1984.

FARIAS-EISNER, R.; CHAUDHURI, G.; AEBERHARD, E.; FUKUTO, J. M. The chemistry and tumoricidal activity of nitric oxide/hydrogen peroxide and the implications to cell resistance/susceptibility. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 11 p. 6144-6151, mar. 1996.

FEARON, K. C. H.; MOSES, A. G. H. **Cancer cachexia**. *International Journal of Cardiology*, Amsterdam, v. 85, n. 1, p. 73-81, sep. 2002.

FEELISCH, M. The use of nitric oxide donors in pharmacological studies. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**, Berlin, v. 358, n. 1, p. 113-122, jul. 1998.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, jan/mar. 1997.

FERREIRA, E. C.; ROSSI, A. V. A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo à aplicação da reação do luminol em métodos cinéticos de análise. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 6A, p. 1003-1011, nov-dez, 2002.

FLALKOW, L.; CHAN, C. K.; GRINSTEIN, S. Regulation of tyrosine phosphorylation in neutrophils by the NADPH oxidase: role of reactive oxygen intermediates. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, n. 23, 268, p. 17131-17137, aug. 1993.

FOLEY, D. P.; CHARI, R. S. Ischemia-reperfusion injury in transplantation: novel mechanisms and protective strategies, **Transplantation Reviews**, Copenhagen, v. 21, n. 1, p. 43-53, jan. 2007.

FORSTER, M. J.; DUBEY, A.; DAWSON, K. M.; STUTTS, W. A.; LAL, H.; SOHAL, R. S. Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 10, p. 4765-4769, may. 1996.

FORSTERMANN, U. BOISSEL, J. P.; KLEINERT, H. Expressional control of the 'constitutive' isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). **FASEB Journal**, Bethesda, v. 12, n. 10, p. 773-790, jul. 1998.

FOSSEY, J.; LEFORT, D.; SORBA, J. Detection and observation of free radicals. In: \_\_\_\_\_. **Free Radicals in Organic Chemistry**. Chichester: John Wiley & Sons, 1995. p. 5-7.

FREITAS, J. J. S.; POMPÉIA, C.; MIYASAKA, C. K.; CURI, R. Walker-256 tumor growth causes oxidative stress in rat brain. **Journal of Neurochemistry**, London, v. 77, n. 2, p. 655-663, apr. 2001.

GALIGNIANA, M. D.; PIWIEN-PILIPUK, G.; ASSREUY, J. Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide. **Molecular Pharmacology**, New York, v. 55, n. 2, p. 317-323, feb. 1999.

GARDINER, S. M.; COMPTON, A. M.; KEMP, P. A.; BENNETT, T. Regional and cardiac haemodynamic responses to glyceryl trinitrate, acetylcholine, bradykinin and endothelin-1 in conscious rats: effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 101, n. 3, p. 632-639, nov. 1990.

GARDNER, P. R.; COSTANTINO, G.; SZABO, C.; SALZMAN, A. L. Nitric oxide sensitivity of the aconitases. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 40, p. 25071-25076, oct. 1997.

GELLER, D. A.; BILLIAR, T. R. Molecular biology of nitric oxide synthases. **Cancer Metastasis Reviews**, The Hague, v. 17, n. 1, p. 7-23, mar. 1998.

GERGEL, D.; CEDERBAUM, A. I. Inhibition of the catalytic activity of alcohol dehydrogenase by nitric oxide is associated with S-nitrosylation and the release of zinc. **Biochemistry**, Washington, v. 35, n. 50, p. 16186-16194, dec. 1996.

GODBER, B. L.; DOEL, J. J.; SAPKOTA, G. P.; BLAKE, D. R.; STEVENS, C. R.; EISENTHAL, R.; HARRISON, R. Reduction of nitrite to nitric oxide catalyzed by xanthine oxidoreductase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 275, n. 11, p. 7757-7763, mar. 2000.

GOMES-MARCONDES, M. C.; TISDALE, M. J. Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 180, n. 1, p. 69-74, jun. 2002.

GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 10, n. 2, p. 93-100, 1991.

GOODE, H. F.; WEBSTER, N. R.; HOWDLE, P. D.; WALKER, B. E. Nitric oxide production by human peripheral blood polymorphonuclear leukocytes. **Clinical Science**, London, v. 86, n. 4, p. 411-415, apr. 1994.

GOTTLIEB, R. A. Cytochrome P450: major player in reperfusion injury. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 420, n. 2, p. 262-267, dec. 2003.

GOWER, J. D.; HEALING, G.; FULLER, B. J.; SIMPKIN, S.; GREEN, C. J. Protection against oxidative damage in cold-stored rabbit kidneys by desferrioxamine and indomethacin. **Cryobiology**, Rockville, v. 6, n. 4, p. 309-317, aug. 1989.

GREENBERG, S. S.; WILCOX, D. E.; RUBANYI, G. M. Endothelium-derived relaxing factor released from canine femoral artery by acetylcholine cannot be identified as free nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy. **Circulation Research**, Baltimore, v. 67, n. 6, p. 1446-1452, dec. 1990.

GREENBERG, S. S.; XIE, J.; SPITZER, J. J.; WANG, J. F.; LANCASTER, J.; GRISHAM, M. B.; POWERS, D. R.; GILES, T. D. Nitro containing L-arginine analogs interfere with assays for nitrate and nitrite. **Life Sciences**, Oxford, v. 57, n. 21, p. 1949-1961, oct. 1995.

GRISHAM, M. B.; JOURD'HEULL, D.; WINK, D. A. Nitric oxide I: Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: Implications in inflammation. **American Journal of Physiology**, Washington, v. 276, n. 2, p. G315-G321, feb. 1999.

GROSS, S. S.; LANE, P. Physiological reactions of nitric oxide and hemoglobin: a radical rethink. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 96, n. 18, p. 9967-9969, aug. 1999.

GUARNIER, F. A. **Estresse oxidativo em músculo esquelético de ratos com caquexia induzida por tumor de Walker-256**. 2006. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

GUNJI, H.; KURISAKI, E.; SUTO, M.; ABE, S.; HIRAIWA, K. Nitric oxide synthase expressions in mice skeletal muscle subjected to ischemia-reperfusion injury. **Legal Medicine**, Philadelphia, v. 5, n. 1, p. S217-S220, mar. 2003.

GÜRKE, L.; MARX, A.; SUTTER, P. M.; FRENTZEL, A.; HARDER, F.; SEELING, J.; HEBERER, M. Ischemic preconditioning – a new concept in orthopedic and reconstructive surgery. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 61, n. 1, p. 1-3, feb. 1996.

HAIMOVICI, H. Myopathic-nephrotic-metabolic syndrome and massive acute arterial occlusions. **Archives of Surgery**, Chicago, v. 106, n. 5, p. 628-629, may. 1973.

HAIMOVICI, H. Muscular, renal, and metabolic complications of acute arterial occlusions: myoneuropathic-metabolic syndrome. **Surgery**, Saint Louis, v. 85, n. 4, p. 461-468, apr. 1979.

HALLSTROM, S.; GASSER, H.; NEUMAYER, C.; FUGL, A.; NANOBASHVILI, J.; JAKUBOWSKI, A.; HUK, I.; SCHLAG, G.; MALINSKI, T. S-nitroso human serum albumin treatment reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle via nitric oxide release. **Circulation**, Dallas, v. 105, n. 25, p. 3032-3038, jun. 2002.

HANADA, T.; TOSHINAI, K.; DATE, Y.; KAJIMURA, N.; TSUKADA, T. HAYASHI, Y.; KANGAWA, K.; NAKAZATO, M. Upregulation of ghrelin expression in cachectic nude mice bearing human melanoma cells. **Metabolism**, New York, v. 53, n. 1, p. 84-88, jan. 2004.

HASSELGREN, P. O. Role of the ubiquitin-proteasome pathway in sepsis-induced muscle catabolism. **Molecular Biology Reports**, Dordrecht, v. 26, n. 1-2, p. 71-76, apr. 1999a.

HASSELGREN, P. O. Glucocorticoids and muscle catabolism. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care**, London, v. 2, n. 3, p. 201-205, may. 1999b.

HASSELGREN, P. O.; FISCHER, J. E. Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. **Annals of Surgery**, Philadelphia, v. 233, n. 1, p. 9-17, jan. 2001.

HASSELGREN, P. O.; WRAY, C.; MAMMEN, J. Molecular regulation of muscle cachexia: it may be more than the proteasome. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 290, n. 1, p. 1-10, jan. 2002.

HEARSE, D. J.; HUMPHREY, S. M.; NAYLER, W. G.; SLADE, A.; BORDER, D. Ultrastructural damage associated with reoxygenation of the anoxic myocardium. **Journal of molecular and cellular cardiology**, London, v. 7, n. 5, p. 315-324, may. 1975.

HECHT, S. S. Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. **Experimental Biology and Medicine**, Basel, v. 216, n. 2, p. 181-191, nov. 1997.

HECK, D. E.; LASKIN, D. L.; GARDNER, C. R.; LASKIN, J. D. Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes : potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 30, p. 21277-21280, oct. 1992.

HENNET, T.; RICHTER, C.; PETERHANS, E. Tumour necrosis factor-alpha induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. **The Biochemical Journal**, London, v. 289, n. 2, p. 587-92, jul. 1993.

HENTZE, M. W.; KUHN, L. C. Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 16, p. 8175-8182, aug. 1996.

HESS, D. T.; LIN, L. H.; FREEMAN, J. A.; NORDEN, J. J. Modification of cysteine residues within G (o) and other neuronal proteins by exposure to nitric oxide. **Neuropharmacology**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1283-1292, nov. 1994.

HIRANO, E. S.; MANTOVANI, M.; MORANDIN, R. C.; BRITO, J.; PAVANI, L. Total hepatic ischemia and reperfusion after state controlled hemorrhagic shock, with used of different solutions: effects of neutrophils sequestration in kidney of rats, **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 21, n. 1, p. 31-37, jan-feb. 2006.



HOLLIER, L. H. Acute arterial occlusion. **Cardiovascular Clinics**, Philadelphia, v. 13, n. 2, p. 49-57, 1983.

HOLROYDE, C. P.; GABUZDA, T. G.; PUTNAM, R. C.; PAUL, P.; REICHARD, G. A. Altered glucose metabolism in metastatic carcinoma. **Cancer Research**, Chicago, v. 35, n. 12, p. 3710-3714, dec. 1975.

HOLROYDE, C. P.; REICHARD, G. A. Carbohydrate metabolism in cancer cachexia. **Cancer Treatment Reports**, Silver Spring, v. 65, n. 5, p. 55-59, 1981.

HOWLETT, C. E.; HUTCHISON, J. S.; VEINOT, J. P.; CHIU, A.; MERCHANT, P.; FLISS, H. Inhaled nitric oxide protects against hyperoxia-induced apoptosis in rat lungs. **American Journal of Physiology**, Washington, v. 277, n. 3, p. L596-L605, sep. 1999.

HUANG, Z.; SHIVA, S.; KIM-SHAPIRO, D. B.; PATEL, R. P.; RINGWOOD, L. A.; IRBY, C. E.; HUANG, K. T.; HO, C.; HOGG, N.; SCHECHTER, A. N.; GLADWIN, M. T. Enzymatic function of hemoglobin as a nitrite reductase that produces NO under allosteric control. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 115, n. 8, p. 2099–2107, aug. 2005.

HUK, I.; NANOBASHVILI, J.; ORLJANSKI, W.; NEUMAYER, C. H.; PUNZ, A.; HOLZAEPFEL, A.; FUEGL, A.; MITTLBOECK, M.; POLTERAUER, P.; ROTH, E. L-arginine treatment in ischemia-reperfusion injury. **Casopis lekaru ceskych**, Praha, v. 137, n. 16, p. 496-499, aug. 1998.

IKEBE, K.; KATO, T.; YAMAGA, M.; HIROSE, J.; TSUCHIDA, T.; TAKAGI, K. Increased ischemia-reperfusion blood flow impairs the skeletal muscle contractile function. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 99, n. 1, p. 1-6, jul. 2001.

IKEBE, K.; KATO, T.; YAMAGA, M.; TSUCHIDA, T.; IRIE, H.; ONIKI, Y.; TAKAGI, K. Effect of nitric oxide on the contractile function of rat reperfused skeletal muscle. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 106, n. 1, p. 82-85, jul. 2002.

ISHIKO, O.; YASUI, T.; HIRAI, K.; HONDA, K.; SUMI, T.; NISHIMURA, S.; OGITA, S. Lipolytic activity of anemia-inducing substance from tumor-bearing rabbits. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 33, n. 2, 1999.

IYANAGI, T. Structure and function of NADPH-cytochrome P450 reductase and nitric oxide synthase reductase domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 338, n. 1, p. 520-528, dec. 2005.

JAHNGEN-HODGE, J.; OBIN, M. S.; GONG, X.; SHANG, F.; NOWELL JR, T. R.; GONG, J.; ABASI, H.; BLUMBERG, J.; TAYLOR, A. Regulation of ubiquitin-conjugating enzymes by glutathione following oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 45, p. 28218-28226, nov. 1997.

JONESCHILD, E. S.; CHEN, L. E.; SEABER, A. V.; FRANKEL, E. S.; URBANIAK, J. R. Effect of a NOS inhibitor, L\_NMMA, on the contractile function of reperfused skeletal muscle. **Journal of Reconstructive Microsurgery**, New York, v. 15, n. 1, p. 55-60, jan. 1999.

JORDAN, J. E.; ZHAO, Z. Q.; VINTEN-JOHANSEN, J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, London, v. 43, n. 4, p. 860-878, sep. 1999.

JUMRUSSIRIKUL, P.; DINERMAN, J.; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; EKELUND, U.; GEORGAKOPOULOS, D.; SCHRAMM, L. P.; CALKINS, H.; SNYDER, S. H.; HARE, J. M.; BERGER, R. D. Interaction between neuronal nitric oxide synthase and inhibitory G protein activity in heart rate regulation in conscious mice. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 102, n. 7, p. 1279-1285, oct. 1998.

KAASIK, A.; MINAJEVA, A.; DE SOUZA, E.; VENTURA-CLAPIER, R.; VEKSLER, V. Nitric oxide inhibits cardiac energy production via inhibition of mitochondrial creatine kinase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 444, n. 1, p. 75-77, feb. 1999.

KANNO, S.; LEE, P. C.; ZHANG, Y.; HO, C.; GRIFFITH, B. P.; SHEARS 2ND, L. L.; BILLIAR, T. R. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. **Circulation**, Dallas, v. 101, n. 23, p. 2742-2748, jun. 2000.

KELM, M.; FEELISCH, M.; SPAHR, R.; PIPER, H. M.; NOACK, E.; SCHRADER, J. Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from culture endothelial cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 154, n. 1, p. 236-244, jul. 1988.

KHAN, S.; TISDALE, M. J. Catabolism of adipose tissue by a tumour-produced lipid-mobilising factor. **International Journal of Cancer**, Genève, v. 80, n. 3, p. 444-447, jan. 1999.

KHANNA, A.; COWLED, P. A.; FITRIDGE, R. A. Nitric oxide and skeletal muscle reperfusion injury: current controversies (Research Review). **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 128, n. 1, p. 98-107, sep. 2005.

KIKUCHI, K.; NAGANO, T.; HAYAKAWA, H.; HIRATA, Y.; HIROBE, M. Detection of nitric oxide production from a perfused organ by a luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 65, n. 13, p. 1794-1799, jul.1993.

KING, P. J.; WIDDOWSON, P. S.; DOODS, H.; WILLIAMS, G. Effect of cytokines on hypothalamic neuropeptide Y release in vitro. **Peptides**, Fayetteville, v. 21, n. 1, p. 143-146, jan. 2000.

KLATT, P.; SCHMIDT, K.; URAY, G.; MAYER, B. Multiple catalytic functions of brain nitric oxide synthase: Biochemical characterization, cofactor-requirement, and the role of N omega-hydroxy-L-arginine as an intermediate. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 268, n. 20, p. 14781-14787, jul. 1993.

KNIGHT, K. R.; ZHANG, B.; MORRISON, W. A.; STEWART, A. G. Ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N-omega-nitro-L-arginine methyl ester and dexamethasone. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 332, n. 3, p. 273-278, aug. 1997.

KOBZIK, L.; STRINGER, B.; BALLIGAND, J. L.; REID, M. B.; STAMLER, J. S. Endothelial type nitric oxide synthase in skeletal muscle fibers: mitochondrial relationships. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 211, n. 2, p. 375-381, jun. 1995.

KOGLIN, J.; GRANVILLE, D. J.; GLYSING-JENSEN, T.; MUDGETT, J. S.; CARTHY, C. M.; MCMANUS, B. M.; RUSSELL, M. E. Attenuated acute cardiac rejection in NOS2<sup>-/-</sup> recipients correlates with reduced apoptosis. **Circulation**, Dallas, v. 99, n. 6, p. 836-842, feb. 1999.

KOJIMA, H.; KIKUCHI, K.; HIROBE, M.; NAGANO, T. Real-time measurement of nitric oxide production in rat brain by the combination of luminal-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chemiluminescence and microdialysis. **Neuroscience Letters**, Amsterdam, v. 233, n. 2-3, p. 157-159, sep. 1997.

KOSAKA, H. Nitric oxide and hemoglobin interactions in the vasculature. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1411, n. 2-3, p. 370-377, may. 1999.

KOZLOV, A. V.; STANIEK, K.; NOHL, H. Nitrite reductase activity is a novel function of mammalian mitochondria. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 454, n. 1-2, p. 127-130, jul. 1999.

KRIMMER, H.; HAHN, P.; LANZ, U. Free gracilis muscle transplantation for hand reconstruction. **Clinical Orthopaedics**, Philadelphia, v. 314, p. 13-18, may. 1995.

LANDER, H. M.; SEHAJPAL, P.; LEVINE, D. M.; NOVOGRODSKY, A. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 150, n. 4, p. 1509-1516, feb. 1993.

LARCAN, A.; MATHIEU, P.; HELMER, J.; FIEVE, G. Proceedings: Severe metabolic changes following delayed revascularization: Legrain-Cormier syndrome. **Journal of Cardiovascular Surgery**, Torino, v. 14, n. 6, p. 609-614, nov-dec. 1973.

LE, C. T.; HOLLAAR, L.; VAN DER VALK, E. J. M.; VAN DER LAARSE, A. Desferrioxamine protects myocytes against peroxide-induced myocyte damage without affecting glutathione redox cycle turnover. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, London, v. 26, n. 7, p. 877-887, Jul. 1994.

LEFER, D. J.; JONES, S. P.; GIROD, W. G.; BAINES, A.; GRISHAM, M. B.; COCKRELL, A. S.; HUANG, P. L.; SCALIA, R. Leucocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice. **American Journal of Physiology**, Washington, v. 276, n. 6, p. H1943-H1950, jun. 1999.

LEI, S. Z.; PAN, Z.-H.; AGGARWAL, S. K.; CHEN, H.-S. V.; HARTMAN, J.; SUCHER, N. J.; LIPTON, S. A. Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex. **Neuron**, Cambridge, v. 8, n. 6, p. 1087-1099, jun. 1992.

LEITE, O. D.; FATIBELLO-FILHO, O.; ROCHA, F. R. P. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n. 2, p. 337-341, mar-abr. 2004

LEPOIVRE, M.; FLAMAN, J. M.; BOBE, P.; LEMAIRE, G.; HENRY, Y. Quenching of the tyrosyl free radical of ribonucleotide reductase by nitric oxide. Relationship to cytostasis induced in tumor cells by cytotoxic macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 34, p. 21891-21897, aug. 1994.

LEPORE, D. A. Nitric oxide synthase-independent generation of nitric oxide in rat skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, Orlando, v. 4, n. 6, p. 541-545, dec. 2000.

LEPORE, D. A.; KOZLOV, A. V.; STEWART, A. G.; HURLEY, J. V.; MORRISON, W. A.; TOMASI, A. Nitric oxide synthase-independent generation of nitric oxide in rat skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, Orlando, v. 3, n. 1, p. 75-84, feb. 1999.

LI, H.; SAMOUILOV, A.; LIU, X.; ZWEIER, J. L. Characterization of the magnitude and kinetics of xanthine oxidase-catalyzed nitrite reduction. Evaluation of its role in nitric oxide generation in anoxic tissues. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 276, n. 27, p. 24482-24489, jul. 2001.

LI, H.; SAMOUILOV, A.; LIU, X.; ZWEIER, J. L. Characterization of the effects of oxygen on xanthine oxidase-mediated nitric oxide formation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 17, p. 16939–16946, apr. 2004.

LI, C.Q.; WRIGHT, T. L.; DONG, M.; DOMMELS, Y. E.; TRUDEL, L. J.; DEDON, P. C.; TANNENBAUM, S. R.; WOGAN, G. N. Biological role of glutathione in nitric oxide-induced toxicity in cell culture and animal models. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 39, n. 11, p.1489-1498, dec. 2005.

LIAUDET, L.; SORIANO, F. G.; SZABO, C. Biology of nitric oxide signaling. **Critical Care Medicine**, New York, v. 28, n. 4, p. N37-N52, apr. 2000.

LIPTON, S. A.; CHOI, Y. B.; SUCHER, N. J.; CHEN, H. S. Neuroprotective versus neurodestructive effects of NO-related species. **Biofactors**, Oxford, v. 8, n. 1-2, p. 33-40, 1998.

LIST, B. M. KLÖSCH, B.; VÖLKER, C.; GORREN, A. C. F.; SESSA, W. C.; WERNER, E. R.; KUKOVETZ, W. R.; SCHMIDT, K.; MAYER, B. Characterization of bovine endothelial nitric oxide synthase as a homodimer with down-regulated uncoupled NADPH oxidase activity: tetrahydrobiopterin binding kinetics and role of haem in dimerization. **Biochemical Journal**, London, v. 323, n. 1, p. 159-165, apr. 1997.

LIU, K.; CHEN, L.-E.; SEABER, A. V.; URBANIAK, J. R. S-nitroso-N-acetylcysteine protects skeletal muscle against reperfusion injury. **Microsurgery**, New York, v. 18, n. 5, p. 299-305, dec. 1998.

LLOVERA, M.; GARCIA-MARTINEZ, C.; AGELL, N.; MARZABAL, M.; LOPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILEZ, J. M. Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumour-bearing rats. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 338, n. 3, p. 311-318, feb. 1994.

LOS, M.; DROGE, W.; STRICKER, K.; BAEUERLE, P. A.; SCHULZE-OSTHOFF, K. Hydrogen peroxide as a potent activator of T lymphocyte functions. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v. 25, n. 1, p. 159-165, jan. 1995.

LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. S.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 193, n. 1, p. 265-275, nov. 1951.

LUNDBERG, J. O.; FARKAS-SZALLASI, T.; WEITZBERG, E.; RINDER, J.; LIDHOLM, J.; ANGGAARD, A.; HOKFELT, T.; LUNDBERG, J. M.; ALVING, K. High nitric oxide production in human paranasal sinuses. **Nature Medicine**, New York, v. 1, n. 4, p. 370-373, apr. 1995.

LUNDHOLM, K.; EDSTROM, S.; KARLBERG, I.; EKMAN, L.; SCHERSTEN, T. Glucose turnover, gluconeogenesis from glycerol, and estimation of net glucose cycling in cancer patients. **Cancer**, New York, v. 50, n. 6, p. 1142-1150, sep. 1982.

LUNDHOLM, K.; HOLM, G.; SCHERSTEN, T. Insulin resistance in patients with cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 38, n. 12, p. 4665-4670, dec. 1978.

LUNDHOLM, K.; HOLM, G.; SCHERSTEN, T. Gluconeogenesis from alanine in patients with progressive malignant disease. **Cancer Research**, Chicago, v. 39, n. 6, p. 1968-1972, jun. 1979.

MACMICKING, J.; XIE, Q.-W.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v. 15, p. 323-350, apr. 1997.

MACMILLAN-CROW, L. A.; CROW, J. P.; KERBY, J. D.; BECKMAN, J. S.; THOMPSON, J. A. Nitration and inactivation of manganese superoxide dismutase in chronic rejection of human renal allografts. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 93, n. 21, p. 11853-11858, oct. 1996.

MALINSKI, T.; TAHA, Z. Nitric oxide released from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor. **Nature**, London, n. 358, p. 676-678, aug. 1992.

MARSHALL, K. A.; REIST, M.; JENNER, P.; HALLIWELL, B. The neuronal toxicity of sulfite plus peroxynitrite is enhanced by glutathione depletion: Implications for Parkinson's disease. **Free Radicals Biology and Medicine**, Elmsford, v. 27, n. 5-6, p. 515-520, sep. 1999.

MASUNO, H.; YAMASAKI, N.; OKUDA, H. Purification and characterization of a lipolytic factor (toxohormone-L) from cell-free fluid of ascites sarcoma 180. **Cancer Research**, Chicago, v. 41, n. 1, p. 284-288, jan. 1981.

MATTHEWS, N.; NEALE, M. L.; JACKSON, S. K.; STARK, J. M. Tumour cell killing by tumour necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. **Immunology**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 153-155, sep. 1987.

MATTHYS, P.; HEREMANS, H.; OPDENAKKER, G.; BILLIAU, A. Anti-interferon- $\gamma$  antibody treatment, growth of Lewis lung tumours in mice and tumour-associated cachexia. **European Journal of Cancer**, Oxford, v. 27, n. 2, p. 182-187, 1991.

MERENYI, G.; LIND, J.; ERIKSEN, T. E. Luminol chemiluminescence: Chemistry, excitation, emitter. **Journal of bioluminescence and chemiluminescence**, Chichester, v. 5, n. 1, p. 53-56, mar. 1990.

MESSINA, A.; KNIGHT, K. R.; DOWSING, B. J.; ZHANG, B.; PHAN, L. H.; HURLEY, J. V.; MORRISON, W. A.; STEWART, A. G. Localization of inducible nitric oxide synthase to mast cells during ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle. **Laboratory Investigation**, Gainesville, v. 80, n. 3, p. 423-431, mar. 2000.

MESSMER, U. K.; BRUNE, B. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p-53-independent signaling pathways. **Biochemical Journal**, London, v. 319, n. 1, p. 299-305, oct. 1996.

METCALF, K.; JUNGERSTEN, L.; LISANDER, B. Effective inhibition of nitric oxide production by aminoguanidine does not reverse hypotension in endotoxaemic rats. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, Aarhus, v. 46, n. 1, p. 17-23, jan. 2002.

MILLAR, T. M.; STEVENS, C. R.; BENJAMIN, N.; EISENTHAL, R.; HARRISON, R.; BLAKE, D. Xanthina oxidoreductase catalyses the reduction of nitrates and nitrite to nitric oxide under hypoxia conditions. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 427, n. 2, p. 225-228, may. 1998.

MILLER, G. L. Protein determination for large number of samples. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 31, n. 5, p. 964, may. 1959.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, Orlando, v. 5, n. 1, p. 62-71, feb. 2001.

MOHR, S.; HALLAK, H.; BOITTE, A.; LAPETINA, E. G.; BRÜNE, B. Nitric oxide-induced S-glutathionylation and inactivation of glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 274, n. 14, p. 9427-9430, apr. 1999.

MOORE, F. D.; CAINE, W. T. Emerging immunologic basis of reperfusion injury. **Transplantation Reviews**, Copenhagen, v. 14, n. 3, p.158-167, jul. 2000.

MOORE-CARRASCO, R.; BUSQUETS, S.; ALMENDRO, V.; PALANKI, M.; LOPEZ-SORIANO, F. J.; ARGILES, J. M. The AP-1/NF-kappaB double inhibitor SP100030 can revert muscle wasting during experimental cancer cachexia. **International Journal of Oncology**, Athens, v. 30, n. 5, p. 1239-1245, may. 2007.

MORRIS, C. A.; MORRIS, L. D.; KENNEDY, A. R.; SWEENEY, H. L. Attenuation of skeletal muscle atrophy via protease inhibition. **Journal of Applied Physiology**, Washington, v. 99, n. 5, p. 1719-1727, nov. 2005.

MUELLER, P. J.; FOLEY, C. M.; HASSER, E. M. Hindlimb unloading alters nitric oxide and autonomic control of resting arterial pressure in conscious rats. **American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, Bethesda, v. 289, n. 1, p. R1 40-47, jul. 2005.

MURRY, C. E.; JENNINGS, R. B.; REIMER, K. A. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. **Circulation**, Dallas, v. 74, n. 5, p. 1124-1136, nov. 1986.

NAGASE, S.; TAKEMURA, K.; UEDA, A.; HIRAYAMA, A.; AOYAGI, K.; KONDOH, M.; KOYAMA, A. A novel nonenzymatic pathway for generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 233, n. 1, p. 150-153, apr.1997.

NAKAMURA, K.; YOKOYAMA, K.; ITOMAN, M. Changes in nitric oxide, superoxide, and blood circulation in rabbit rectus femoris muscle. **Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery**, Stockholm, v. 35, n. 1, p. 13-18, mar. 2001.

NANOBASHVILI, J.; NEUMAYER, C.; FUEGL, A.; PUNZ, A.; BLUMER, R.; MITTLBOCK, M.; PRAGER, M.; POLTERAUER, P.; DOBRUCKI, L. W.; HUK, I.; MALINSKI, T. Combined L-arginine and antioxidative vitamin treatment mollifies ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle. **Journal of Vascular Surgery**, Philadelphia, v. 39, n. 4, p. 868-877, apr. 2004.

NATHAN, C.; XIE, Q. W. Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls. **Cell**, Cambridge, v. 78, n. 6, p. 915-918, sep. 1994.

NOHL, H.; KOZLOV, A. V.; STANIEK, K.; GILLE, L. The multiple functions of coenzyme Q. **Bioorganic Chemistry**, New York, v. 29, n. 1, p. 1-13, feb. 2001.



NOHL, H.; STANIEK, K.; SOBHIAN, B.; BAHRAMI, S.; REDL, H.; KOZLOV, A. V. Mitochondria recycle nitrite back to the bioregulator nitric monoxide. **Acta Biochimica Polonica**, Warszawa, v. 47, n. 4, p. 913–921, 2000.

OBIN, M.; SHANG, F.; GONG, X.; HANDELMAN, G.; BLUMBERG, J.; TAYLOR, A. Redox regulation of ubiquitin-conjugating enzymes: mechanistic insights using the thiol-specific oxidant diamide. **Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, Bethesda, v. 12, n. 7, p. 561-569, may. 1998.

O'DONNELL, T. F.; CLOWES, G. H. A.; BROWSE, N. L.; RYAN, N. T.; BLACKBURN, G. L. A metabolic approach to the evaluation of peripheral vascular disease. *Surgery, Gynecology and Obstetrics*, Chicago, v. 144, p. 51-47, 1977.

ÖHLIN, H.; PAVLIDIS, N.; ÖHLIN, A-K. Effect of intravenous nitroglycerin on lipid peroxidation after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction, **American Journal of Cardiology**, New York, v. 82, n. 12, p. 1463-1467, dec. 1998.  
OMS, International Agency for Research on Cancer. **World Cancer Report**. Lyon: IARC Press, 2003.

OXTOBY, D.W.; NACHTRIEB, N.H (eds). **Principles of Modern Chemistry**. 3. ed. Fort Worth Brace: Harcourt, 1996. p. 848.

OZAKI, M.; KAWASHIMA, S.; HIRASE, T.; YAMASHITA, T.; NAMIKI, M.; INOUE, N.; HIRATAKI, K.; YOKOYAMA, M. Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells is protective against ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 160, n. 4, p. 1335-1344, apr. 2002.

PARKS, D. A.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. **Acta Physiologica Scandinavica Supplementum**, Stockholm, v. 548, p. 87–99, 1986.

PENNER, C. G.; GANG, G.; WRAY, C.; FISCHER, J. E.; HASSELGREN, P. O. The transcription factors NF-kappaB and AP-1 are differentially regulated in skeletal muscle during sepsis. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 281, n. 5, p. 1331-1336, mar. 2001.

PEREIRA, S. R. C.; DARRONQUI, E.; CONSTANTIN, J.; SILVA, M. H. R. A.; YAMAMOTO, N. S.; BRACHT, A. The urea cycle and related pathways in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1688, n. 3, p. 187-196, apr. 2004.

PERRY, M. O. Compartment syndromes and reperfusion injury. **Surgical Clinics of North America**, v. 68, n. 4, Philadelphia, p. 853-64, aug. 1988.

PETSUL, P. H.; GREENWAY, G. M.; HASWELL, S. J. The development of an on-chip micro-flow injection analysis of nitrate with a cadmium reductor. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 428, n. 2, p. 155-161, feb. 2001.

PIFFAR, P. M.; FERNANDEZ R.; TCHAIKOVSKI O.; HIRABARA S. M.; FOLADOR A.; PINTO G. J.; JAKOBI S.; GOBBO-BORDON D.; ROHN T. V.; V. FABRÍCIO E. B. et al. Naproxen, clenbuterol and insulin administration ameliorates cancer cachexia and reduce tumor growth in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 201, n. 2, p. 139-148, Nov. 2003.

PINTO, J. A.; FOLADOR, A.; BONATO, S. J.; AIKAWA, J.; YAMAZAKI, R. K.; PIZATO, N.; FACIN, M.; GROHS, H.; OLIVEIRA, H. H. P.; NALIWAIKO, K. et al. Fish oil supplementation in F1 generation associated with naproxen, clenbuterol, and insulin administration reduce tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, New York, v. 15, n. 6, p. 358-365, jun. 2004.

PIZATO, N.; BONATTO, S.; PICONCELLI, M.; SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; NALIWAIKO, K.; NUNES, E. A.; CURI, R.; CALDER, P. C.; FERNANDES, L. C. Fish oil alters T-lymphocyte proliferation and macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutrition**, Burbank, n. 4, p. 425-432, apr. 2006.

PIZATO, N.; BONATTO, S.; YAMAZAKI, R. K.; AIKAWA, J.; NOGATA, C.; MUND, R. C.; NUNES, E. A.; PICONCELLI, M.; NALIWAIKO, K.; CURI, R.; CALDER, P. C.; FERNANDES, L. C. Ratio of n6 to n-3 fatty acids in the diet affects tumor growth and cachexia in Walker 256 tumor-bearing rats. **Nutrition and Cancer**, Philadelphia, v. 53, n. 2, p. 194-201, 2005.

PLATA-SALAMAN, C. R. Central nervous system mechanisms contributing to the cachexia-anorexia syndrome. **Nutrition**, Burbank, v. 16, n. 10, p. 1009-1012, oct. 2000.

PORASUPHATANA, S.; TSAI, P.; ROSEN, G. M. The generation of free radicals by nitric oxide synthase. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, London, v. 134, n. 3, p. 281-289, mar. 2003.

POU, S.; POU, W. S.; BREDET, D. S.; SNYDER, S. H.; ROSEN, G. M. Generation of superoxide by purified brain nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 267, n. 34, p. 24173-24176, dec. 1992.

PRICE, S. R. Increased transcription of ubiquitin-proteasome system components: molecular responses associated with muscle atrophy. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Exeter, v. 35, n. 5, p. 617-628, may. 2003.

RADI, R. A.; RUBBO, H.; PRODANOV, E. Comparison of the effects of superoxide dismutase and cytochrome c on luminol chemiluminescence produced by xanthine oxidase-catalysed reactions. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 994, n. 1, p. 89-93, jan. 1989.

RADI, R.; BECKMAN, J. S.; BUSH, K. M.; FREEMAN, B. A. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 288, n. 2, p. 481-487, aug. 1991.

RADI, R.; COSGROVE, T. P.; BECKMAN, J. S.; FREEMAN, B. A. Peroxynitrite-induced luminol chemiluminescence. **Biochemical Journal**, London, v. 290, n. 1, p. 51-57, feb. 1993.

RADOMSKI, M. W.; PALMER, R. M.; MONCADA, S. Characterization of the L-arginine nitric oxide pathway in human platelets. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 101, n. 2, p. 325-328, oct. 1990.

RAO, K. M. K.; PADMANABHAN, J.; KILBY, D. L.; COHEN, H. J.; CURRIE, M. S.; WEINBERG, J. B. Flow cytometric analysis of nitric oxide production in human neutrophils using dichlorofluorescein diacetate in the presence of a calmodulin inhibitor. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 51, n. 5, p. 496-500, may. 1992.

REICHNER, J. S.; MESZAROS, A. J.; LOUIS, C. A.; HENRY JUNIOR, W. L.; MASTROFRANCESCO, B.; MARTIN, B. A.; ALBINA, J. E. Molecular and metabolic evidence for the restricted expression of inducible nitric oxide synthase in healing wounds. **American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 154, n. 4, p. 1097-1104, apr. 1999.

REID, M. B.; LI, Y. P. Cytokines and oxidative signaling in skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, Stockholm, v. 171, n. 3, p. 225-232, mar. 2001.

REIMER, K.A.; JENNINGS, R.B.; TATUM, A.M. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. **American Journal of Cardiology**, New York, v. 52, n. 2, p. 72A-81A, jul.1983.

ROBARDS, K.; WORSFOLD, P. J. Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 266, n. 2, p. 147-173, sep. 1992.

SALVEMINI, D. Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 53, n. 7, p. 576-582, jul. 1997.

SAMOUILOV, A.; KUPPUSAMY, P.; ZWEIER, J. L. Evaluation of the magnitude and rate of nitric oxide production from nitrite in biological systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 357, n. 1, p. 1-7, sep. 1998.

SARDINHA, W. E. **Isquemia e reperfusão da musculatura esquelética em ratos: Inibição das lesões lipoperoxidativas mediadas por radicais livres pela desferroxamina**. 1994. Tese de Doutorado (Doutorado em Cirurgia Vascular, Cardíaca, Torácica e Anestesiologia) - Escola Paulista de Medicina, São Paulo.

SASTRY, K. V. H.; MOUDGAL, R. P.; MOHAN, J.; TYAGI, J. S.; RAO, G. S. Spectrophotometric determination of serum nitrite and nitrate by copper-cadmium alloy. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 306, n. 1, p. 79-82, jul. 2002.

SCHACHTER, M.; FOULDS, S. Free radicals and the xanthine oxidase pathway. In: GRACE, P. A.; MATHIE, R. T (eds). **Ischaemia-reperfusion injury**. Oxford: Blackwell Science, 1999. p. 137.

SCHRECK, R.; RIEBER, P.; BAEUERLE, P. A. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. **European Molecular Biology Organization Journal**, Eynsham, v. 10, n. 8, p. 2247-2258, aug. 1991.

SCHROEDER, H. R.; YEAGER, F. M. Chemiluminescence yields and detection limits of some isoluminol derivatives in various oxidation systems. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 50, n. 8, p. 1114-1120, jul. 1978.

SHAH, V.; KAMATH, P. S. Nitric Oxide in Liver Transplantation: Pathobiology and Clinical Implications. **Liver Transplantation**, Philadelphia, v. 9, n. 1, p. 1-11, jan. 2003.

SHLAFER, M.; KANE, P. F.; WIGGINS, V. Y.; KIRSH, M. M. Possible role for cytotoxic oxygen metabolites in the pathogenesis of cardiac ischemic injury. **Circulation**, Dallas, v. 66, n. 2, part. 2, p. 185-192, aug. 1982.

SHANG, F.; GONG, X.; TAYLOR, A. Activity of ubiquitin-dependent pathway in response to oxidative stress. Ubiquitin-activating enzyme is transiently up-regulated. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 272, n. 37, p. 23086-23093, sep. 1997.

SHIMIZU, Y.; SAKAI, M.; UMEMURA, Y.; UEDA, H. Immunohistochemical localization of nitric oxide synthase in normal human skin: expression of endothelial-type and inducible-type nitric oxide synthase in keratinocytes. **Journal of Dermatology**, Tokyo, v. 24, n. 2, p. 80-87, feb. 1997.

SHIN, W. S.; HONG, Y. H.; PENG, H. B.; DE CATERINA, R.; LIBBY, P.; LIAO, J. K. Nitric oxide attenuates vascular smooth muscle cell activation by interferon-gamma. The role of constitutive NF-kappa B activity. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 271, n. 19, p. 11317-11324, may. 1996.

SHIZUKUDA, Y.; TANG, S.; YOKOTA, R.; WARE, J. A. Vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell migration and proliferation depend on a nitric oxide-mediated decrease in protein kinase C delta activity. **Circulation Research**, Baltimore, v. 85, n. 3, p. 247-256, aug. 1999.

SMITH, H. J.; LORITE, M. J.; TISDALE, M. J. Effect of a cancer cachectic factor on protein synthesis/degradation in murine C2C12 myoblasts: modulation by eicosapentaenoic acid. **Cancer Research**, Chicago, v. 59, n. 21, p. 5507-5513, nov. 1999.

SMITH, H. J.; WYKE, S. M.; TISDALE, M. J. Role of protein kinase C and NF-kappaB in proteolysis-inducing factor-induced proteasome expression in C(2)C(12) myotubes. **British Journal of Cancer**, London, v. 90, n. 9, p. 1850-1857, may. 2004.

SPIECKER, M.; DARIUS, H.; KABOTH, K.; HUBNER, F.; LIAO, J. K. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 63, n. 6, p. 732-739, dec. 1998.

STAMLER, J. S.; JARAKI, O.; OSBORNE, J.; SIMON, D. I.; KEANEY, J.; VITA, J.; SINGEL, D.; VALERI, C. R.; LOSCALZO, J. Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 89, n. 16, p. 674-7677, aug. 1992.

STAMLER, J. S. Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. **Cell**, Cambridge, v. 78, n. 6, p. 931-936, sep. 1994.

STAMLER, J. S.; MEISSNER, G. Physiology of nitric oxide in skeletal muscle. **Physiological Reviews**, Washington, v. 81, n. 1, p. 209-237, jan. 2001.

STEINAU, H. U. **Major limb replantation and postischemia syndrome**: investigation of acute ischemia-induced myopathy and reperfusion injury. New York: Springer Verlag, 1988.

STROES, E.; HIJMERING, M.; VAN ZANDVOORT, M.; WEVER, R.; RABELINK, T. J.; VAN FAASSEN, E. E. Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 438, n. 3, p. 161-164, nov. 1998.

SUZUKAWA, A. A. **Estresse oxidativo hepático no desenvolvimento da caquexia induzida pelo tumor de Walker-256 em ratos**. 2005. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

SZABO, C. Role of poly (ADP-ribose) synthetase activation in the suppression of cellular energetics in response to nitric oxide and peroxynitrite. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 25, n. 3, p. 919-924, aug. 1997.

TAKEHARA, Y.; NAKAHARA, H.; INAI, Y.; YABUKI, M.; HAMAZAKI, K.; YOSHIOKA, T.; INOUE, M.; HORTON, A. A.; UTSUMI, K. Oxygen-dependent reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. **Cell Structure and Function**, Okayama, v. 21, n. 4, p. 251-258, aug. 1996.

TAKEMURA, S.; MINAMIYAMA, Y.; IMAOKA, S.; FUNAE, Y.; HIROHASHI, K.; INOUE, M.; KINOSHITA, H. Hepatic cytochrome P450 is directly inactivated by nitric oxide, not by inflammatory cytokines, in the early phase of endotoxemia. **Journal of Hepatology**, Copenhagen, v. 30, n. 6, p. 1035-1044, jun. 1999.

TAYEK, J. A.; ISTFAN, N. W.; JONES, C. T.; HAMAWY, K. J.; BISTRIAN, B. R.; BLACKBURN, G. L. Influence of Walker-256 carcinosarcoma on muscle, tumor, and whole-body protein synthesis and growth rate in the cancer-bearing rat. **Cancer Research**, Chicago, v. 46, n. 11, p. 5649-5654, nov. 1986.

TEMPARIS, S.; ASENSI, M.; TAILLANDIER, D.; AUROUSSEAU, E.; LARBAUD, D.; OBLED, A.; BECHET, D.; FERRARA, M.; ESTRELA, J. M.; ATTAIX, D. Increased ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscles of tumor-bearing rats. **Cancer Research**, Chicago, v. 54, n. 21, p. 5568-5573, nov. 1994.

TESSITORE, L.; COSTELLI, P.; BACCINO, F. M. Pharmacological interference with tissue hypercatabolism in tumour-bearing rats. **The Biochemical Journal**, London, v. 299, n. 1, p. 71-78, apr. 1994.

THOMAS, D. D., LIU, X., KANTROW, S. P., LANCASTER, J. R. The biological lifetime of nitric oxide: implications for the perivascular dynamics of NO and O<sub>2</sub>. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 98, n. 1, p. 355-360, jan. 2001.

TISDALE, M. J. Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. **Nutrition**, Burbank, v. 16, n. 10, p. 1013-1014, oct. 2000.

TISDALE, M. J. Cancer anorexia and cachexia. **Nutrition**, Burbank, v. 17, n. 5, p. 438-442, may. 2001.

TOKER, A. Signaling through protein kinase C. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, v. 3, p. D1134-D1147, nov. 1998.

TOMKINSON, B. Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v. 24, n. 9, p. 355-359, sep. 1999.

TSUKADA, Y.; YASUTAKE, M.; JIA, D.; KUSAMA, Y.; KISHIDA, H.; TAKANO, T.; TSUKADA, S. Real-time measurement of nitric oxide by luminol-hydrogen peroxide reaction in crystalloid perfused rat heart. **Life Sciences**, Oxford, v. 72, n. 9, p. 989-1000, jan. 2003.

VINTEN-JOHANSEN, J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. **Cardiovascular Research**, London, v. 61, n. 3, p. 481- 497, feb. 2004.

VOZZO, R.; WITTERT, G. A.; CHAPMAN, I. M.; FRASER, R.; HOPE, P. J.; HOROWITZ, M.; ALSHAHER, M. M.; KUMAR, V. B.; MORLEY, J. E. Evidence that nitric oxide stimulates feeding in the marsupial *Sminthopsis crassicaudata*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, Oxford, v. 123, n. 2, p. 145-151, jun. 1999.

WALLACE, F. A.; NEELY, S. J.; MILES, E. A.; CALDER, P. C. Dietary fats affect macrophage-mediated cytotoxicity towards tumour cells. **Immunology and Cell Biology**, Adelaide, v. 78, n. 1, p. 40-48, feb. 2000.

WANG, J. F.; KOMAROV, P.; SIES, H.; DE GROOT, H. Contribution of nitric oxide synthase to luminol-dependent chemiluminescence generated by phorbol-ester-activated Kupffer cells. **Biochemical Journal**, London, v. 279, n. 1, p. 311-314, oct. 1991.

WANG, M. C.; FORSBERG, N. E. Effects of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on protein turnover in cultured muscle cells. **Cytokine**, Philadelphia, v. 12, n. 1, p. 41-48, jan. 2000.

WANG, M. X.; MURRELL, D. F.; SZABO, C.; WARREN, R. F.; SARRIS, M.; MURRELL, G. A. Nitric Oxide in Skeletal Muscle: Inhibition of Nitric Oxide Synthase Inhibits Walking Speed in Rats. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, Orlando, v. 5, n. 3, p. 219-232, may. 2001.

WANG, R.; GHAHARY, A.; SHEN, Y. J.; SCOTT, P. G.; TREDGET, E. E. Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 106, n. 3, p. 419-427, mar. 1996.

WANG, W. Z.; ANDERSON, G.; FLEMING, J. T.; PETER, F. W.; FRANKEN, R. J.; ACLAND, R. D.; BARKER, J. Lack of nitric oxide contributes to vasospasm during ischemia/reperfusion injury. **Plastic and Reconstructive Surgery**, Baltimore, v. 99, n. 4, p. 1099-1108, apr. 1997.

WARREN, S. The immediate cause of death in cancer. **American Journal of the Medical Sciences**, Philadelphia, v. 184, p. 610-613, 1932.

WATMOUGH, N. J.; BUTLAND, G.; CHEESMAN, M. R.; RICHARDSON, D. J.; SPIRO, S. Nitric oxide in bacteria: synthesis and consumption. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1411, n. 2-3, p. 456-474, may. 1999.

WEINER, C. P.; LIZASOAIN, I.; BAYLIS, S. A.; KNOWLES, R. G.; CHARLES, I. G.; MONCADA, S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 91, n. 11, p. 5212-5216, may. 1994.

WERNER-FELMAYER, G.; WERNER, E. R.; FUCHS, D.; HAUSEN, A.; REIBNEGGER, G.; WACHTER, H. Tetrahydrobiopterin-dependent formation of nitrite and nitrate in murine fibroblasts. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 172, n. 6, p. 1599-1607, dec. 1990.

WILLIS, R. A.; NUSSLER, A. K.; FRIES, K. M.; GELLER, D. A.; PHIPPS, R. P. Induction of nitric oxide synthase in subsets of murine pulmonary fibroblasts: effect on fibroblast interleukin-6 production. **Clinical Immunology and Immunopathology**, New York, v. 71, n. 2, p. 231-239, may. 1994.

WING, S. S. Control of ubiquitination in skeletal muscle wasting. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 37, n. 10, p. 2075-2087, oct. 2005.

WINK, D. A.; MITCHELL, J. B. Chemical biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. **Free Radicals Biology and Medicine**, Elmsford, v. 25, n. 4-5, p. 434-456, sep. 1998.

WINNINGER, A. General consequences of revascularisation after acute ischemia of the limbs. Experimental study. **Presse Médicale**, Paris, v. 77, n. 38, p. 1319-1320, sep. 1969.



WONG, M. S.; LARA, T. M.; KOBZIK, L.; ROUNDS, J. D.; ROBINSON, M. K.; JACOBS, D. O. Hindlimb ischemia-reperfusion increases complement deposition and glycolysis. **Journal of Surgical Research**, Philadelphia, v. 85, n. 1, p. 130-135, jul. 1999.

WYKE, S. M.; TISDALE, M. J. NF- $\kappa$ B mediates proteolysis-inducing factor induced protein degradation and expression of the ubiquitin-proteasome system in skeletal muscle. **British Journal of Cancer**, London, v. 92, n. 4, p. 711-721, feb. 2005.

XIA, Y.; ROMAN, L. J.; MASTERS, B. S.; ZWEIER, J. L. Inducible nitric oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 35, p. 22635-22639, aug. 1998.

XU, L.; EU, J. P.; MEISSNER, G.; STAMLER, J. S. Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. **Science**, Washington, v. 279, n. 5348, p. 234-237, jan. 1998.

YABUKI, M.; KARIYA, S.; INAI, Y.; HAMAZAKI, K.; YOSHIOKA, T.; YASUDA, T.; HORTON, A. A.; UTSUMI, K. Molecular mechanisms of apoptosis in HL-60 cells induced by a nitric oxide-releasing compound. **Free Radical Research**, Yverdon, v. 27, n. 3, p. 325-335, sep. 1997.

YAO, D.; VLESSIDIS, A. G.; EVMIRIDIS, N. P.; EVANGELOU, A.; KARKABOUNAS, S.; TSAMPALAS, S. Luminol chemiluminescence reaction: a new method for monitoring nitric oxide in vivo. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 458, n. 2, p. 281-289, may. 2002.

YAVUZ, D.; KÜÇÜKKAYA, B.; HAKLAR, G.; ERSÖZ, ö.; AKOGLU, E.; AKALIN, S. Effects of captopril and losartan on lipid peroxidation, protein oxidation and nitric oxide release in diabetic rat kidney. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, Edinburgh, v. 69, n. 4, p. 223-227, oct. 2003.

YOUNES, R. N.; NOGUCHI, Y. Pathophysiology of cancer cachexia. **Revista do Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, São Paulo, v. 55, n. 5, p. 181-193, sep-oct. 2000.

YUI, Y.; HATTORI, R.; KOSUGA, K.; EIZAWA, H.; HIKI, K.; OHKAWA, S.; OHNISHI, K.; TERAOKA, S.; KAWAI, C. Calmodulin-independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 6, p. 3369-3371, feb. 1991.

ZHANG, B.; KNIGHT, K. R.; DOWSING, B.; GUIDA, E.; PHAN, L. H.; HICKEY, , M. J.; MORRISON, W. A.; STEWART, A. G. Timing administration of dexamethasone or the nitric oxide synthase inhibitor, nitro-L-arginine methyl ester, is critical for effective treatment of ischaemia-reperfusion injury to rat skeletal muscle. **Clinical Science**, London, v. 93, n. 2, p. 167-174, aug. 1997.

ZHANG, L.; LOONEY, C. G.; QI, W. N.; CHEN, L. E.; SEABER, A. V.; STAMLER, J. S.; URBANIAK, J. R. Reperfusion injury is reduced in skeletal muscle by inhibition of inducible nitric oxide synthase. **Journal of Applied Physiology**, v. 94, n. 4, p. 1473-1478, apr. 2003.

ZHOU, J.; BERNHARD, B. NO and transcriptional regulation: from signaling to death. **Toxicology**, Amsterdam, v. 208, n. 2, p. 223-233, mar. 2005.

ZIMIANI, K.; GUARNIER, F. A.; MIRANDA, H. C.; WATANABE, M. A.; CECCHINI, R. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, Orlando, v. 13, n. 3, p. 196-203, nov. 2005.

ZWEIER, J. L.; WANG, P.; SAMOUILOV, A.; KUPPUSAMY, P. Enzyme-independent formation of nitric oxide in biological tissues. **Nature Medicine**, New York, v. 1, n. 8, p. 804-809, aug. 1995.

ZWEIER, J. L.; KUPPUSAMY, P.; LUTTY, G. A. Measurement of endothelial cell free radical generation: evidence for a central mechanism of free radical injury in postischemic tissues. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 85, n. 11, p. 4046-4050, jun. 1988.

**ANEXO**

**DIRECT MEASUREMENT OF NITRIC OXIDE BY LUMINOL-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-INDUCED CHEMILUMINESCENCE ON RAT SKELETAL MUSCLE SUBJECTED TO ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY**

Cristiane Akemi Iamamoto, Alexandre Yukio Saito, Alessandra Lourenço Cecchini, Rubens Cecchini

From the Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil

To whom correspondence should be addressed: Rubens Cecchini, Laboratório de Fisiopatologia dos Radicais Livres, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid km 380, Londrina, Paraná, Brasil, 86051990. Tel/Fax: (43) 3371-4267. E-mail: [cecchini@uel.br](mailto:cecchini@uel.br)

## ABSTRACT

Nitric oxide and peroxynitrite has been suggested to be implicated in skeletal muscle damage during ischemia-reperfusion injury. Using a specific and sensitive chemiluminescence method, nitric oxide production was directly detected on skeletal muscle. Adult male Wistar rats were subjected to 4 h of partial ischemia by applying of a tourniquet at left hindlimb followed by 1, 2 or 4 h reperfusion. L-arginine methyl ester (20mg/kg), aminoguanidine (50mg/kg) or desferrioxamine (60mg/kg) was injected intraperitoneally 1 h before to begin reperfusion. *Gastrocnemius* muscles were excised, homogenized (0.05% w/v) in 2mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, at pH 8.5, previously degassed by N<sub>2</sub>, diluted 20 times and added to reaction mixture of luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system (4.39 μM luminol, 36.58 μM desferrioxamine, 2.44 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and degassed 2mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, at pH 8.5, 25°C). Standard nitric oxide solution was used for the calibration curve (20.80-355.55 aM) using the height and the area under chemiluminescence curve for the nitric oxide measurement. Nitric oxide levels increased only after 4 h reperfusion (p<0.001) which was significantly inhibited by aminoguanidine (p<0.001), L-arginine methyl ester (p<0.001) and desferrioxamine (p<0.001). These results revealed the involvement of nitric oxide, possibly through peroxynitrite, after 4 h reperfusion and confirm previous studies in our laboratory that showed increased muscle lipid hydroperoxides and inducible nitric oxide synthase expression, which occurred after 4 h reperfusion, but not after ischemia. This is the first direct evidence showing increased generation and participation of nitric oxide on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury.

Keywords: nitric oxide, ischemia-reperfusion injury, skeletal muscle, chemiluminescence

## INTRODUCTION

Nitric oxide ( $\text{NO}$ ) plays an important role as intracellular and intercellular messenger, acting as vasodilator, neurotransmitter, and inflammatory mediator [1, 2]. In mammals,  $\text{NO}$  is synthesized through conversion of L-arginine to L-citrulline by nitric oxide synthase (NOS) [3], in spite of  $\text{NO}$  can be generated by NOS-independent pathways at particular conditions [4, 5].

$\text{NO}$  and peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ), a reactive nitrogen specie (RNS), have been implicated in several pathological conditions, including ischemia-reperfusion injury (IRI) [6, 7]. IRI is defined as the paradoxical exacerbation of cellular dysfunction and death following the restoration of blood flow to previously ischemic tissues which occurs in a wide range of organs as heart [8], lung [9], kidney [10], brain [11], liver [12], and skeletal muscle [7]. It can arise as a consequence of a range of vascular manipulation procedures including repair of abdominal aortic aneurisms [13], thrombolytic therapy [14], volemic replacement [15], and organs transplantation [16]. Skeletal muscle IRI is a common complication of tissue transfer for reconstructive surgical following tumor resection [17], and for plastic surgical [18].

Numerous studies have investigated  $\text{NO}$  participation on skeletal muscle IRI [19-36]. Nevertheless,  $\text{NO}$  and  $\text{ONOO}^-$  role in this pathological condition remains controversial since has been reported to be either deleterious or beneficial.

$\text{NO}$  detection is considered difficult due to its instability at physiological oxygen tension [1]. Thus, several indirect methods to investigate  $\text{NO}$  effects on both physiological and pathological conditions have been used, including inhibitors of  $\text{NO}$  synthesis [20, 22, 26, 36],  $\text{NO}$  donors [25, 32], transgenic mice [27, 29, 34],  $\text{NO}$  precursors [23, 24, 35], detection of  $\text{NO}$  oxidative degradation products [19, 37], NOS mRNA [28], and nitrosyl-hemoglobin [38]. However, all of these methods have shown limitations. The Griess assay, used for

detection of nitrite and/or nitrate, both oxidation products of  $\cdot\text{NO}$ , has shown low specificity because these substances are considered ubiquitous contaminants in water and common products of bacterial metabolism [1] and low sensibility ( $\mu\text{M}$ ). Analogues of L-arginine containing nitro groups, such as some NOS inhibitors (LNAME, AG, and LNNA), have been suggested to interfere in Griess assay [39]. Even the use of transgenic mice can produce controversial results due to compensatory mechanisms [40]. Thus, a direct method has been required to clarify  $\cdot\text{NO}$  involvement on skeletal muscle IRI.

A chemiluminescence method highly sensitive and specific for  $\cdot\text{NO}$  detection based on the luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$  system has been proposed in association with organs perfusion and microdialysis techniques (2, 41-43). Both  $\text{ONOO}^-$  (41) and singlet oxygen (44, 45) have been suggested to be responsible for chemiluminescence emitted by reaction among  $\cdot\text{NO}$ ,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , and luminol.

In this study, we standardized the luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced chemiluminescence assay mentioned above for  $\cdot\text{NO}$  measurement on muscle homogenates to investigate the involvement of  $\cdot\text{NO}$  on skeletal muscle IRI.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Reagents** – All chemicals were obtained from Merck or Sigma laboratories.

**Animals** – Adult male Wistar rats weighing 200-300g were obtained from the Animal House of the Biological Sciences Center at the State University of Londrina and kept in propylene cages with a stainless steel cover, under controlled temperature and ventilation and a 12 h photoperiod until the beginning of experiments. All animals had food and water available *ad libitum*.

**Ischemia-reperfusion protocol** – Rats were anesthetized by inhalation of ether ethilic and the left hindlimb was exsanguinated using a Penrose drain prior to apply a nylon tourniquet at the limb root for ischemia induction [46]. After 4h ischemia, the tourniquet was removed and the limb was reperfused for 1, 2 or 4h. Sham control animals were anesthetized without the ischemia induction and further handled in the same manner as the experimental ones. Aminoguanidine (AG 50mg/kg), L-arginine methyl ester (LNAME 20mg/kg), or desferrioxamine (DFO 60mg/kg) was administered intraperitoneally (ip) 1h prior to begin 4h reperfusion. Sham control and experimental animals were anesthetized by injection ip of sodium pentobarbitone (50mg/kg) and *gastrocnemius* muscles were excised and kept frozen in liquid nitrogen until analysis. The number of animals used for experiments was mentioned at legends of figures in the Results section.



**Standard  $\dot{\text{NO}}$  solution** – 400 pM  $\dot{\text{NO}}$  was synthesized by reaction of nitrite reduction at acidic pH [43]. In this reaction, it was used 1.8mL of 0.1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  / 0.1M KI and 7.2mL of 0.1mM  $\text{NaNO}_2$ . The solution of 400 pM  $\dot{\text{NO}}$  was diluted (20.80-355,55 aM) using 2 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  buffer, at pH 8.5, previously degassed by  $\text{N}_2$ .

**Muscle homogenates** – *Gastrocnemius* muscles were homogenized at 0.05% (w/v) in 2 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  buffer, at pH 8.5, previously degassed by  $\text{N}_2$  through 45s period of homogenization using an Ultraturrax homogenizer (Marconi, Brazil). Muscle homogenates (0.05%) were diluted to a concentration range of 0.00125-0.05% with the same buffer and analyzed by chemiluminescence. To investigate  $\dot{\text{NO}}$  role on skeletal muscle IRI, the tissue concentration of 0.0025% was adopted for all of experiments.

**Luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$ -induced chemiluminescence assay** – Equal volumes of 360  $\mu\text{M}$  luminol / 3 mM DFO and 200 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  were mixed and incubated at room temperature, under moderate agitation for 5 minutes. To initiate the chemiluminescence reaction, 20  $\mu\text{L}$  of this mixture were added to 800  $\mu\text{L}$  of standard  $\dot{\text{NO}}$  solutions or muscle homogenates through an accurate syringe (Hamilton, USA). Chemiluminescence spectrum was recorded for 5 minutes using a TD 20/20 luminometer (Turner Designs, USA) with detection capacity of a wavelength range of 300-650 nm and 68.5% of sensibility. The luminometer was connected to a microcomputer through Spreadsheet Interface v. 1.0 program to record chemiluminescence emission. Origin v. 7.5 program was used to plot chemiluminescence curves that were analyzed using the height and area under the curves. Angular coefficients of the straight lines obtained from standard calibration curves were used to calculate  $\dot{\text{NO}}$  levels on tissue. Each sample was analyzed on triplicate. Levels of  $\dot{\text{NO}}$  were expressed as fmol per g of tissue.

**Saturation of muscle homogenates with oxygen** – 0.0025% muscle homogenate obtained from one control rat was saturated with oxygen (5% CO<sub>2</sub>; 95% O<sub>2</sub>, Aga, Brazil) for 30 minutes and analyzed on triplicate by chemiluminescence.

**Induction of chemiluminescence quenching by <sup>14</sup>NO excess in muscle homogenates** – 4.5 mL of 376 pM <sup>14</sup>NO solution, at pH 8.5, were added to 0.5 mL of 0.025% muscle homogenate obtained from one control rat. The muscle homogenate with <sup>14</sup>NO excess was analyzed on triplicate by chemiluminescence.

**Statistical analysis** – Results are shown as means ± SEM. Data were evaluated by GraphPad InStat v. 3.05 program, using one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures with the Tukey-Kramer multiple comparison procedure. A difference of p<0.05 was considered significant.

## RESULTS

### **Standardization of method for $\dot{\text{NO}}$ measurement by $\text{H}_2\text{O}_2$ -luminol-induced chemiluminescence**

Chemiluminescence emission by  $\text{H}_2\text{O}_2$  was one of the difficulties found during standardization of this method. Initially, considerable chemiluminescence was noted immediately after the addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to luminol solution, even without tissue sample (data not shown). However, within 5 minutes following initiation of chemiluminescence reaction this emission by  $\text{H}_2\text{O}_2$  was extinct. Therefore, to remove  $\text{H}_2\text{O}_2$  interference, luminol and  $\text{H}_2\text{O}_2$  solutions were mixed and incubated under gentle agitation during approximately 5 minutes before use. With this procedure,  $\text{H}_2\text{O}_2$  emission was decreased to 7 RLU (Figure 1A) that was not significant in relation to the emission of tissue sample (Figure 1B).

Figure 2 presents standard  $\dot{\text{NO}}$  curves. Increasing of  $\dot{\text{NO}}$  concentration (20.80 to 355.55  $\mu\text{M}$ ) was correlated with linear increasing of emission, showing the high sensibility of this method. Height and area under chemiluminescence curves showed high correlation with standard  $\dot{\text{NO}}$  concentration (values of R were, respectively, 0.9090 and 0.9582). However, at concentrations higher than 355.55  $\mu\text{M}$ , were demonstrated quenching of the chemiluminescence emission (data not shown).

Concentration of tissue sample used for assay is an important factor that influences chemiluminescence emission. If an improper concentration is adopted, emission will not evidence the true status of tissue and can produce an effect known as quench that is characterized for partial or entire inhibition of chemiluminescence. To establish an appropriate concentration of tissue sample for chemiluminescence assay, different concentrations of tissue were evaluated. Figure 3 shows chemiluminescence emitted by

different concentrations of tissue sample. A concentration-dependent increase in chemiluminescence emission was observed in a range of 0.00125-0.005%. Unlike that, a concentration-dependent decrease was noted in a range of 0.01 e 0.05%, showing the quench effect on concentrations higher than 0.01%. Thus, 0.0025% concentration of tissue sample was adopted for all of chemiluminescence assays.

Figure 4 shows chemiluminescence under different conditions. Emission was decreased of  $480.47 \pm 49.10$  URL (Fig. 4A) to  $66.17 \pm 7.72$  RLU after saturation of a tissue sample with oxygen (Fig.4B). When a tissue sample was analyzed on triplicate, chemiluminescence was highly reproducible ( $456.70 \pm 33.90$  RLU) (Fig. 4C). Tissue sample emission was decreased significantly ( $p < 0.01$ ) to  $266.63 \pm 23.54$  RLU when evaluated 1 h after its homogenization (Fig. 4D). With the addition of  $\text{NO}$  excess to a tissue sample, chemiluminescence was almost extinct ( $6.50 \pm 0.25$  RLU) (Fig. 4E).

### **Implication of $\text{NO}$ on skeletal muscle IRI**

Figure 5 presents chemiluminescence curves of control and experimental groups. Chemiluminescence was not changed after 4 h ischemia. Neither 1 h reperfusion, nor 2 h alter photons emission when compared with control group. However, was evidenced a marked increasing of chemiluminescence after 4 h reperfusion ( $p < 0.001$ ).

Figure 6 shows the effect of NOS inhibitors and an iron-specific chelant on chemiluminescence emitted after 4 h reperfusion. Significant decrease of emission was observed in the group treated with AG ( $p < 0.001$ ). Previous rat treatment with LNAME or DFO prevented the increase of chemiluminescence after 4 h reperfusion.

$\text{NO}$  levels were calculated through the height and area under chemiluminescence curves and expressed as fmol per g of tissue. Using both parameters, chemiluminescence

revealed increased  $\cdot$ NO level after 4 h reperfusion (Height:  $18.25 \pm 2.04$ ; Area:  $16.36 \pm 2.60$ ) in relation to control group (Height:  $4.73 \pm 0.243$ ; Area:  $3.52 \pm 0.14$ ). Treatment with AG decreased significantly ( $p < 0.001$ )  $\cdot$ NO level after 4 h reperfusion (Height:  $8.08 \pm 0.69$ ; Area:  $7.76 \pm 0.05$ ). Increase observed after 4 h reperfusion was entire inhibited by the previous rat treatment with LNAME (Height:  $3.33 \pm 0.29$ ; Area:  $2.24 \pm 0.18$ ) and DFO (Height:  $2.83 \pm 0.30$ ; Area:  $2.12 \pm 0.27$ ). The parameters of the ischemia or the 2 h reperfusion did not changed  $\cdot$ NO levels in rat skeletal muscle (Table 1).

## DISCUSSION

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is reported to react with luminol to produce moderate photons emission [41, 47]. Mixture of luminol and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used for chemiluminescence assay only after 5 minutes. Within this time interval, chemiluminescence initiated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> became decreased and stabilized (Fig. 1A). With this procedure, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> interference was removed and all chemiluminescence observed was only a consequence of preexisting  $\bullet$ NO.

In physiological solutions,  $\bullet$ NO is easily oxidized to nitrite and its half-life is very short (<6 seconds) [48].

$\bullet$ NO instability under physiological tensions of oxygen and its high reactivity with biomolecules make its quantification a challenge [1]. To overcome this limitation, several strategies have been reported to extend  $\bullet$ NO half-life. Beckman *et al* [49] and Archer and Cowan [50], for example, have proposed that addition of the enzyme superoxide dismutase (SOD) would make  $\bullet$ NO relatively stable because inhibition of reaction with superoxide (O<sub>2</sub> $\bullet^-$ ). Malinsk and Taha [51] and Hallstrom *et al* [32] detected  $\bullet$ NO directly at the site of its production through microelectrodes implanted on arteries walls to avoid its oxidative degradation. Greenberg *et al* [52], Arroyo and Khono [53] and Lepore *et al* [54] used hemoglobin as an potent  $\bullet$ NO scavenger and detected stable products of nitrosylation through electronic paramagnetic resonance. In addition, Kikuchi *et al* [41], Kojima *et al* [2], Yao *et al* [55] and Tsukada *et al* [43] avoided exposure of  $\bullet$ NO to oxygen using organs perfusion and microdialysis methods and oxygen-free systems for analysis by chemiluminescence.

$\bullet$ NO has been reported to diffuse quickly of the site where was synthesized, reaching adjacent tissues to exert its effects. Moreover,  $\bullet$ NO produced by endothelium or which diffused into circulation permeates eritrocytes and react with oxy-hemoglobin to form met-

hemoglobin and nitrate [56]. To an evaluation more reliable of  $\bullet\text{NO}$  production by skeletal muscle, we opt for analysis of tissue homogenates, despite of this procedure increase  $\bullet\text{NO}$  susceptibility to oxidative degradation.

Archer *et al* [1] showed that injection of gaseous  $\bullet\text{NO}$  in aqueous solutions exposed to 20% oxygen atmosphere was followed by an exposure time-dependent oxidative degradation, reaching about 80%  $\bullet\text{NO}$  loss after 10 minutes.

We have also observed decrease of chemiluminescence when muscle homogenates are saturated with oxygen, probably because high levels of oxygen induce  $\bullet\text{NO}$  oxidative degradation (Fig. 4B).

Despite of analysis has been performed readily (5 minutes), this time of exposure to oxygen was enough to induce significant decrease of  $\bullet\text{NO}$ , what was evidenced by low reproducibility presented by this method initially (data not shown).

However, degasification with  $\text{N}_2$  of solutions used in reagent and tissue sample preparation prevented fast  $\bullet\text{NO}$  oxidative degradation through removal of oxygen in solutions. Method showed high reproducibility after the adoption of this procedure (Fig. 4C). Gaseous  $\text{N}_2$  apparently do not interfere in chemiluminescence reaction and can be a useful tool for analysis under experimental conditions in which exposure to oxygen can not be avoided.

Although the apparent stability supplied by degasification with  $\text{N}_2$ , we tried to perform chemiluminescence assay immediately after tissue homogenization, since was evidenced 50% decrease of photons emission when tissue sample was evaluated 1 h after its preparation (Fig. 4D).

According to the condition adopted for assay, chemiluminescence can be partly or entirely inhibited. In spite of the mechanism responsible for this phenomenon has not been elucidated yet, it is known it is associated with excess of reacting and interfering substances.

Reagents and sample concentration, temperature, and pH have been reported to influence photons emission [57, 58]. Thereby, establishment of analysis conditions is essential for validation of methods based on chemiluminescence reactions.

In this study, we choose the conditions of analysis described by Kikuchi *et al* [41] and reproduced by Tsukada *et al* [43] and Yavuz *et al* [42], due to the fact they were considered the most proper conditions to  $\bullet\text{NO}$  measurement by authors above mentioned. We used a standard  $\bullet\text{NO}$  solution to plot calibration curve. At concentrations higher than 355.55  $\mu\text{M}$ , chemiluminescence reaction was considerably inhibited (data not shown). However, in a concentration range of 20.80-355.55  $\mu\text{M}$  we observed a linear correlation between photons emission and standard  $\bullet\text{NO}$  concentration, supporting the high specificity and sensibility of this method as mentioned in others studies [41-43]. We also verified that height and area under chemiluminescence curves are proper parameters to detect  $\bullet\text{NO}$ , since they show high correlation with standard  $\bullet\text{NO}$  concentration (Fig. 2).

To establish an appropriate concentration of tissue sample, several concentrations were evaluated. Chemiluminescence emission was inhibited at 0.05% concentration. However, a concentration of tissue-dependent increase of chemiluminescence was observed in a concentration range of 0.00125-0.005% (Fig. 3). Thus, an intermediate and inhibition-free concentration of tissue sample (0.0025%) was adopted for chemiluminescence analysis.

To induce the effect of chemiluminescence inhibition as observed at concentrations higher than 355.55  $\mu\text{M}$ , 376  $\mu\text{M}$   $\bullet\text{NO}$  was added to a tissue sample. As expected, chemiluminescence emission was entirely inhibited following the addition of  $\bullet\text{NO}$  excess (Fig. 4E). This data support the importance of to establish both tissue sample and standard  $\bullet\text{NO}$  concentration for measurements by chemiluminescence.



This direct method to measure  $\cdot\text{NO}$  based on  $\text{H}_2\text{O}_2$ -luminol-induced chemiluminescence assay was used in this study to investigate the role of  $\cdot\text{NO}$  on rat skeletal muscle IRI.

Events including edema, no-reflux, free radicals production, lipid peroxidation, polymorphonuclear cells infiltration, cell dysfunction and death are evolved in skeletal muscle IRI [5-7, 36, 48, 59-62].

A model of tourniquet-induced ischemia (4 h) followed by 1-4 h reperfusion was adopted because the mentioned easy to perform it and effectiveness to produce peroxidative damage and histological abnormalities expected in this pathological condition [36, 61, 63].

A marked increase (approximately 4 times) of  $\cdot\text{NO}$  levels was evidenced on skeletal muscle after 4 h reperfusion, but not after ischemia. These results are in accordance with a study realized in our laboratory in which was demonstrated increased lipid peroxidation in *gastrocnemius* muscle only after reperfusion [36]. Moreover, our results explain the severity of tissue damage that follows the blood flow reestablishment as reported by others authors [7, 64]. Zimiani et al [36] also verified that lipid peroxidation on skeletal muscle was significantly decreased by AG or LNAME treatment, suggesting the involvement of  $\cdot\text{NO}$  in peroxidative damage.

Following the reperfusion of ischemic muscle, expression of the inducible isoform (iNOS) has been associated with a shorter survival of tissue [22, 29]. The expression of iNOS is induced by pro-inflammatory cytokines released during IRI. iNOS expression has been shown after long periods of reperfusion in different cell type as skeletal muscle fiber [22], mastocytes and neutrophils [28]. However,  $\cdot\text{NO}$  was not quantified directly in these studies.

We evidenced the increase of  $\cdot\text{NO}$  level on *gastrocnemius* muscle after 4 h reperfusion, which was significantly inhibited by AG, a selective iNOS inhibitor when administered ip at the dose of 50mg/kg [65]. In a previous study, we showed iNOS expression in *gastrocnemius* muscle only after 4 h reperfusion using the same skeletal muscle IRI model [36]. Therefore,

our data support the participation of  $\cdot\text{NO}$  production by iNOS at late stages of reperfusion, mediating peroxidative damage.

Endothelial (eNOS) and neuronal (nNOS) isoforms have been reported to be expressed constitutively in rodent skeletal muscle [66, 67]. Possibly, the constitutive isoforms (cNOS) also contribute for increasing  $\cdot\text{NO}$  levels after 4 h reperfusion, since it was prevented by treatment with LNAME, a selective cNOS inhibitor when administered ip at the dose of 20mg/kg [68, 69].

In addition, the initial activation of cNOS has been implicated on inducing of iNOS expression under others pathological conditions [70]. This regulatory role exerted by cNOS inducing the iNOS activation would explain the blockade of  $\cdot\text{NO}$  level increase after 4 h reperfusion by LNAME, but not by AG.

On the other hand, the treatment with DFO, an iron-specific chelant, also blocked  $\cdot\text{NO}$  level increase after 4 h reperfusion. There are reports regarding the cytoprotective effects of iron chelants through the inhibition of lipid peroxidative chain [49, 64, 71, 72]. A proposal for mechanism of this effect is the inhibition of hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ ) synthesis by Fenton-Haber-Weiss reaction in which ferrous ion ( $\text{Fe}^{2+}$ ) is required. However, Fenton-Haber-Weiss reaction can be limited *in vivo* because the low constant of ferric ion ( $\text{Fe}^{3+}$ ) reduction to  $\text{Fe}^{2+}$  and a pathway of  $\cdot\text{OH}$  synthesis based on peroxyntrous acid (HOONO) and ONOO $^-$  degradation has been proposed [49]. Moreover, others free radicals as toxic as  $\cdot\text{OH}$  can be produced through HOONO and ONOO $^-$  degradation ( $\cdot\text{NO}_2$ , for example). Based on that, the inhibition of lipid peroxidative damage by DFO has been attributed to capacity of this iron chelant to form complexes with ONOO $^-$  and HOONO [49, 71]. However, there is no report regarding the influence of DFO on  $\cdot\text{NO}$  levels.

Based on our results, we suggest the deleterious action of increased and NOS-dependent  $\cdot\text{NO}$  production on skeletal muscle IRI at later stages of reperfusion, highly

dependent on iNOS and cNOS, mediating tissue damage through lipid peroxidation and antioxidant consumption, probably by the consequent formation of ONOO<sup>-</sup>.

## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to the laboratory technicians Jesus Antonio Vargas and Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho for the grant technical support, and to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, and the Programa de Apoio a Núcleos de Excelência do Estado do Paraná – PRONEX-PR for providing the indispensable financial support.

## REFERENCES

- [1] S. L. Archer, P. J. Shultz, J. B. Warren, V. Hampl, E. G. Demaster, Preparation of standards and measurement of nitric oxide, nitroxyl and related oxidation products, *Methods* 7 (1995) 21-34.
- [2] H. Kojima, K. Kikuchi, M. Hirobe, T. Nagano, Real-time measurement of nitric oxide production in rat brain by the combination of luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> chemiluminescence and microdialysis, *Neurosci. Lett.* 233 (1997) 157-159.
- [3] W. K. Alderton, C. E. Cooper, R. G. Knowles, Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition, *Biochem. J.* 357 (2001) 593-615.
- [4] S. Nagase, K. Takemura, A. Ueda, A. Hirayama, K. Aoyagi, M. Kondoh, A. Koyama, A novel nonenzymatic pathway for generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233 (1997), 150-153.

- [5] D. A. Lepore, Nitric oxide synthase-independent generation of nitric oxide in rat skeletal muscle ischemia-reperfusion injury, *Nitric Oxide*. 4 (2000), 541-545.
- [6] R. Anaya- Prado, L. H. Toledo-Pereyra, A. B. Lentsch, P. A. Ward, Ischemia/reperfusion injury, *J. Surg. Res.* 105 (2002), 248-258.
- [7] A. Khanna, P. A. Cowled, R. A. Fitridge, Nitric oxide and skeletal muscle reperfusion injury: current controversies (Research Review), *J. Surg. Res.* 128 (2005), 98-107.
- [8] A. L. Moens, M. J. Claeys, J. P. Timmermans, C. J. Vrints, Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process, *Int. J. Cardiol.* 100 (2005), 179-90.
- [9] H. B. Bittner, C. Binner, P. Dahlberg, F. W. Mohr, Reducing ischemia-reperfusion injury in clinical lung transplantation, *Transplant.. Proc.* 39 (2007), 489-92.
- [10] J. M. Thurman, Triggers of inflammation after renal ischemia/reperfusion, *Clin. Immunol.* 123 (2007), 7-13.
- [11] K. Blomgren, C. Zhu, U. Hallin, H. Hagberg, Mitochondria and ischemic reperfusion damage in the adult and in the developing brain, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 304 (2003), 551-559.
- [12] H. A. Eum, Y. N. Cha, S. M. Lee, Necrosis and apoptosis: Sequence of liver damage following reperfusion after 60min ischemia in rats, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 358 (2007), 500-505.

- [13] T. Pottecher, P. Segura , A. Launoy, Le syndrome du compartiment abdominal, *Annales de Chirurgie* 126 (2001), 192-200.
- [14] H. Öhlin, N. Pavlidis, A-K. Öhlin, Effect of intravenous nitroglycerin on lipid peroxidation after thrombolytic therapy for acute myocardial infarction, *Am. J. Cardiol.* 82 (1998), 1463-1467.
- [15] E. S., Hirano, M., Mantovani, R. C., Morandin, J., Brito, L.Pavani, Total hepatic ischemia and reperfusion after state controlled hemorrhagic shock, with used of different solutions: effects of neutrophils sequestration in kidney of rats, *Acta Cir. Bras.* 21 (2006), 31-37.
- [16] D. P. Foley, R. S. Chari, Ischemia-reperfusion injury in transplantation: novel mechanisms and protective strategies, *Transplant. Rev.* 21 (2007), 43-53.
- [17] B. T. Baxter, C. Mahoney, P. J. Johnson, K. M. Selmer, I. I. Pipinos, J. Rose, J. R. Neff, Concomitant Arterial and Venous Reconstruction with Resection of Lower Extremity Sarcomas, *Ann. Vasc. Surg.* 21 (2007), 272-279.
- [18] F. E. Barton Junior, T. E. Spicer, H. S. Byrd, Head and neck reconstruction with the latissimus dorsi myocutaneous flap: anatomic observations and report of 60 cases, *Plast. Reconstr. Surg.* 71 (1983), 199-204.
- [19] J. Blebea, B. Bacik, G. Strothman, L. Myatt, Decreased nitric oxide production following extremity ischemia and reperfusion, *Am. J. Surg.* 172 (1996), 158-161.

- [20] K. R. Knight, B. Zhang, W. A. Morrison, A. G. Stewart, Ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle is reduced by N-omega-nitro-L-arginine methyl ester and dexamethasone, *Eur. J. Pharmacol.* 332 (1997), 273-278.
- [21] W. Z. Wang, G. Anderson, J. T. Fleming, F. W. Peter, R. J. Franken, R. D. Acland, J. Barker, Lack of nitric oxide contributes to vasospasm during ischemia/reperfusion injury, *Plast. Reconstr. Surg.* 99 (1997), 1099-1108.
- [22] B. Zhang, K. R. Knight, B. Dowsing, E. Guida, L. H. Phan, M. J. Hickey, W. A. Morrison, A. G. Stewart, Timing administration of dexamethasone or the nitric oxide synthase inhibitor, nitro-L-arginine methyl ester, is critical for effective treatment of ischaemia-reperfusion injury to rat skeletal muscle, *Clin. Sci.* 93 (1997), 167-174.
- [23] P. G. Cordeiro, E. Santamaria, Q. Y. Hu, Use of a nitric oxide precursor to protect pig myocutaneous flaps from ischemia-reperfusion injury, *Plast. Reconstr. Surg.* 102 (1998), 2040-2049.
- [24] I. Huk, J. Nanobashvili, W. Orljanski, L-arginine treatment in ischemia/reperfusion injury, *Cas. Lek. Cesk.* 137 (1998), 496-499.
- [25] K. Liu, L.-E. Chen, A. V. Seaber, J. R. Urbaniak, S-nitroso-N-acetylcysteine protects skeletal muscle against reperfusion injury, *Microsurgery* 18 (1998), 299-305.

- [26] E. S. Joneschild, L. E. Chen, A. V. Seaber, E. S. Frankel, J. R. Urbaniak, Effect of a NOS inhibitor, L\_NMMA, on the contractile function of reperfused skeletal muscle, *J. Reconstr. Microsur.* 15 (1999), 55-60.
- [27] D. J. Lefer, S. P. Jones, W. G. Girod, A. Baines, M. B. Grisham, A. S. Cockrell, P. L. Huang, R. Scalia, Leucocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice, *Am. J. Physiol.* 276 (1999), H1943-H1950.
- [28] A. Messina, K. R. Knight, B. J. Dowsing, B. Zhang, L. H. Phan, J. V. Hurley, W. A. Morrison, A. G. Stewart, Localization of inducible nitric oxide synthase to mast cells during ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle, *Lab. Invest.* 80 (2000), 423-431.
- [29] J. E. Barker, K. R. Knight, R. Romeo, J. V. Hurley, W. A. Morrison, A. G. Stewart, Targeted disruption of the nitric oxide synthase 2 gene protects against ischemic/reperfusion injury to skeletal muscle, *J. Pathol.* 194 (2001), 109-115.
- [30] K. Ikebe, T. Kato, M. Yamaga, J. Hirose, T. Tsuchida, K. Takagi, Increased ischemia-reperfusion blood flow impairs the skeletal muscle contractile function, *J. Surg. Res.* 99 (2001), 1-6.
- [31] K. Nakamura, K. Yokoyama, M. Itoman, Changes in nitric oxide, superoxide, and blood circulation in rabbit rectus femoris muscle, *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 35 (2001), 13-18.



- [32] S. Hallstrom, H. Gasser, C. Neumayer, A. Fugl, J. Nanobashvili, A. Jakubowski, I. Huk, G. Schlag, T. Malinski, S-nitroso human serum albumin treatment reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle via nitric oxide release, *Circulation* 105 (2002), 3032-3038.
- [33] K. Ikebe, T. Kato, M. Yamaga, T. Tsuchida, H. Irie, Y. Oniki, K. Takagi, Effect of nitric oxide on the contractile function of rat reperfused skeletal muscle, *J. Surg. Res.* 106 (2002), 82-85.
- [34] M. Ozaki, S. Kawashima, T. Hirase, T. Yamashita, M. Namiki, N. Inoue, K. Hirata Ki, M. Yokoyama, Overexpression of endothelial nitric oxide synthase in endothelial cells is protective against ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle, *Am. J. Pathol.* 160 (2002), 1335-1344.
- [35] J. Nanobashvili, C. Neumayer, A. Fuegl, A. Punz, R. Blumer, M. Mittlbock, M. Prager, P. Polterauer, L. W. Dobrucki, I. Huk, T. Malinski, Combined L-arginine and antioxidative vitamin treatment mollifies ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle, *J. Vasc. Surg.* 39 (2004), 868-877.
- [36] K. Zimiani, F. A. Guarnier, H. C. Miranda, M. A. Watanabe, R. Cecchini, Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence, *Nitric Oxide* 13 (2005), 196-203.

- [37] K. Nakamura, K. Yokoyama, M. Itoman, Changes in nitric oxide, superoxide, and blood circulation in rabbit rectus femoris muscle. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg. Hand Surg.* 35 (2001), 13-18.
- [38] A.V. Kozlov, B. Sobhian, G. Costantino, H. Nohl, H. Redl, S. Bahrami, Experimental evidence suggesting that nitric oxide diffuses from tissue into blood but not from blood into tissue, *Biochim. Biophys. Acta* 1536 (2001), 177-184.
- [39] S. S. Greenberg, J. Xie, J. J. Spitzer, J. F. Wang, J. Lancaster, M. B. Grisham, D. R. Powers, T. D. Giles, Nitro containing L-arginine analogs interfere with assays for nitrate and nitrite, *Life Sciences* 57 (1995), 1949-1961.
- [40] S.; Kanno, P. C.; Lee, Y.; Zhang, C.; Ho, B. P.; Griffith, L. L.; Shears 2nd, T. R. Billiar, Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase, *Circulation* 101 (2000), 2742-2748.
- [41] K. Kikuchi, T. Nagano, H. Hayakawa, Y. Hirata, M. Hirobe, Detection of nitric oxide production from a perfused organ by a luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system, *Anal. Chem.* 65 (1993), 1794-1799.
- [42] D. Yavuz, B. Küçükkaya, G. Haklar, Ö. Ersöz, E. Akoglu, S. Akalin, Effects of captopril and losartan on lipid peroxidation, protein oxidation and nitric oxide release in diabetic rat kidney, *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids.* 69 (2003), 223-227.

- [43] Y. Tsukada, M. Yasutake, D. Jia, Y. Kusama, H. Kishida, T. Takano, S. Tsukada, Real-time measurement of nitric oxide by luminol-hydrogen peroxide reaction in crystalloid perfused rat heart, *Life Sci.* 72 (2003), 989-1000.
- [44] A. A. Noronha-Dutra, M. M. Epperlein, N. Woolf, Reaction of nitric oxide with hydrogen peroxide to produce potentially cytotoxic singlet oxygen as a model for nitric oxide-mediated killing, *FEBS Lett.* 321 (1993), 59-62.
- [45] P. Di Mascio, E. J. H. Bechara, M. H. G. Medeiros, K. Briviba, H. Sies, Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxynitrite with hydrogen peroxide, *FEBS Lett.* 355 (1994), 287-289.
- [46] M. J. Concannon, C. G. Kester, C. F. Welsh, Patterns of free radical production after tourniquet ischemia: implications for the hand surgeon, *Plast. Reconstr. Surg.* 89 (1992), 846-852.
- [47] A. L. A. Ferreira, L. S. Matsubara, Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo, *Rev. Assoc. Med. Bras.* 43 (1997), 61-68.
- [48] M. Kelm, M. Feelisch, R. Spahr, H. M. Piper, E. Noack, J. Schrader, Quantitative and kinetic characterization of nitric oxide and EDRF released from culture endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 154 (1988), 236-244.

- [49] J. S. Beckman, T. W. Beckman, J. Chen, P. A. Marshall, B. A. Freeman, Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelium injury from nitric oxide and superoxide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87 (1990), 1620-1624.
- [50] S. L. Archer, N. J. Cowan, Measurement of endothelial cytosolic calcium concentration and nitric oxide production reveals discrete mechanisms of endothelium-dependent pulmonary vasodilatation, *Cir. Res.* 68 (1991), 1569-1581.
- [51] T. Malinski, Z. Taha, Nitric oxide released from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor, *Nature* 358 (1992), 676-678.
- [52] S. S. Greenberg, D. E. Wilcox, G. M. Rubanyi, Endothelium-derived relaxing factor released from canine femoral artery by acetylcholine cannot be identified as free nitric oxide by electron paramagnetic resonance spectroscopy, *Circ. Res.* 67 (1990), 1446-1452.
- [53] C. Arroyo, M. Kohno, Difficulties encountered in the detection of nitric oxide by spin trapping techniques: a cautionary note, *Free Radic. Res. Commun.* 14 (1991), 145-155.
- [54] D. A. Lepore, A. V. Kozlov, A. G. Stewart, J. V. Hurley, W. A. Morrison, A. Tomasi, Nitric oxide synthase-independent generation of nitric oxide in rat skeletal muscle ischemia-reperfusion injury, *Nitric Oxide* 3 (1999), 75-84.
- [55] D. Yao, A. G. Vlessidis, N. P. Evmiridis, A. Evangelou, S. Karkabounas, S. Tsampalas, Luminol chemiluminescence reaction: a new method for monitoring nitric oxide in vivo, *Anal. Chim. Acta.* 458 (2002), 281-289.

- [56] A. Dejam, C. J. Hunter, A. N. Schechter, M. T. Gladwin, Emerging role of nitrite in human biology, *Blood Cells Mol. Dis.* 32 (2004), 423-429.
- [57] E. C. Ferreira, A. V. Rossi, A quimiluminescência como ferramenta analítica: do mecanismo à aplicação da reação do luminol em métodos cinéticos de análise, *Quim. Nova* 25 (2002), 1003-1011.
- [58] K. Robards, P. J. Worsfold, Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence, *Anal. Chim. Acta.* 266 (1992), 147-173.
- [59] J. E. Jordan, Z. Q. Zhao, J. Vinten-Johansen, The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury, *Cardiovasc. Res.* 43 (1999), 860-878.
- [60] F. D. Moore, W. T. Caine, Emerging immunologic basis of reperfusion injury, *Transplant. Rev.* 14 (2000), 158-167.
- [61] E. M. C. Araújo, (2002) Oxidative stress induced by ischemia/reperfusion in rat muscle soleus. Biochemistry and histologic studies. Doctoral thesis. Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brasil.
- [62] F. W. Blaisdell, The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and reperfusion syndrome: a review, *Cardiovasc. Surg.* 10 (2002), 620-630.

- [63] W. E. Sardinha, (1994) Ischemia and reperfusion of skeletal muscle in rats. Inhibition of free radicals-mediated lipid peroxidative lesions by desferrioxamine. Doctoral thesis. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, Brasil.
- [64] J. D. Gower, G. Healing, B. J. Fuller, S. Simpkin, C. J. Green, Protection against oxidative damage in cold-stored rabbit kidneys by desferrioxamine and indomethacin, *Cryobiology*. 6 (1989), 309-317.
- [65] K. Metcalf, L. Jungersten, B. Lisander, Effective inhibition of nitric oxide production by aminoguanidine does not reverse hypotension in endotoxaemic rats, *Acta Anaesthesiol. Scand.* 46 (2002), 17-23.
- [66] J. S. Stamler, G. Meissner, Physiology of nitric oxide in skeletal muscle, *Physiol. Rev.* 81 (2001), 209-237.
- [67] H. Gunji, E. Kurisaki, M. Suto, S. Abe, K. Hiraiwa, Nitric oxide synthase expressions in mice skeletal muscle subjected to ischemia-reperfusion injury, *Leg. Med.* 5 (2003), S217-S220.
- [68] S. M. Gardiner, A. M. Compton, P. A. Kemp, T. Bennett, Regional and cardiac haemodynamic responses to glyceryl trinitrate, acetylcholine, bradykinin and endothelin-1 in conscious rats: effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester, *Br. J. Pharmacol.* 101 (1990), 632-639.

[69] P. J. Mueller, C. M. Foley, E. M. Hassler, Hindlimb unloading alters nitric oxide and autonomic control of resting arterial pressure in conscious rats, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289 (2005), R1 40-47.

[70] L. Connelly, M. Madhani, A. Hobbs, Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) knock-out mice: A pro-inflammatory role for eNOS-derived NO in vivo, *J. Biol. Chem.* 280 (2005), 10040-10046.

[71] R. Radi, J. S. Beckman, K. M. Bush, B. A. Freeman, Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *Arch. Biochem. Biophys.* 288 (1991), 481-487.

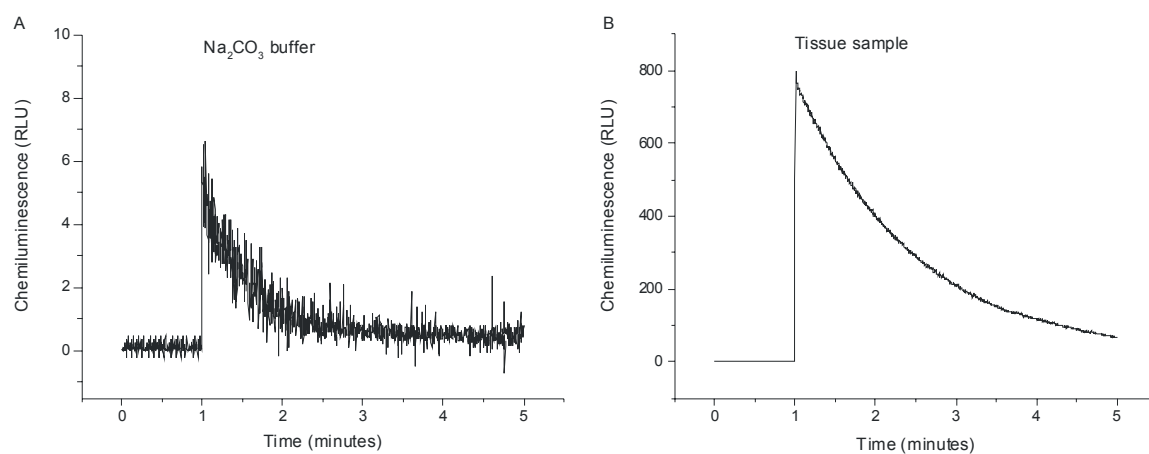
[72] C. T. Le, L. Hollaar, E. J. M. Van der Valk, A. Van der Laarse, Desferrioxamine protects myocytes against peroxide-induced myocyte damage without affecting glutathione redox cycle turnover, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 26 (1994), 877-887.

**Table 1:**  $\dot{\text{N}}\text{O}$  levels on skeletal muscle of rats subjected to experimental ischemia-reperfusion injury.

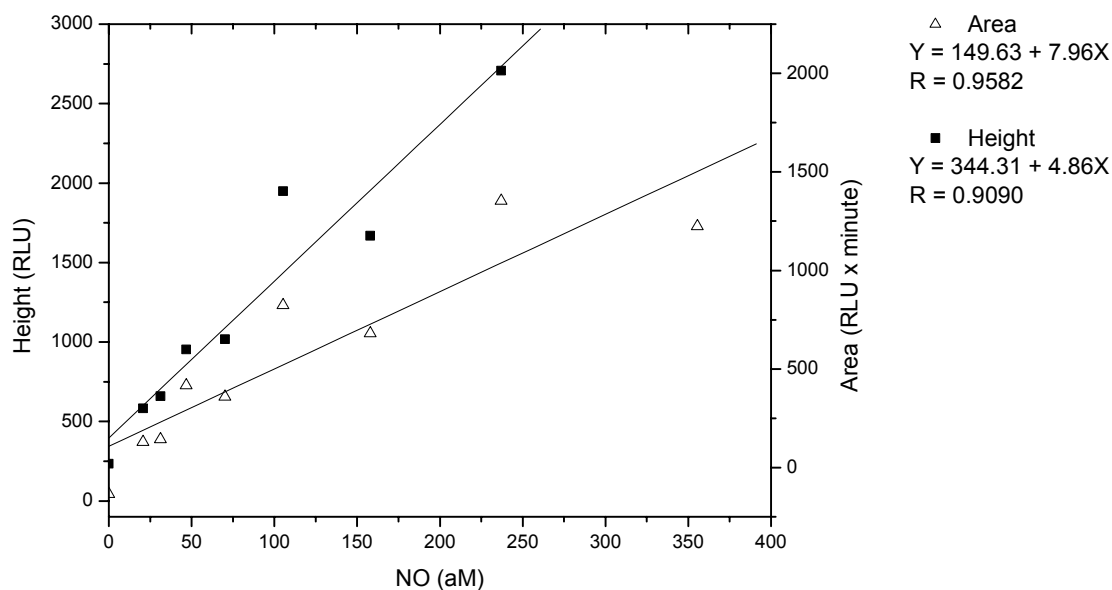
| <i>Groups</i>   | $\dot{\text{N}}\text{O}$ (fmol / g of tissue) |                           |
|-----------------|---|---------------------------|
|                 | <i>Height</i>                                 | <i>Area</i>               |
| <b>Control</b>  | 4.73 ± 0.24 <sup>a*</sup>                     | 3.52 ± 0.14 <sup>a*</sup> |
| <b>I4</b>       | 4.16 ± 0.99 <sup>a*</sup>                     | 1.91 ± 0.31 <sup>a*</sup> |
| <b>IR1</b>      | 4.26 ± 0.32 <sup>a*</sup>                     | 3.57 ± 0.23 <sup>a*</sup> |
| <b>IR2</b>      | 5.84 ± 1.27 <sup>a*</sup>                     | 4.92 ± 1.36 <sup>a*</sup> |
| <b>IR4</b>      | 18.25 ± 2.04 <sup>b</sup>                     | 16.36 ± 2.60 <sup>b</sup> |
| <b>IR4AG</b>    | 8.08 ± 0.69 <sup>c*</sup>                     | 7.76 ± 0.05 <sup>c*</sup> |
| <b>IR4LNAME</b> | 3.33 ± 0.29 <sup>a*</sup>                     | 2.24 ± 0.18 <sup>a*</sup> |
| <b>IR4DFO</b>   | 2.83 ± 0.30 <sup>a*</sup>                     | 2.12 ± 0.27 <sup>a*</sup> |

$\dot{\text{N}}\text{O}$  levels were calculated using the height and the area under chemiluminescence curves obtained from analysis of muscle homogenates. Different letters correspond to values significantly different. \*  $p < 0.001$  in relation to IR4. Control (n = 9), I4 (n = 9), IR1 (n = 12), IR2 (n = 9), IR4 (n = 15), IR4AG (n = 15), IR4LNAME (n = 15), IR4DFO (n = 15).

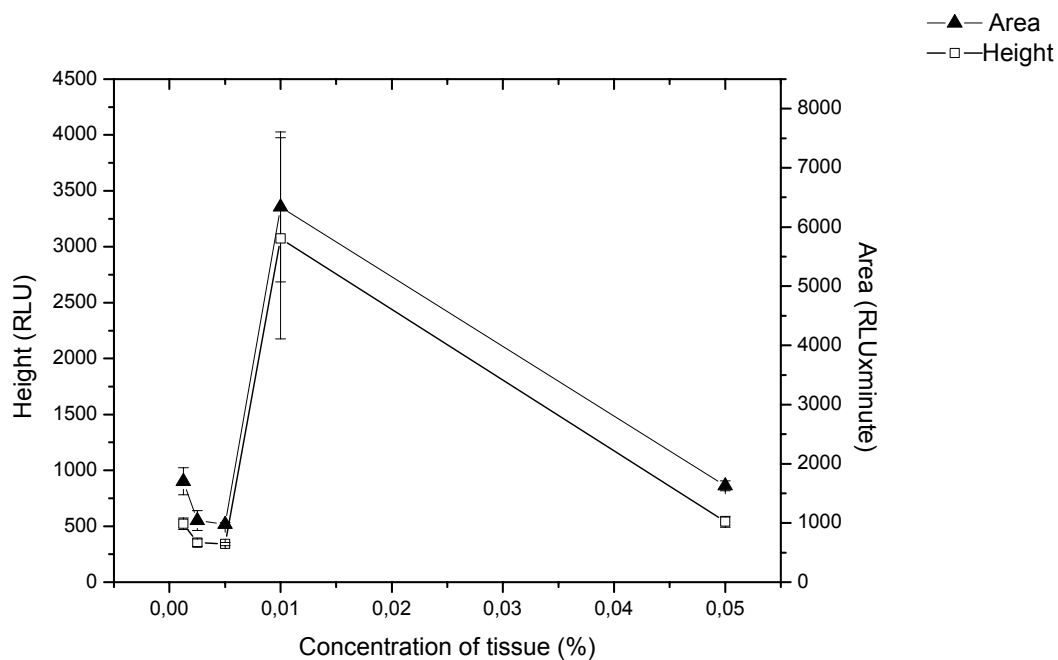




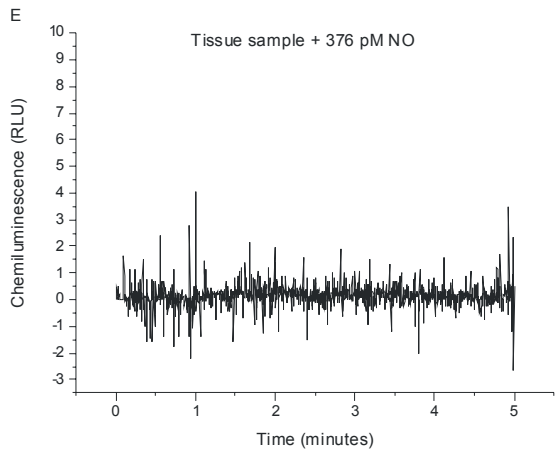
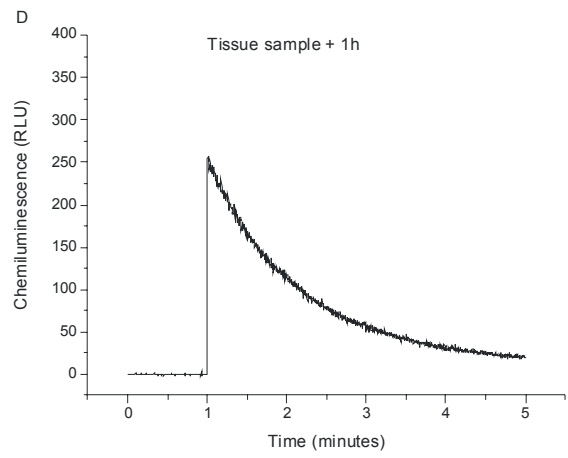
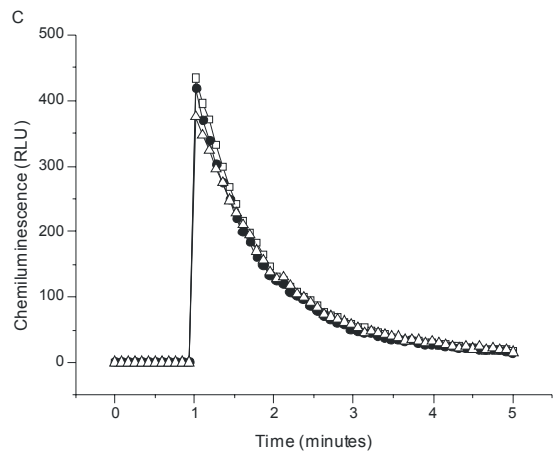
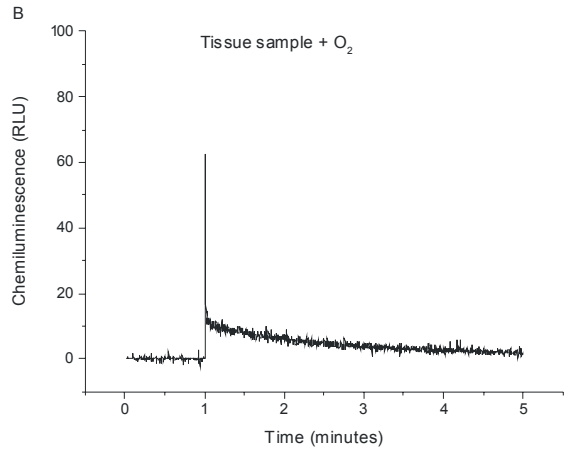
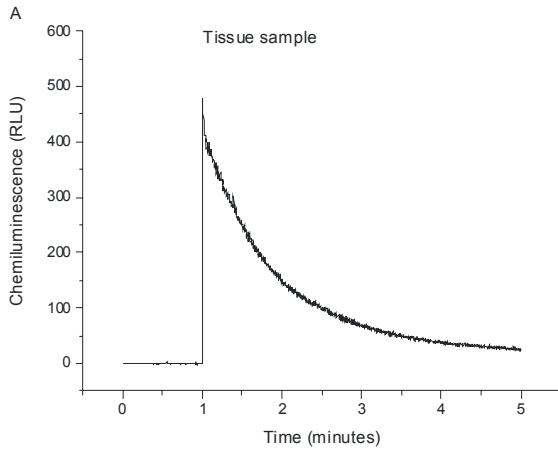
**Figure 1:** Representative graphs showing chemiluminescence emitted by Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer (A) and by a tissue sample (B). When 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> / 180 μM luminol / 1.5 mM desferrioxamine solution was incubated during 5 minutes before to be used for chemiluminescence reaction, emission without tissue sample (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer) was minimized. RLU: Relative light unit.



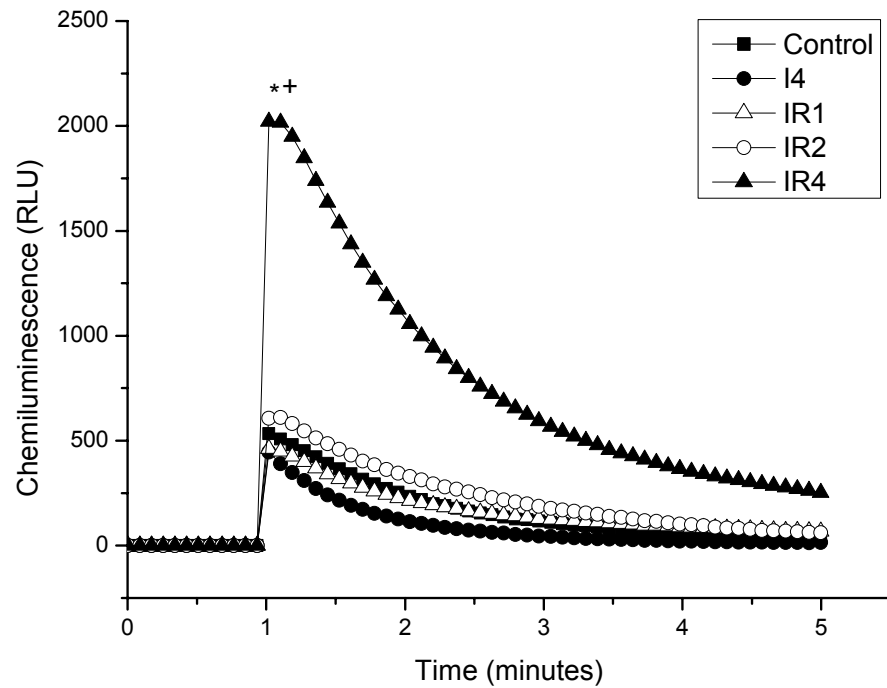
**Figure 2:**  $\dot{\text{NO}}$  standard curves obtained from the height and the area under chemiluminescence curves. 400 pM  $\dot{\text{NO}}$  was synthesized by nitrite reduction at acid pH and diluted to a concentration range of 20.80-355.55 aM with 2mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , at pH 8.5, previously degassed by  $\text{N}_2$ , and analyzed by chemiluminescence assay. Chemiluminescence curves obtained from different concentrations of standard  $\dot{\text{NO}}$  were evaluated using the height and the area under the curves. Straight equations were determined by linear regression. Angular coefficients were used to calculate  $\dot{\text{NO}}$  levels on muscle samples. R is the correlation coefficient. RLU: Relative light unit. Values correspond to the mean of analysis on triplicate.



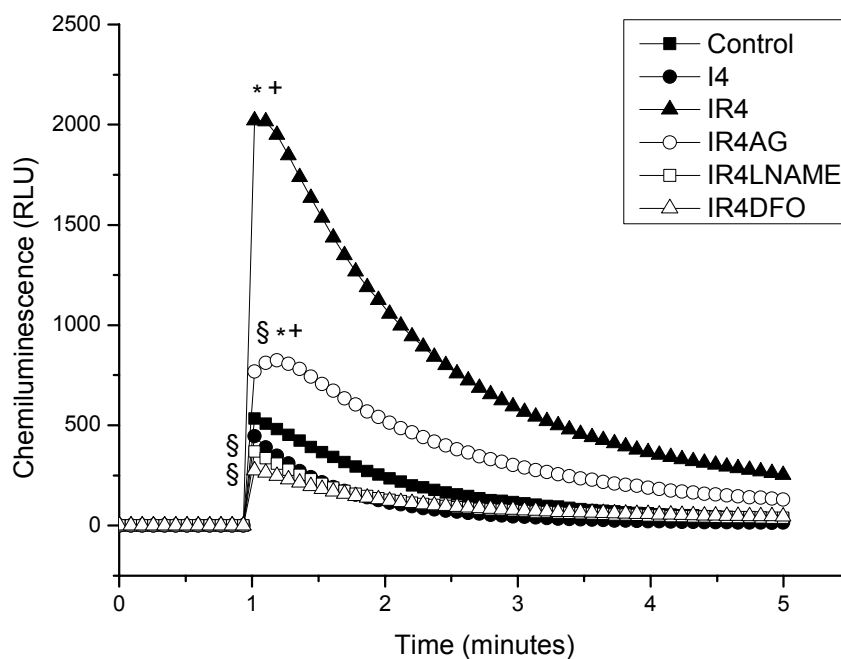
**Figure 3:** Chemiluminescence emitted by different concentrations of tissue sample. *Gastrocnemius* muscle was homogenized in 2mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , at pH 8.5, previously degassed by  $\text{N}_2$ . A concentration range of 0.00125-0.05% (w/v) was evaluated to determine the more proper concentration of tissue (quench free) for chemiluminescence assay. Values shown correspond to the means  $\pm$  SEM of analysis on triplicate. RLU: Relative light unit.



**Figure 4:** Luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced chemiluminescence. A. Tissue sample. B. Tissue sample saturated with oxygen. C. Analysis on triplicate of a tissue sample. D. Analysis of a tissue sample 1 h after its homogenization. E. Addition of <sup>•</sup>NO excess to a tissue sample. *Gastrocnemius* muscles was homogenized at 0.05% (w/v) in 2mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer, at pH 8.5, and diluted to 0.0025% for chemiluminescence assay. This muscle homogenate was evaluated immediately and 1 h after its preparation. To evaluate the effect of oxygen on chemiluminescence, tissue sample was saturated with 95% oxygen during 30 minutes before chemiluminescence analysis. Inhibition of chemiluminescence was induced by the addition of <sup>•</sup>NO excess (376 pM <sup>•</sup>NO) to a tissue sample. Chemiluminescence curves shown correspond to the means of analysis on triplicate.



**Figure 5:** Comparison of chemiluminescence curves obtained from muscle homogenates of control and experimental rats. Rats had its left hindlimb subjected to 4h ischemia (I4) and 1 (IR1), 2 (IR2), or 4h reperfusion (IR4). A sham group (Control) was also performed. *Gastrocnemius* muscles were excised, homogenized at 0.05% (w/v) in 2mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer, pH 8.5, and diluted to 0.0025% for luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced chemiluminescence assay. \*p<0.001 in relation to Control group. <sup>+</sup>p<0.001 in relation to I4 group. Control (n = 9), I4 (n = 9), IR1 (n = 12), IR2 (n = 9), IR4 (n = 15). RLU: Relative light unit.



**Figure 6:** Effect of NOS inhibitors and an iron-specific chelant on chemiluminescence emitted by homogenates of rat skeletal muscle subjected to 4h reperfusion. AG (50mg/kg), LNAME (20mg/kg), or DFO (60mg/kg) was administered ip 1 h prior to begin 4 h reperfusion. *Gastrocnemius* muscles were excised, homogenized at 0.05% (w/v) in 2mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> buffer, at pH 8.5, and diluted to 0.0025% for luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced chemiluminescence assay. \*p<0.001 in relation to Control. <sup>+</sup>p< 0.001 in relation to I4. <sup>§</sup>p<0.001 in relation to IR4. Control (n = 9), I4 (n = 9), IR4 (n = 15), IR4AG (n = 15), IR4LNAME (n = 15), IR4DFO (n = 15). RLU: Relative light unit.

**NITRIC OXIDE MEDIATED LIPID PEROXIDATION IN SKELETAL MUSCLE OF  
CACHETIC WALKER-256 TUMOR -BEARING RATS**

Cristiane Akemi Iamamoto, Alexandre Yukio Saito, Alessandra Lourenço Cecchini, Rubens Cecchini

From the Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina,  
Parana, Brazil

To whom correspondence should be addressed: Rubens Cecchini, Laboratório de Fisiopatologia dos Radicais Livres, Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Rodovia Celso Garcia Cid 445, km 380, Londrina, Paraná, Brasil, CEP 86051990. Tel/Fax: (43) 3371-4267. E-mail: cecchini@uel.br

Abbreviations: Aminoguanidine – AG; Chemiluminescence – CL; Interleukine 1 – IL-1; Interleukine 6 – IL-6; Lipid hydroperoxide – LOOH; NG-nitro-L-arginine methyl ester – LNAME; Malondialdehyde – MDA; Nitric oxide –  $\cdot\text{NO}$ ; Constitutive nitric oxide synthase – cNOS; Inducible nitric oxide synthase – iNOS; Nuclear factor  $\kappa\text{B}$  – NF- $\kappa\text{B}$ ; Nuclear factor activator protein 1 – AP1; Peroxynitrite – ONOO $\cdot$ ; Phosphate buffer saline – PBS; Reactive nitrogen species – RNS; Reactive oxygen species – ROS; Relative light unit – RLU; Standard error mean – SEM; T-butyl hydroperoxide – tBOOH; Tumor Necrosis Factor – TNF- $\alpha$ .



**ABSTRACT**

Reactive oxygen and nitrogen species have been suggested as mediators of muscle wasting in cachexia. Using a model of Walker-256-tumor-induced cachexia and high sensitive and specific chemiluminescence methods for detection of  $\cdot\text{NO}$  and lipid hydroperoxides, we investigated the role of  $\cdot\text{NO}$  and lipid peroxidation in this process.  $\cdot\text{NO}$  and lipid hydroperoxides levels increased significantly on the 5<sup>th</sup> day after tumor implantation. Both increases were suppressed by L-NAME or aminoguanidine treatment. These alterations were followed by progressive wasting of body and muscle mass. Our data suggest the implication of  $\cdot\text{NO}$  on cachexia, possibly inducing peroxidative damage on skeletal muscle.

Keywords: nitric oxide, lipid peroxidation, cachexia, Walker-256 tumor, skeletal muscle, chemiluminescence.

## 1. INTRODUCTION

Cachexia syndrome is a common complication of a numerous chronic diseases [1, 2, 3] as cancer [4], which has been associated with worsen quality and life abbreviation of ill patients [5]. This syndrome has been suggested to be implicated in approximately one-third of cancer patients death [6, 7].

Cachexia is the result of a complex tumor-host interaction, which is marked by several metabolic [5] and neuroendocrine [8] alterations, pro-inflammatory cytokines release and cachetic factors production by tumor [9]. It causes a severe weight loss, which occurs mainly on skeletal muscle [4, 5]. Skeletal muscle wasting impaired both contractile and muscle functional reserve and is responsible for asthenia or lack of muscular strength [10, 11]. When loss of tissue reaches the myocardial and respiratory muscles, there is increased risk of cardiac failure and pulmonary complications [10, 12].

Different proteolytic pathways have been implicated in skeletal muscle homeostasis. Through a coordinate operation, calcium-dependent proteolytic system (calpains) acts on sarcomeres and destabilizes N-terminal groups of some proteins amino acids [13] and triggers the sequential proteolysis by lysosomal (cathepsins) and ubiquitin-proteasome-dependent proteolytical systems [10, 11]. Since the proteolysis is partial, protein degradation is completed by the action of peptidases as tripeptidyl peptidase [14]. Although proteolytic systems are held responsible for physiological events in muscle, they have been suggested to have a crucial participation in skeletal muscle wasting in cachexia. Many studies have shown that expression and/or activity of the ubiquitin-proteasome-dependent proteolytic system components, [15-18] calpains [19, 20] and cathepsins [21] enzymes are increased in muscles of cachetic animals.

Several mediators have been proposed to regulate the proteolysis in cachexia, such as cytokines (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) [9, 10, 20, 22], hormones (glucocorticoids) [23], and transcription factors (NF- $\kappa$ B, AP1) [24, 25]. More recently, reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) have been implicated in the cachexia skeletal muscle wasting, through regulation of

calcium-dependent and ubiquitin-proteasome-dependent proteolytic systems, in part by activation of NF- $\kappa$ B [20, 22, 26].

ROS are continuously generated by cells, mainly in respiratory chain. Under physiological conditions, these substances are kept on non toxic levels by antioxidant defense. However, alterations caused by pathological conditions can disrupt this balance inducing a variety of deleterious effects, which have been denominated oxidative stress [27]. Nitrosative stress designation can be also used when these deleterious effects are caused by excessive production of nitric oxide ( $\cdot$ NO) and RNS [12, 28, 29]. In mammals,  $\cdot$ NO is synthesized through conversion of L-arginine to L-citrulline by nitric oxide synthase (NOS) [30], in spite of  $\cdot$ NO can be generated by NOS-independent pathways at particular conditions [31, 32]. Besides the  $\cdot$ NO, RNS comprise several  $\cdot$ NO oxidation states, such as nitroxyl anion ( $\text{NO}^-$ ) and nitroxyl cation ( $\text{NO}^+$ ), and its adducts as nitrogen dioxide ( $\text{NO}_2$ ), nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), dinitrogen trioxide ( $\text{N}_2\text{O}_3$ ), dinitrogen tetroxide ( $\text{N}_2\text{O}_4$ ), S-nitrosothiols, peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ) and nitrosyl-metals complexes [33, 34].

Since oxidative and nitrosative stress can operate damage to different biomolecules, including proteins and lipids [35], they have gained great attention for their possible involvement on muscle damage in cancer cachexia. Buck and Chojkier [28] showed that treatments with the  $\cdot$ NO synthase (NOS) inhibitor LNAME or the antioxidants  $\alpha$ -tocopherol and BW755c can decrease the skeletal muscle wasting and the dedifferentiation in a model of cachexia induced by TNF- $\alpha$ . Matthews and Neale [36] and Hennes, Richter and Peterhans [37] proposed that increase of ROS production in mitochondria would be a mechanism involved in TNF- $\alpha$ -induced cytotoxicity, supporting the deleterious role of oxidative stress in cachexia induced by TNF- $\alpha$ . Similar findings have also been shown in tumor-induced cachexia models. Gomes-Marcondes and Tisdale [16] demonstrated that malondialdehyde (MDA) levels are increased in skeletal muscle of cachectic rats, and that a mild input in ROS production induces the increase of ubiquitin-dependent proteolytical system components expression and protein degradation in the same tissue. Barreiro et al [12] verified increase of 3-nitrotyrosine levels in skeletal muscle of rats with cachexia induced by Yoshida AH -130 hepatoma, showing the participation of nitrosative stress in tissue damage. We have also found evidences of

oxidative stress in skeletal muscle and others tissues of rats with cachexia induced by Walker-256 tumor [data not published]. Freitas et al [38] demonstrated increased levels of MDA in different brain regions using the same cachexia model.

Because direct measurement of ROS is complicated by extremely low levels ( $\sim 10^{-11}$ M) of these substances and their high instability in biological samples [39], cellular damage caused by them are usually used as markers of their production. Methods for detection of products generated in lipid peroxidative chain, such as MDA [16], 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) [12], and lipid hydroperoxides (LOOH) [40, 41], are the most common compounds measured to evaluate oxidative and/or nitrosative stress. Similarly, direct measurement of  $\cdot$ NO is difficult by the same reasons before presented. Thus, indirect methods for its evaluation are extensively used [42]. Despite of that, a high sensitive and specific chemiluminescence (CL) method for  $\cdot$ NO measurement has been also proposed [43- 45].

Since there is no direct evidence of  $\cdot$ NO implication in cancer cachexia and oxidative stress, we employed the method firstly described by Kikuchi et al [43] with several modifications, for  $\cdot$ NO detection in muscle homogenates obtained from cachetic Walker-256 tumor-bearing rats, and its possible involvement on skeletal muscle lipid peroxidative injury was investigated using a highly sensitive method based on t-butyl-hydroperoxide (t-BOOH) initiated CL. We also used LNAME, a selective inhibitor of cNOS [46, 47], and aminoguanidine, a selective inhibitor of iNOS [48], in order to establish a possibly correlation between both events namely  $\cdot$ NO production and muscle lipid peroxide formation.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Walker-256 tumor maintenance

Every week,  $2 \times 10^6$  viable cells of Walker-256 tumor in ascitic form were transferred to peritoneal cavity of another adult male Wistar rat for tumor maintenance. Cellular viability was evaluated by Trypan blue exclusion method.

### 2.2. Protocol of Walker-256 tumor-induced cachexia

Adult male Wistar rats were inoculated subcutaneously on the right flank with  $8 \times 10^7$  viable tumor cells suspended in 0.5 mL of PBS, and were divided into 2 groups, in accordance with passed time after tumor implantation: 5 (T5) and 10 (T10) days. Food intake of these animals was monitored daily. Animals fed *ad libitum* had their daily food intake monitored for comparison with the experimental group. T5 groups daily treated with AG (50 mg/kg) or LNAME (20 mg/kg), which were administered intraperitoneally, were also carried out.

To verify the effect of PBS inoculation and decrease of experimental groups food intake on loss of body and muscle mass, control groups of animals inoculated with 0.5 mL of PBS and fed in a similar manner of experimental ones (PBS/ Pair Fed 5 and PBS/ Pair Fed 10) were performed. Control groups of animals inoculated with PBS and treated with AG or LNAME in a similar manner and for the same time of experimental ones (PBS/ AG and PBS/ LNAME) were also carried out.

On the 5<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup> day after subcutaneous tumor cells inoculation or PBS injection, animals were weighed and anesthetized with sodium pentobarbitone (50mg/kg) injection intraperitoneal. The left *gastrocnemius* muscles were excised, weighed and kept frozen in liquid nitrogen until analysis. After that, animals were sacrificed by cervical trauma and had their solid tumors excised and weighed. The number of animals used for experiments was: PBS/ *ad libitum* (n=3), PBS/ Pair Fed 5 (n=3), PBS/ Pair Fed 10 (n=3), PBS/ AG (n=3), PBS/ LNAME (n=3), T5 (n=3), and T10 (n=3). All experiments were conducted on triplicate.

### 2.3. Cachexia markers

Loss of body mass was used to characterize cachexia when the percentage of loss was above 10 and calculated using the following equation:

$$\text{Loss of body mass (\%)} = 100 \times [\text{ibm} - \text{fbm} + (\text{tm}) + (\text{dgbm} \times \text{n})] / [\text{ibm} + (\text{dgbm} \times \text{n})],$$

where ibm = initial body mass, fbm = final body mass, tm = tumor mass, dgbm = mean of PBS/ *ad libitum* animals daily gain of body mass, and n = number of days after tumor cells or PBS inoculation.

Loss of muscle mass in percentage was also evaluated using the values of left *gastrocnemius* muscles mass, and was calculated in relation to mean *gastrocnemius* muscle mass of PBS/ *ad libitum* animals.

### 2.4. Standard $\cdot\text{NO}$ solution

400 pM  $\cdot\text{NO}$  was synthesized by reaction of nitrite reduction at acidic pH [44]. In this reaction, it was used 1.8mL of 0.1M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  / 0.1M KI and 7.2mL of 0.1mM  $\text{NaNO}_2$ . The solution of 400 pM  $\cdot\text{NO}$  was diluted (20.80-355,55 aM) using 2 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  buffer, at pH 8.5, previously degassed by  $\text{N}_2$ .

### 2.5. Muscle homogenates

For  $\cdot\text{NO}$  quantification, *gastrocnemius* muscles were homogenized at 0.05% (w/v) in 2 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  buffer, at pH 8.5, previously degassed by  $\text{N}_2$ , through 45s period of homogenization using an Ultraturrax homogenizer (Marconi, Brazil) followed by muscle homogenates 20 times dilution with the same buffer. For lipid peroxidative damage evaluation, *gastrocnemius* muscles were homogenized at 1% (w/v) in 30 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 120 mM KCl, at pH 7,4 in the same manner as mentioned before, at 0°C. Homogenates were centrifugated at 600xg, for 15 minutes, at 4°C, and the supernatants were used for analysis.

## 2.6. Luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced CL assay

$\dot{\text{N}}\text{O}$  was quantified in skeletal muscle of rats through a method based on CL initiated by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and luminol, which can be detected at 302 nm [43, 44]. Equal volumes of 360  $\mu\text{M}$  luminol / 3 mM DFO and 200 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were mixed and incubated at room temperature, under moderate agitation for 5 minutes. To initiate the CL reaction, 20  $\mu\text{L}$  of this mixture were added to 800  $\mu\text{L}$  of standard  $\dot{\text{N}}\text{O}$  solutions or muscle homogenates through an accurate syringe (Hamilton, USA). CL spectrum was recorded for 5 minutes using a TD 20/20 luminometer (Turner Designs, USA) with detection capacity of a wavelength range of 300-650 nm and 68.5% of sensibility. The luminometer was connected to a microcomputer through Spreadsheet Interface v. 1.0 program to record CL emission. Origin v. 7.5 program was used to plot CL curves that were analyzed using the height and area under the curves. Angular coefficients of the straight lines obtained from standard calibration curves were used to calculate  $\dot{\text{N}}\text{O}$  levels on tissue. Each sample was analyzed on triplicate. Levels of  $\dot{\text{N}}\text{O}$  were expressed as fmol per g of tissue.

## 2.7. t-BOOH-induced CL assay

Lipid peroxidation was evaluated in skeletal muscle of rats using a method for LOOH detection based on t-BOOH-induced CL [40]. 20  $\mu\text{L}$  of t-BOOH 146, 56 mM were added to 980  $\mu\text{L}$  of tissue sample, previously incubated at 37°C, for 5 minutes. CL spectrum was recorded for 80 minutes using a TD 20/20 luminometer with detection capacity of a wavelength range of 300-650 nm and 68.5% of sensibility. The luminometer was connected to a microcomputer through Spreadsheet Interface v. 1.0 program to record CL emission. Origin v. 7.5 program was used to plot CL curves that were analyzed using the height and the area under the curves. Each sample was analyzed on triplicate. Results were expressed as Relative Light Unit per mg of protein (RLU/ mg of protein).

## **2.8. Protein quantification**

Protein was determined using the method described by Lowry et al [49] and modified by Miller [50]. Tissue samples were analyzed on duplicate. 116 µg/mL bovine serum albumin was used as standard solution.

## **2.9. Statistical analysis**

Results are shown as means  $\pm$  SEM. Data were evaluated by GraphPad InStat v. 3.05 program, using one-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures with the Tukey-Kramer multiple comparison procedure. A difference of  $p < 0.05$  was considered significant.



### 3. RESULTS

Tumor growth was very fast, weighing until  $19.16 \pm 0.56$  g on the 10<sup>th</sup> day (T10). Treatment with NOS inhibitors increased significantly ( $p < 0.001$ ) the tumor mass to  $7.44 \pm 0.66$  g (T5AG) and to  $10.34 \pm 0.42$  g (T5LNAME) when compared with untreated T5 group ( $4.32 \pm 0.59$  g) (table 1).

Walker-256 tumor induced in its hosts a progressive decrease in food intake (g/ day) and loss of both body and muscle mass. Until the 4<sup>th</sup> day after tumor implantation, there was no difference in intake ( $20.77 \pm 0.40$  g) in relation to the animals fed *ad libitum* ( $21.98 \pm 0.29$  g). However, the experimental animals had a reduction of food intake to 70% ( $15.90 \pm 0.52$  g) at the 5<sup>th</sup> day until the 8<sup>th</sup>, decreasing to 42% ( $9.08 \pm 0.56$  g) on the 9<sup>th</sup> and 10<sup>th</sup>.

Loss of body mass (%) was  $10.66 \pm 1.24$  in T5 group, increasing to  $20.15 \pm 0.25$  in T10. Body mass wasting was followed by a considerable loss of muscle mass (%) in T5 ( $11.63 \pm 2.21$ ), becoming more severe in T10 ( $35.38 \pm 1.60$ ). Restriction of food intake to sham the decrease of ingesta (or anorexia) in experimental animals caused a significant body and muscle mass wasting only in PBS/ Pair Fed 10 group ( $11.35 \pm 1.08$  and  $5.26 \pm 0.38$ , respectively). On the other hand, both body and muscle mass wasting found in experimental groups (T5 e T10) were significantly ( $p < 0.001$ ) higher than the respective PBS/ Pair Fed groups (PBS/ Pair Fed 5 and PBS/ Pair Fed 10) ones (table 1).

A significant increase of skeletal muscle lipid peroxidation was showed in experimental groups, as evaluated by t-BOOH-induced CL assay. Each experimental group was compared with the respective PBS/ Pair Fed control group. LOOH levels increased approximately 7 times in T5 (figure 1A), and kept on elevated (about 2 times) in T10 (figure 1B).

Figure 2 shows the effect of NOS inhibitors treatment on LOOH levels. Both AG and LNAME suppressed the increase of LOOH levels verified in T5 ( $p < 0.001$ ).

Luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced CL establishes a direct relation with  $\dot{NO}$  levels. CL emission was significantly increased (about 2 times) on skeletal muscle of T5 animals (figure 3A), returning to the baseline levels in T10 (figure 3B). The increase of CL emission verified in T5 was prevented by AG and LNAME use (figure 4).

Table 1 shows  $\dot{\text{NO}}$  levels (fmol/ g of tissue) during cachexia development.  $\dot{\text{NO}}$  levels were increased to  $5.20 \pm 0.48$  in T5 group when compared with PBS/ Pair Fed 5 ( $2.52 \pm 0.25$ ). T5  $\dot{\text{NO}}$  levels were reduced to  $2.41 \pm 0.20$  by AG, and to  $2.06 \pm 0.18$  by LNAME. On the other hand,  $\dot{\text{NO}}$  levels were not modified in T10 ( $1.92 \pm 0.08$ ) in relation to PBS/ Pair Fed 10 ( $1.96 \pm 0.14$ ).

The animals inoculated with PBS and treated with LNAME showed body ( $4,73 \pm 1,15$  %) and muscle mass wasting ( $17,83 \pm 4,79$  %) higher than Pair Fed 5 ones ( $-7,56 \pm 1,03$  % and  $2,53 \pm 1,46$  %, respectively). On the other hand, non significant body and muscle mass wasting was showed with AG treatment (figure 5).

#### 4. DISCUSSION

Cellular damage initiated by ROS and RNS has been shown in aging process [51], as well as in pathological conditions including cardiovascular diseases [52-54], neurodegenerative diseases [55], and cancer [12, 38].

Previous studies have reported the oxidative and nitrosative stress implication in cachexia pathogenesis [12, 16, 28, 38], a syndrome with devastating effects on advanced cancer patients, whose main feature is the severe loss of body and muscle mass [8].

To investigate the involvement of  $\cdot\text{NO}$  and nitrosative stress in skeletal muscle wasting of cancer cachexia, we used CL methods highly sensitive and specific for  $\cdot\text{NO}$  quantification [43] and for evaluation of lipid peroxidative damage [40], and chose a cachexia model that has a notable and fast cachetic response [56]. Walker-256 tumor induced loss of both body and muscle mass, which were initiated on the 5<sup>th</sup> day following tumor implantation, and were exacerbated on the 10<sup>th</sup> (table 1). Moreover, this cachexia model is known to cause significant alterations in oxidative metabolism of its hosts [38].

This tumor shows exponential growth, becoming ulcerative when implanted subcutaneously [57]. In the present study, tumor growth reached up to 19 g (about 10% of body mass) on the 10<sup>th</sup> day after tumor implantation. Its growth was potentialized when NOS inhibitors AG and LNAME were used (table 1).

Pizato et al [58] verified increase of  $\cdot\text{NO}$  production by macrophages, which was followed by decrease of tumor growth in rats that received supplementary polyunsaturated fatty acids. On the other hand, Wallace et al [59] showed that diets enriched with polyunsaturated fatty acids increase the macrophage cytotoxic activity on tumor cells. The importance of  $\cdot\text{NO}$  production for host defense is well established, participating of phagocytosis and inflammatory response regulation [60-62]. Based on these properties, it is possible that the inhibition of  $\cdot\text{NO}$  synthesis by treatment with NOS inhibitors has impaired immune response against the tumor, leading to its growth.

Since a progressive reduction of food intake was demonstrated in tumor-bearing rats, Pair Fed groups were also carried out to evaluate the possible contribution towards body and muscle mass

wasting in cachectic animals, and to verify if food restriction alters  $\text{NO}$  and LOOH levels on skeletal muscle.

Tumor-bearing rats showed body and muscle mass wasting more severe in relation to Pair Fed groups (table 1), demonstrating that the decrease of food intake was not the only mechanism responsible for severe loss of body and muscle mass in cancer cachexia.

$\text{NO}$  levels were increased in T5 group when compared with PBS/ Pair Fed 5 (figure 3A and table 1), probably following iNOS expression induced by  $\text{TNF-}\alpha$ , according to previous reports [4, 8, 9, 63].  $\text{NO}$  levels increase was blocked by AG and LNAME treatments (figure 4 and table 1), suggesting the involvement of cNOS and iNOS isoforms in skeletal muscle.

In T10,  $\text{NO}$  levels returned to PBS/ Pair Fed 10 control levels (figure 3). However, when compared with T5,  $\text{NO}$  levels of T10 group were significantly decreased (table 1). The decrease of food intake (including proteins) in these animals (about 58%) can have decreased available arginine levels for  $\text{NO}$  synthesis by NOS, since arginine is considered a semi-essential amino acid not synthesized by the body under stress conditions [64]. Pereira et al [65] demonstrated using the same cachexia model that the hepatic arginine consumption to produce urea is elevated. Moreover, clinical and experimental studies have shown that protein degradation is increased and that the amino acids released are used to synthesize glucose in cachectic patients and animals [4, 5, 10]. Thus, the mobilization of arginine and its following consumption to supply the hepatic urea production and gluconeogenesis can also contributed for decrease of  $\text{NO}$  levels on skeletal muscle of T10 animals.

The increase of  $\text{NO}$  production in T5 was followed by the increase of LOOH levels on skeletal muscle (figure 1A), which was significantly reduced in both LOOH and  $\text{NO}$  quantifications (figure 2 and 4, respectively) when AG or LNAME was administered. These findings demonstrate that  $\text{NO}$  is implicated in the process of lipid peroxidative damage on skeletal muscle. Lipid peroxidative damage on skeletal muscle was still elevated in T10, probably due to low membrane phospholipid turnover (figure 1B).

According to Radi et al [66] and Zimiani et al [29], high levels of  $\text{NO}$  can initiate peroxidative reactions on lipids by the formation of  $\text{ONOO}^{\cdot}$ . Products generated by lipid peroxidative chain, including MDA and others aldehydes, can also react with proteins [12, 28]. In addition, different

molecular targets can be modified through reactions of nitrosation and nitration, which can be mediated by ONOO<sup>-</sup> or others RNS [61].

Despite of others non-specific reactive species and free radicals to be able to mediate lipid peroxidation reactions, the concomitant increases of <sup>•</sup>NO and LOOH levels, as well as the inhibition of both by the treatment with NOS inhibitors, indicate the involvement of <sup>•</sup>NO in lipoperoxidative damage found in skeletal muscle of rats with Walker-256 tumor-induced cachexia.

It has been reported that oxidative and nitrosative stress exert regulative role on the ubiquitin-proteasoma-dependent pathway, accelerating protein degradation and loss of muscle mass [16, 67]. Davies [68] and Barreiro et al [12] also refer that the alterations on proteins, mediated by oxidative and/ or nitrosative stress, would make them more susceptible for proteolytic degradation. A previous study in our laboratory [data not published] demonstrated that atrogin levels, an enzyme implicated in protein ubiquitination process, were elevated in skeletal muscle already on the 5<sup>th</sup> day following tumor implantation. In the same study, it was shown increased protein carbonyls levels in skeletal muscle on the 10<sup>th</sup> day.

In the present study, unlike of expected, the prevention of lipid peroxidative damage in skeletal muscle by NOS inhibitors treatment did not modify body and muscle mass wasting (figure 5 and table 1), possibly because the complexity of Walker-256 tumor-induced cachexia, in which can be involved several mechanisms leading to muscle wasting further than oxidative and nitrosative stress.

To know the effects of chronic NOS inhibitors use under physiologic conditions, since there are reports showing both impaired contractile function and loss of muscle mass in rats treated with LNAME [69], control groups of animals inoculated with PBS, fed *ad libitum* and treated with AG (50 mg/kg) or LNAME (20 mg/kg) in a similar manner and for the same time of experimental ones were also carried out.

Significant loss of body and muscle mass occurred with LNAME use (figure 5). Thereby, it is possible that body and muscle mass wasting showed by T5 group was not altered by LNAME treatment because only this drug is able to induce loss of mass. LNAME must have the same mechanisms of body and muscle mass wasting of cancer cachexia because if they are different, a potentialized mass wasting would have been showed by T5LNAME group (figure 5).

In conclusion, our data comprise on the first direct evidence of the  $\cdot\text{NO}$  implication in skeletal muscle lipid peroxidative damage in cachetic Walker-256 tumor-bearing rats. However, more studies are necessary for investigation of  $\cdot\text{NO}$ -mediated lipid peroxidation role in muscle mass wasting of cancer cachexia.

## 5. ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Jesus A. Vargas and Pedro S. R. Dionízio Filho, of the Pathology Laboratory, for the grant technical support, and to the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, and the Programa de Apoio a Núcleos de Excelência do Estado do Paraná – PRONEX-PR for providing financial support.

## 6. REFERENCES

- [1] Faintuch, J., Soeters, P. B., Osmo, H. G. (2006) Nutritional and metabolic abnormalities in pre-AIDS HIV infection. *Nutrition* 22, 683-690.
- [2] Walsmith, J., Roubenoff, R. (2002) Cachexia in rheumatoid arthritis. *Int. J. Cardiol.* 85, 89-99.
- [3] Haehling, S., Doehner, W., Anker, S. D. (2007) Nutrition, metabolism, and the complex pathophysiology of cachexia in chronic heart failure. *Cardiovascular Research* 73, 298-309.
- [4] Tisdale, M. J. (2001) Cancer anorexia and cachexia. *Nutrition* 17, 438-442.
- [5] Tisdale, M. J. (2000) Metabolic abnormalities in cachexia and anorexia. *Nutrition* 16, 1013-1014.
- [6] Warren, S. (1932) The immediate cause of death in cancer. *Am. J. Med. Sci.* 184, 610-613.
- [7] Andreyev, H. J., Norman, A. R., Oates J., Cunningham, D. (1998) Why do patients with weight loss have a worse outcome when undergoing chemotherapy for gastrointestinal malignancies? *Eur. J. Cancer* 34, 503-509.

- [8] Fearon, K. C. H., Moses, A. G. H. (2002) Cancer cachexia. *Int. J. Cardiol.* 85, 73-81.
- [9] Argilés, J. M., Busquets, S., García-Martínez, C., López-Soriano, F. J. (2005) Mediators involved in the cancer anorexia-cachexia syndrome: past, present, and future. *Nutrition* 21, 977-985.
- [10] Hasselgren, P. O., Wray, C., Mammen, J. (2002) Molecular regulation of muscle cachexia: it may be more than the proteasome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 1-10.
- [11] Costelli, P., Reffo, P., Penna, F., Autelli, R., Bonelli, G., Baccino, F. M. (2005)  $\text{Ca}^{2+}$ -dependent proteolysis in muscle wasting. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37, 2134-2146.
- [12] Barreiro, E., De La Puente, B., Busquets, S., López-Soriano, F. J., Gea, J., Argilés, J. M. (2005) Both oxidative and nitrosative stress are associated with muscle wasting in tumour-bearing rats. *FEBS Lett.* 579, 1646-1652.
- [13] Hasselgren, P. O. (1999) Role of the ubiquitin-proteasome pathway in sepsis-induced muscle catabolism. *Mol. Biol. Rep.* 26, 71-76.
- [14] Tomkinson, B. (1999) Tripeptidyl peptidases: enzymes that count. *Trends Biochem. Sci.* 24, 355-359.
- [15] Llovera, M., Garcia-Martinez, C., Agell, N., Marzabal, M., Lopez-Soriano, F. J., Argilés, J. M. (1994) Ubiquitin gene expression is increased in skeletal muscle of tumour-bearing rats. *FEBS Lett.* 338, 311-318.
- [16] Gomes-Marcondes, M. C., Tisdale, M. J. (2002) Induction of protein catabolism and the ubiquitin-proteasome pathway by mild oxidative stress. *Cancer Lett.* 180, 69-74.



- [17] Hasselgren, P. O., Fischer, J. E. (2001) Muscle cachexia: current concepts of intracellular mechanisms and molecular regulation. *Ann. Surg.* 233, 9-17.
- [18] Price, S. R. (2003) Increased transcription of ubiquitin-proteasome system components: molecular responses associated with muscle atrophy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 617-628.
- [19] Temparis, S., Asensi, M., Taillandier, D., Aourousseau, E., Larbaud, D., Obled, A., Bechet, D., Ferrara, M., Estrela, J. M., Attaix, D. (1994) Increased ATP-ubiquitin-dependent proteolysis in skeletal muscles of tumor-bearing rats. *Cancer Res.* 54, 5568-5573.
- [20] Costelli, P., De Tullio, R., Baccino, F. M., Melloni, E. (2001) Activation of Ca<sup>2+</sup>-dependent proteolysis in the skeletal muscle and heart in cancer cachexia. *Br. J. Cancer* 84, 946-950.
- [21] Deval, C., Mordier, S., Obled, C., Bechet, D., Combaret, L., Attaix, D. et al. (2001) Identification of cathepsin L as a differentially expressed message associated with skeletal muscle wasting. *Biochem. J.* 360, 143-150.
- [22] Baeuerle, P. A. (2000) Reactive oxygen species as costimulatory signals of cytokine-induced NF- $\kappa$ B activation pathways. In: *Antioxidant regulation of the genes* (Sen, C. K, Sies, H. and Baeuerle, P. A., Eds), pp. 181-187. Academic Press, San Diego, CA.
- [23] Hasselgren, P. O. (1999) Glucocorticoids and muscle catabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2, 201-205.
- [24] Penner, C. G., Gang, G., Wray, C., Fischer, J. E., Hasselgren, P. O. (2001) The transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 are differentially regulated in skeletal muscle during sepsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 1331-1336.

- [25] Moore-Carrasco, R., Busquets, S., Almendro, V.; Palanki, M., Lopez-Soriano, F. J., Argiles, J. M. (2007) The AP-1/NF-kappaB double inhibitor SP100030 can revert muscle wasting during experimental cancer cachexia. *Int. J. Oncol.* 30, 1239-1245.
- [26] Glass, D. J. (2005) Skeletal muscle hypertrophy and atrophy signaling pathways. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 37, 1974-1984.
- [27] Ferreira, A. L. A., Matsubara, L. S. (1997) Free radicals: concepts, associated diseases, defense system and oxidative stress. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 43, 61-68.
- [28] Buck, M., Chojkier, M. (1996) Muscle wasting and dedifferentiation induced by oxidative stress in a murine model of cachexia is prevented by inhibitors of nitric oxide synthesis and antioxidants. *EMBO J.* 15, 1753-1765.
- [29] Zimiani, K., Guarnier, F. A., Miranda, H. C., Watanabe, M. A., Cecchini, R. (2005) Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence. *Nitric Oxide* 13, 196-203.
- [30] Alderton, W. K., Cooper, C. E., Knowles, R. G. (2001) Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem. J.* 357, 593-615.
- [31] Nagase, S., Takemura, K., Ueda, A., Hirayama, A., Aoyagi, K., Kondoh, M., Koyama, A. (1997) A novel nonenzymatic pathway for generation of nitric oxide by the reaction of hydrogen peroxide and D- or L-arginine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 233, 150-153.
- [32] Lepore, D. A. (2000) Nitric oxide synthase-independent generation of nitric oxide in rat skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Nitric Oxide* v. 4, 541-545.

- [33] Stamler, J. S. (1994) Redox signaling: nitrosylation and related target interactions of nitric oxide. *Cell* 78, 931-936.
- [34] Grisham, M. B., Jourdain, D., Wink, D. A. (1999) Nitric oxide I: Physiological chemistry of nitric oxide and its metabolites: Implications in inflammation. *Am. J. Physiol.* 276, G315-G321.
- [35] Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. (1999) Oxidative stress: adaptation, damage, repair and death. In: *Free Radicals in Biology and Medicine*. pp: 246-249. Oxford University Press. Oxford.
- [36] Matthews, N., Neale, M. L., Jackson, S. K., Stark, J. M. (1987) Tumour cell killing by tumour necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. *Immunology* 62, 153-155.
- [37] Hennet, T., Richter, C., Peterhans, E. (1993) Tumour necrosis factor- $\alpha$  induces superoxide anion generation in mitochondria of L929 cells. *Biochem J.* 289, 587-92.
- [38] Freitas, J. J. S., Pompéia, C., Miyasaka, C. K., Curi, R. (2001) Walker-256 tumor growth causes oxidative stress in rat brain. *J. Neurochem.* 77, 655-663.
- [39] Floyd, RA. (1990) Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 4, 587-97.
- [40] Gonzalez-Flecha, B., Llesuy, S., Boveris, A. (1991) Hydroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radic. Biol. Med.* 10, 93-100.
- [41] Zamburlini, A., Maiorino, M., Barbera, P., Pastorino, A. M., Roveri, A., Cominacini, L., Ursini, F. (1995) Measurement of lipid hydroperoxides in plasma lipoproteins by a new highly-sensitive 'single photon counting' luminometer. *Biochim. Biophys. Acta* 1256, 233-240.

- [42] Archer, S. L., Shultz, P. J., Warren, J. B., Hampl, V., Demaster, E. G. (1995) Preparation of standards and measurement of nitric oxide, nitroxyl and related oxidation products. *Methods* 7, 21-34.
- [43] Kikuchi, K., Nagano, T., Hayakawa, H., Hirata, Y., Hirobe, M. (1993) Detection of nitric oxide production from a perfused organ by a luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system. *Anal. Chem.* 65, 1794-1799.
- [44] Tsukada, Y., Yasutake, M., Jia, D., Kusama, Y., Kishida, H., Takano, T., Tsukada, S. (2003) Real-time measurement of nitric oxide by luminol-hydrogen peroxide reaction in crystalloid perfused rat heart. *Life Sci.* 72, 989-1000.
- [45] Yavuz, D., Küçükkaya, B., Haklar, G., Ersöz, Ö., Akoglu, E., Akalin, S. (2003) Effects of captopril and losartan on lipid peroxidation, protein oxidation and nitric oxide release in diabetic rat kidney. *Prostaglandins, Leukot. Essent. Fatty Acids* 69, 223-227.
- [46] Gardiner, S. M., Compton, A. M., Kemp, P. A., Bennett, T. (1990) Regional and cardiac haemodynamic responses to glyceryl trinitrate, acetylcholine, bradykinin and endothelin-1 in conscious rats: effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester. *Br. J. Pharmacol.* 101, 632-639.
- [47] Mueller, P. J., Foley, C. M., Hasser, E. M. (2005) Hindlimb unloading alters nitric oxide and autonomic control of resting arterial pressure in conscious rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289, R1 40-47.
- [48] Metcalf, K., Jungersten, L., Lisander, B. (2002) Effective inhibition of nitric oxide production by aminoguanidine does not reverse hypotension in endotoxaemic rats. *Acta Anaesthesiol. Scand.* 46, 17-23.
- [49] Lowry, O. H., Rosenbrough, N. S., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

- [50] Miller, G. L. Protein determination for large number of samples. (1959) *Anal. Chem.* 31, n. 5, p. 964.
- [51] Forster, M. J., Dubey, A., Dawson, K. M., Stutts, W. A., Lal, H., Sohal, R. S. (1996) Age-related losses of cognitive function and motor skills in mice are associated with oxidative protein damage in the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93, 4765-4769.
- [52] Moore, F. D., Caine, W. T. (2000) Emerging immunologic basis of reperfusion injury. *Transplant. Rev.* 14, 158-167.
- [53] Anaya-Prado, R., Toledo-Pereyra, L. H., Lentsch, A. B., Ward, P. A. (2002) Ischemia/reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 105, 248-258.
- [54] Blaisdell, F. W. (2002) The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc. Surg.* 10, 620-630.
- [55] Benzi, G., Moretti, A. (1995) Are reactive oxygen species involved in Alzheimer's disease? *Neurobiol. Aging* 16, 661-674.
- [56] Tayek, J. A., Istfan, N. W., Jones, C. T., HAmawy, K. J., Bistran, B. R., Blackburn, G. L. (1986) Influence of Walker-256 carcinosarcoma on muscle, tumor, and whole-body protein synthesis and growth rate in the cancer-bearing rat. *Cancer Res.* 46, 5649-5654.
- [57] Garatini, S., Guaitani, A. (1981) Animal models for the study of cancer induced anorexia. *Cancer Treat. Rep.* 65, 23-25.

- [58] Pizato, N., Bonatto, S., Piconcelli, M., Souza, L. M., Sassaki, G. L., Naliwaiko, K., Nunes, E. A., Curi, R., Calder, P. C., Fernandes, L. C. (2006) Fish oil alters T-lymphocyte proliferation and macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. *Nutrition* 4, 425-432.
- [59] Wallace, F. A., Neely, S. J., Miles, E. A., Calder, P. C. (2000) Dietary fats affect macrophage-mediated cytotoxicity towards tumour cells. *Immunol. Cell Biol.* 78, 40-48.
- [60] Salvemini, D. (1997) Regulation of cyclooxygenase enzymes by nitric oxide. *Cell. Mol. Life Sci.* 53, 576-582.
- [61] Liaudet, L., Soriano, F. G., Szabo, C. (2000) Biology of nitric oxide signaling. *Crit. Care Med.* 28, N37-N52.
- [62] Connelly, L., Madhani, M., Hobbs, A. (2005) Resistance to endotoxic shock in endothelial nitric oxide synthase (eNOS) knock-out mice: A pro-inflammatory role for eNOS-derived NO in vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 10040-10046.
- [63] Argilés, J. M., Moore-Carrasco, R., Busquets, S., López-Soriano, F. J. (2003) Catabolic mediators as targets for cancer cachexia. *Drug Discov. Today* 8, 838-844.
- [64] Chatterjee, S., Premachandran, S., Shukla, J., Poduval, T. B. (2007) Synergistic therapeutic potential of dexamethasone and L-arginine in lipopolysaccharide-induced septic shock. *J. Surg. Res.* 140, 99-108.
- [65] Pereira, S. R. C., Darronqui, E., Constantin, J., Silva, M. H. R. A., Yamamoto, N. S., Bracht, A. (2004) The urea cycle and related pathways in the liver of Walker-256 tumor-bearing rats. *Biochim. Biophys. Acta* 1688, 187-196.

[66] Radi, R., Beckman, J. S., Bush, K. M., Freeman, B. A. (1991) Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch. Biochem. Biophys.* 288, 481-487.

[67] Reid, M. B., Li, Y. P. (2001) Cytokines and oxidative signaling in skeletal muscle. *Acta Physiol. Scand.* 171, 225-232.

[68] Davies, K. J. (1987) Protein damage and degradation by oxygen radicals. IV. Degradation of denatured protein. *J. Biol.Chem.* 262, 9914-9920.

[69] Wang, M. X., Murrell, D. F., Szabo, C., Warren, R. F., Sarris, M., Murrell, G. A. (2001) Nitric oxide in skeletal muscle: Inhibition of nitric oxide synthase inhibits walking speed in rats. *Nitric Oxide* 5, 219-232.

## 7. FIGURE LEGENDS

**Figure 1:** T-BOOH-induced CL for evaluation of lipid peroxidative damage in skeletal muscle of rats with Walker-256 tumor-induced cachexia. A: T5 x PBS/ Pair Fed 5; B: T10 x PBS/ Pair Fed 10. Male Wistar rats were inoculated subcutaneously with 0.5 mL of PBS or  $8 \times 10^7$  tumor cells suspended in 0.5 mL of the same buffer, at the right flank. Animals inoculated with PBS were fed in a similar manner to experimental ones (PBS/ Pair Fed). 5 or 10 days after PBS or tumor inoculation, left *gastrocnemius* muscles were excised and homogenized in 30 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 120 mM KCl, at pH 7,4 (1% w/v). Muscle homogenates were centrifugated at 600xg, for 15 minutes, at 4°C, and the supernatants were used for CL analysis. \*  $p < 0.001$  in relation to PBS/Pair Fed 5; +  $p < 0,05$  in relation to PBS/ Pair Fed 10. PBS/ Pair Fed 5 (n=6); PBS/ Pair Fed 10 (n=6); T5 (n=9); T10 (n=9).

**Figure 2:** Effect of NOS inhibitors on t-BOOH-induced CL in skeletal muscle of rats 5 days after Walker-256 tumor implantation. Animals inoculated with  $8 \times 10^7$  tumor cells at right flank were treated daily with AG (50mg/kg) or LNAME (20mg/kg) intraperitoneally. 5 days after tumor implantation, left *gastrocnemius* muscles were excised and homogenized in 30 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 120 mM KCl, at pH 7,4 (1% w/v). Muscle homogenates were centrifugated at 600xg, for 15 minutes, at 4°C, and the supernatants were used for CL analysis. \* $p < 0.001$  in relation to PBS/Pair Fed 5; + $p < 0.001$  in relation to T5. PBS/ Pair Fed 5 (n=6); T5 (n=9); T5AG (n=9); T5LNAME (n=9).

**Figure 3:**  $\text{H}_2\text{O}_2$ -luminol-induced CL for  $\cdot\text{NO}$  measurement in skeletal muscle of rats with Walker-256 tumor-induced cachexia. A: T5 x PBS/ Pair Fed 5; B: T10 x PBS/ Pair Fed 10. Male Wistar rats were inoculated subcutaneously with 0.5 mL of PBS or  $8 \times 10^7$  tumor cells suspended in 0.5 mL of the same buffer, at the right flank. Animals inoculated with PBS were fed in a similar manner to experimental ones (PBS/ Pair Fed). 5 or 10 days after PBS or tumor inoculation, left *gastrocnemius* muscles were excised and homogenized in 2 mM  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , at pH 8,5 (0.05% w/v) and diluted 20 times for CL analysis. \*  $p < 0.001$  in relation to PBS/Pair Fed 5. PBS/ Pair Fed 5 (n=6); PBS/ Pair Fed 10 (n=6); T5 (n=9); T10 (n=9).



**Figure 4:** Effect of NOS inhibitors on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-luminol-induced CL in skeletal muscle of rats 5 days after Walker-256 tumor implantation. Animals inoculated with 8x10<sup>7</sup> tumor cells at right flank were treated daily with AG (50mg/kg) or LNAME (20mg/kg) intraperitoneally. 5 days after tumor implantation, left *gastrocnemius* muscles were excised and homogenized in 2 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, at pH 8,5 (0.05% w/v) and diluted 20 times for CL analysis. \* p<0.001 in relation to PBS/Pair Fed 5; <sup>+</sup>p<0.001 in relation to T5. PBS/ Pair Fed 5 (n=6); T5 (n=6); T5AG (n=9);T5LNAME (n=9).

**Figure 5:** Effect of NOS inhibitors on body (A) and muscle mass (B) wasting. Animals were weighted and inoculated with 8x10<sup>7</sup> tumor cells or PBS at right flank and were treated daily with AG (50mg/kg) or LNAME (20mg/kg) intraperitoneally. 5 days after tumor or PBS inoculation, the animals were weighted and their left *gastrocnemius* muscles were excised and weighted for calculations of body and muscular wasting. Distinct letters correspond to values significantly different. \* p<0,001 in relation to PBS/ Pair Fed 5; + p<0,01 in relation to PBS/ Pair Fed 5. PBS/ Pair Fed 5 (n=3); PBS/ AG (n=3); PBS/ LNAME (n=3); T5 (n=3); T5AG (n=3); T5LNAME (n=3).

## 8. TABLES AND FIGURES

**Table 1:**  $\cdot$ NO levels in skeletal muscle of rats during the development of Walker-256 tumor-induced cachexia.

| Groups                 | Tumor mass (g)                | Loss of body mass (%)         | Loss of muscle mass (%)         | $\cdot$ NO (fmol/g of tissue) |
|------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| <b>PBS/Pair Fed 5</b>  | –                             | 2.53 $\pm$ 1.46 <sup>a</sup>  | –7.56 $\pm$ 1.03 <sup>a</sup>   | 2.52 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup>  |
| <b>T5</b>              | 4.32 $\pm$ 0.59 <sup>a</sup>  | 10.67 $\pm$ 1.24 <sup>b</sup> | 11.63 $\pm$ 2.21 <sup>b*</sup>  | 5.20 $\pm$ 0.48 <sup>b*</sup> |
| <b>T5AG</b>            | 7.44 $\pm$ 0.66 <sup>b</sup>  | 11.90 $\pm$ 1.89 <sup>b</sup> | 11.24 $\pm$ 1.13 <sup>b</sup>   | 2.41 $\pm$ 0.20 <sup>a§</sup> |
| <b>T5LNAME</b>         | 10.34 $\pm$ 0.42 <sup>c</sup> | 15.09 $\pm$ 2.90 <sup>b</sup> | 16.71 $\pm$ 3.28 <sup>b</sup>   | 2.06 $\pm$ 0.18 <sup>a§</sup> |
| <b>PBS/Pair Fed 10</b> | –                             | 11.35 $\pm$ 1.08 <sup>b</sup> | 5.26 $\pm$ 0.38 <sup>c</sup>    | 1.96 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>  |
| <b>T10</b>             | 19.16 $\pm$ 0.56 <sup>d</sup> | 20.15 $\pm$ 0.24 <sup>c</sup> | 35.38 $\pm$ 1.60 <sup>d##</sup> | 1.92 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>  |

$\cdot$ NO levels were quantified in skeletal muscle of rats by luminol-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced CL assay, using the height and the area under CL curves. Control groups were composed by animals inoculated subcutaneously with 0.5 mL of PBS, at the right flank, and fed in a similar manner to experimental ones (PBS/ Pair Fed). Experimental groups consisted on animals inoculated subcutaneously with 8x10<sup>7</sup> tumor cells, at the right flank, and sacrificed on the 5<sup>th</sup> (T5) or 10<sup>th</sup> (T10) day after tumor implantation. Distinct letters correspond to values significantly different. \*p<0.001 in relation to PBS/ Pair Fed 5; #p<0.001 in relation to PBS/ Pair Fed 10; §p<0.001 in relation to T5. PBS/ Pair Fed 5 (n=3); PBS/ Pair Fed 10 (n=3); T5 (n=3); T5AG (n=3); T5LNAME (n=3); T10 (n=3).

Figure 1

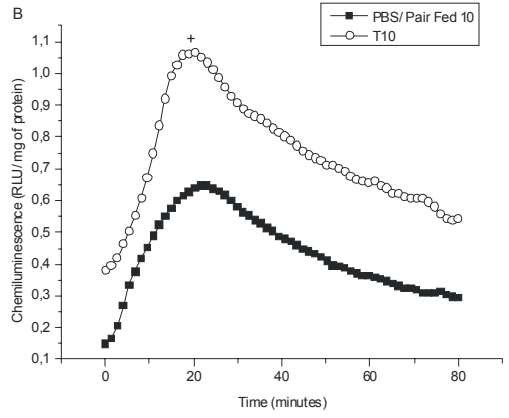
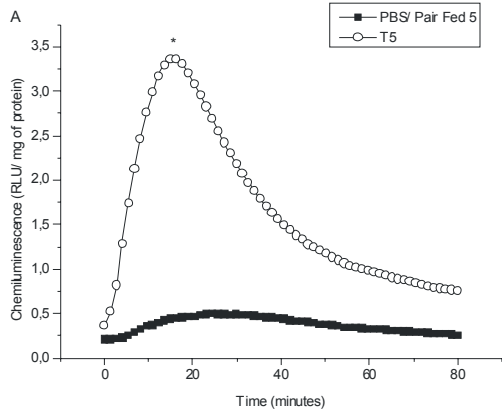


Figure 2

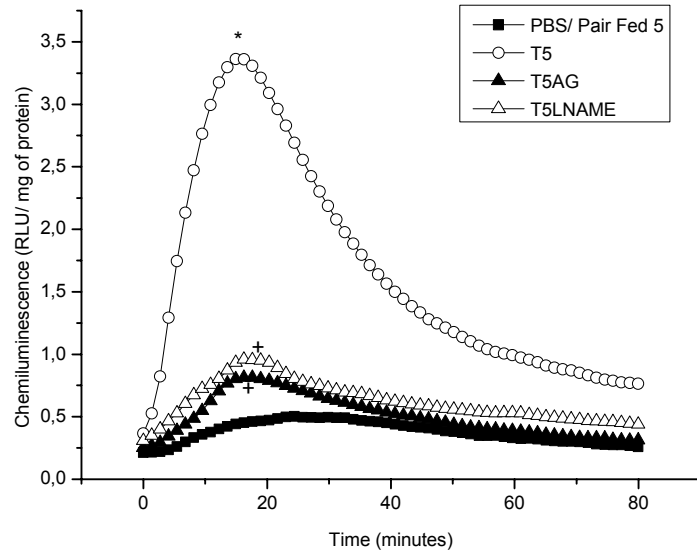


Figure 3

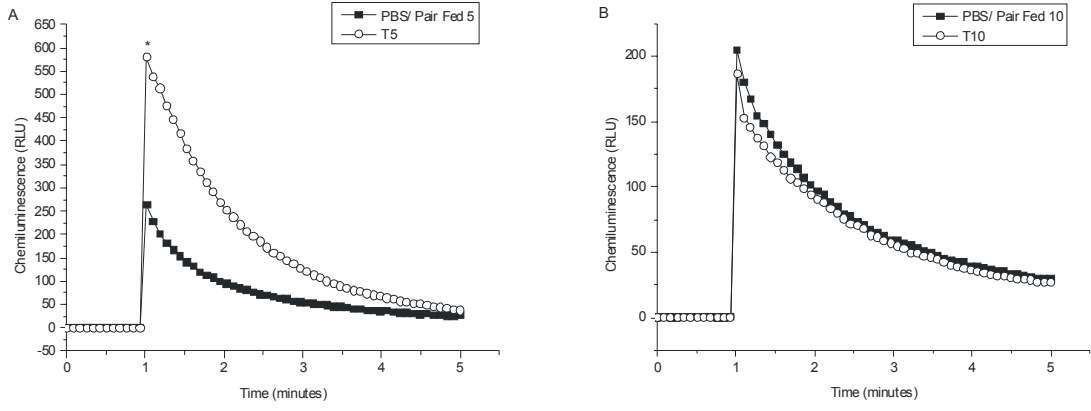


Figure 4

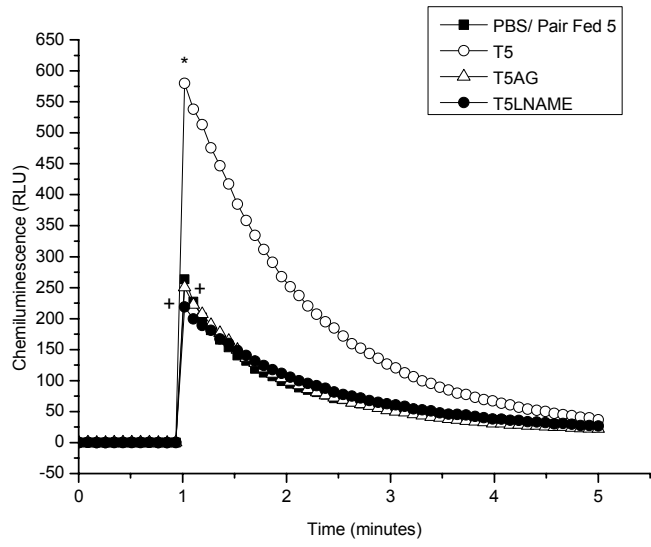


Figure 5

