



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

FÁBIO LEANDRO SANTOS FENNER

**PERFIL DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) PELO
CEREBELO NA PROGRESSÃO DO ESTADO CAQUÉTICO
INDUZIDO POR TUMOR DE WALKER -256**

FÁBIO LEANDRO SANTOS FENNER

**PERFIL DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) PELO
CEREBELO NA PROGRESSÃO DO ESTADO CAQUÉTICO
INDUZIDO POR TUMOR DE WALKER -256**

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

Orientadora: Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani

Londrina
2009

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F336p Fenner, Fábio Leandro Santos.

Perfil da produção de óxido nítrico (NO) pelo cerebelo na progressão do estado caquético induzido por tumor de Walker-256 / Fábio Leandro Santos Fenner. – Londrina, 2009.
57 f. : il.

Orientador: Alessandra Lourenço Cecchini Armani.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2009.

Inclui bibliografia.

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

CDU 616-092

FÁBIO LEANDRO SANTOS FENNER

**PERFIL DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) PELO
CEREBELO NA PROGRESSÃO DO ESTADO CAQUÉTICO
INDUZIDO POR TUMOR DE WALKER -256**

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

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pingé
Universidade Estadual de Londrina

Prof. Dr. Isaias Dichi
Universidade Estadual de Londrina

Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani
Universidade Estadual de Londrina

Londrina, 10 de julho de 2009.

Porém, eu, Senhor, esperei em Vós,
por causa da Vossa Lei,
e porque em Vós tudo é clemência.
Esperou a minha alma no Senhor,
susteve-se a minha alma na Sua palavra. Amém

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Alessandra Lourenço Cecchini Armani pela sua imprescindível orientação, instrução e encorajamento durante todas as etapas deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Rubens Cecchini pelo valioso suporte durante a realização deste trabalho.

A Profa. Flávia Alessandra Guarnier pela disponibilidade e contribuição essencial na realização deste trabalho e na minha formação científica.

A minha família que sempre me apoiou e colaborou em todas as horas e com todas as suas forças para meu êxito. Este trabalho não seria realizado se não fosse vocês.

Aos estimados amigos Vera Lúcia Hideo Tatakihara, Roberto Iemitsu Tatakihara, Marcelo Abbá Macioszek pela amizade sincera e confortante nas horas mais difíceis.

A Profa. Alissana Ester Iakmiu Camargo pelas instruções fundamentais no início da pesquisa.

Ao Prof. Alexandre Yukio Saito pela sua colaboração em informática.

Aos amigos e técnicos Jesus Antonio Vargas e Pedro Sebastião Raimundo Dionízio Filho pela disponibilidade e ajuda nos experimentos e na manutenção dos animais. Deus abençoe vocês sempre!

Aos amigos da pós-graduação: Andrea Cristina Koishi, Carolina Panis, Gabriela Gonçalves de Oliveira, Jacqueline Bueno Ferreira, Jair Tonon, Juliana Laino do Val Carneiro, Juliana Torres Tomazi Fritzen, Karen Brajão de Oliveira, Luiz Antonio Custódio, Maria Claudia N Dutra de Menezes, Sandra Regina Lepri, Sergio Marques Borghi, Tatiane Ferreira Petroni, Thiago Yuiti Castilho Massuda.

A Profa. Dra. Marli Cardoso Martins Pinge e Profa. Dra. Helenir Medri de Souza pelas orientações indispensáveis no momento de escrever a dissertação.

Ao corpo docente do Mestrado em Patologia Experimental: Profa. Dra. Eiko Nakagawa Itano, Prof. Dr. Emerson José Venancio, Profa. Dra. Halha Saridakis, Profa. Dra. Ionice Felipe, Prof. Dr. Leonardo Sturion, Profa. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe, Prof. Dr. Mario Augusto Ono, Prof. Dr. Phileo Pinge Filho, Prof. Dr. Rubens Cecchini, Profa. Dra. Tânia Longo Mazzuco.

Aos amigos do laboratório: Cláudia Roberta Brunquell, Daniel Kogashi, Franciele Caroline Rodrigues, Lucas Freitas de Freitas, Márcio Tomás de Aquino, Pâmela Micheletti, Patricia da Silva Peres, Rafaela C. Cayus, Renato Cardoso, Sara Bernardes, Tatiane De Rossi, Vânia Aparecida Terra Malachias, Vitor Basso Schul.

A todos os amigos do Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário que me apoiaram e permitiram fazer esta pós-graduação.

Aos amigos do Biotério do Hospital Universitário, Donizete Rodrigues Belitardo e Izaltino Farias que sempre demonstraram disposição e eficiência.

As secretárias Ana Maria Rodrigues e Vânia Darc de Castro pela disponibilidade e simpatia.

FENNER, Fábio Leandro Santos. **Perfil da produção de Óxido Nítrico (NO) pelo cerebelo na progressão do estado caquético induzido por Tumor de Walker-256**. 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

RESUMO

A síndrome caquexia-anorexia é um estado metabólico complexo caracterizado por perda de músculos, tecido adiposo e anorexia. A perda de peso corporal pode ser causada por uma adaptação metabólica do indivíduo em prol do crescimento do tumor. A caquexia faz parte da progressão de diversas doenças, dentre elas, o câncer. Estudos anteriores em nosso laboratório demonstraram a associação entre caquexia e produção de NO no músculo esquelético e no córtex cerebral de ratos. O NO é um radical livre gasoso e hidrofóbico e sua baixa reatividade permite difundir-se por longas distâncias, intra e intercelularmente, de modo semelhante ao oxigênio molecular (O₂) e ao dióxido de carbono (CO₂). Ele pode atuar nas células do sistema nervoso central de forma fisiológica ou estimulando a produção de espécies reativas do oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) no organismo. Um exemplo é o peroxinitrito (ONOO⁻) que pode provocar lipoperoxidação e lesar células do SNC levando a doenças neurodegenerativas. Este estudo tem como objetivo traçar o perfil da produção de NO pelo cerebelo durante a evolução da caquexia induzida pelo tumor de Walker-256 e relacionar a produção do NO com a lipoperoxidação tecidual. A caquexia foi induzida através da inoculação subcutânea (sc) de 8x10⁷ células tumorais na porção lateral da pata posterior direita de ratos Wistar machos. Estes animais foram divididos em três grupos de acordo com o tempo de implante das células tumorais: 5 (T5), 10 (T10) ou 14 dias (T14). Os grupos controle, inoculado com PBS ao invés de células do tumor (controle PBS), e grupo *pair-fed* também foram utilizados. O grupo experimental T5 foi tratado com LNAME (20 mg/Kg) ou AG (50 mg/Kg) diariamente até o 5º dia após o implante das células tumorais e foram denominados T5-LN e T5-AG, respectivamente. O cerebelo de todos os animais foram removidos e homogeneizados na concentração de 100 mg/mL com o tampão específico para cada ensaio realizado. A produção de NO foi diretamente detectada no homogenato de cerebelo dos animais controle e experimentais pela técnica de quimiluminescência com H₂O₂-luminol. Também, a técnica de quimiluminescência induzida por t-butil hidroperóxido foi realizada para a detecção da lipoperoxidação nos mesmos grupos. A capacidade antioxidante do cerebelo foi investigada através da medida da Capacidade Antioxidante Total (TRAP). Os níveis de NO dos animais T5 (p<0,0001) foram significativamente aumentados em relação ao grupo controle PBS. Nos animais T10 e T14 não houve alteração significativa nos níveis de NO. Os níveis de NO de animais T5-LN e T5-AG apresentaram diminuição significativa em relação ao grupo T5 (p<0,0001). O grupo *pair-fed* não apresentou aumento significativo nos níveis de NO em relação ao controle PBS. Em relação a lipoperoxidação do tecido, os animais T5, T10 e T14 apresentaram níveis de lipoperoxidação significativamente maiores (p<0,0001) em relação ao grupo controle PBS. Os níveis de lipoperoxidação dos animais T5-LN e T5-AG apresentaram diminuição significativa em relação ao grupo T5 (p<0,0001). Os níveis de TRAP apresentam-se significativamente diminuídos em relação ao grupo controle PBS no T10 (p<0,01) e no T14 (p<0,05). Estes resultados revelam a participação do NO na lesão peroxidativa observada no cerebelo durante a progressão da caquexia induzida por tumor de Walker-256. De maneira particular, o cerebelo está vulnerável à lesão através deste mecanismo. A inibição da produção de NO neste tecido pode diminuir os níveis de lesões lipoperoxidativas.

Palavras chave: Caquexia. Óxido nítrico. Cerebelo. Radicais livres. Câncer.

FENNER, Fábio Leandro Santos. **Profile of the nitric oxide (NO) production on the cerebellum in the progression of the cachexia induced by Walker-256 tumor.** 2009. 61f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2009.

ABSTRACT

The cachexia-anorexia syndrome is a complex metabolic state, characterized by muscle and fat tissue loss. In cancer subjects, body weight loss could be caused by the presence of a growing tumor that causes metabolic adaptation of the subject in favour of its growth. Cachexia is part of many illness, amongst that, cancer. Prior studies in our lab have shown an association between the development of cachexia and the production of nitric oxide (NO) by skeletal muscle and brain cortex. NO is a free radical with low reactivity, and its hydrophobic nature allows it to travel far distances inside and outside the cells, likewise O₂ and CO₂. NO can also act as a physiological or pathological device in the central nervous system (CNS), by producing reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). One of the NO products is peroxynitrite (ONOO⁻) that can cause lipid peroxidation of cell membranes of the CNS leading to neurodegenerative diseases. This study aim to draw a profile of NO production by the cerebellum of rats, during the development of cachexia induced by Walker-256 tumor and relate this production to cerebellum lipidperoxidation. To induce cachexia, 8 x 10⁷ walker-256 tumor cells were injected on the hind muscle leg of Wistar male rats. The experiment was divided into three groups - 5 (T5), 10 (T10) and 14 days (T14) after the tumor implant, followed by its controls, pair-fed and sham. The experimental group (T5) was also treated with LNAME (20 mg/Kg) or AG (50 mg/Kg) daily up to the 5th day of tumor cell implant, and those were designated T5-LN and T5-AG. The cerebellum was used for the NO quantification by the H₂O₂-luminol and lipidperoxidation induced by tert-butyl hydroperoxide chemiluminescence technique. The total antioxidant capacity (TRAP) was also measured. T5 cerebellum showed a significant increase (p<0,0001) of NO when compared to sham control. When treated with LNAME and AG, NO T5-LN (p<0,0001) and T5-AG (p<0,0001) decreased significantly when compared to T5. The pair-fed control group did not have any change on the NO parameters when compared to *ad libitum* control group, suggesting that the decrease of food intake does not have a significant impact on the NO production by the cerebellum. Lipidperoxidation was significantly higher (p<0,0001) than control group for all the experimental groups (T5, T10 and T14), but with NO inhibitors treatment, T5-LN e T5-AG, it showed a significant (p<0,0001) decrease of lipidperoxidation when compared to experimental group T5. TRAP levels showed a significant decrease on the T10 (p<0,01) and T14 (p<0,05) when compared to the sham control. These data suggest that NO is produced on the 5th day of tumor implant and in that occasion it could be related to the lipidperoxidation observed in the same cachexia developing time. The inhibition of NO production could diminish the lipidperoxidative lesions observed on the 5th day, and it could be an insight for future follow-up treatments for cancer patients that develop cachexia.

Keywords: Cachexia. Nitric oxide. Cerebellum. Free radical. Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Alterações promovidas pelo tumor e hospedeiro atuam em diversos locais no organismo e levam a caquexia	16
Figura 2 – Química Biológica do NO	19
Figura 3 – Formação de radical lipídico, radical Alquil-peroxi, propagação da cadeia de Peroxidação lipídica dependente de O ₂ , reação de radical alquil-peroxi com NO	24
Figura 4 – A química dos efeitos indiretos do NO.....	26
Figura 5 – Cadeia de propagação de peroxidação lipídica.....	29
Figura 6 – Gráfico modelo mostrando a emissão de fótons na TRAP pelo tempo de reação	36
Figura 7 – Quimiluminescência emitida por diferentes concentrações de homogenato de cerebelo de ratos	39
Figura 8 – Diminuição da emissão entre as análises de uma mesma amostra provavelmente relacionada ao tempo de exposição da amostra ao O ₂ e luz	39
Figura 9 – Reprodutibilidade entre as análises em quadruplicata de um mesmo animal. Ensaio de Determinação dos níveis de NO por Quimiluminescência induzida por H ₂ O ₂ -luminol.....	40
Figura 10 –Efeito da progressão da caquexia na concentração de NO no cerebelo determinada através de quimiluminescência induzida por H ₂ O ₂ -luminol em cerebelo de ratos com tumor de Walker-256	40
Figura 11 –Determinação dos níveis de NO em animais <i>pair-fed</i> T5, T10, T14 e Controle PBS	41
Figura 12 –Efeito dos inibidores de NOS sobre o nível de NO determinado através de quimiluminescência iniciada por H ₂ O ₂ -luminol em cerebelo de ratos inoculados com tumor Walker-256 por 5 dias (T5).....	42
Figura 13 –Quimiluminescência emitida por diferentes concentrações de homogenato de cerebelo de ratos Wistar.....	43
Figura 14 –Correlação entre os parâmetros concentração do homogenato de cerebelo e altura ou área da emissão da quimiluminescencia induzida por t-butil	43

Figura 15 –Quimiluminescência emitida por cerebelos oxidados com ABAP por 30, 60 e 90 minutos	44
Figura 16 –Efeito da caquexia nos níveis de hidroperóxidos lipídicos determinados por quimiluminescência induzida por t-butil em cerebelos de ratos inoculados com tumor de Walker-256 após 5, 10 e 14 dias.....	44
Figura 17 –Efeito dos inibidores de NOS sobre os níveis de lipoperóxidos determinados através de quimiluminescência iniciada por t-butil em cerebelo de ratos inoculados com celular de tumor de Walker-256 após 5 dias (T5).....	45
Figura 18 –TRAP dos homogenatos de cerebelo de ratos inoculados com tumor de Walker-256 após 5, 10 e 14 dias.....	46

LISTA DE SIGLAS

- NO** – óxido nítrico
- ABAP/AZOBIS** – 2,2-azo-bis 2-amidinopropano diidrocloreto
- AG** – aminoguanidina
- AIDS**: síndrome de imunodeficiência adquirida
- ATP**: adenosina trifosfato
- Ca⁺²**: íon cálcio
- cGMP** – guanosina monofosfato cíclico
- cNOS** – enzimas óxido nítrico sintase constitutivas
- CO₂** – dióxido de carbono
- DFX** – mesilato de desferrioxamina
- DNA** – ácido desoxirribonucléico
- e⁻** – elétron
- eNOS** – enzima óxido nítrico sintase endotelial
- ERNs** – espécies reativas do nitrogênio
- ERON** – espécies reativas do óxido nítrico
- EROs** – espécies reativas do oxigênio
- FAD** – flavina adenina dinucleotídeo
- Fe²⁺** – ferro
- FMN** – flavina adenina mononucleotídeo
- GSH** – glutatona reduzida
- GSNO** – S-nitrosoglutatona
- GSSG** – glutatona oxidada
- H⁻** – ânion hidrogênio
- H₂O₂** – peróxido de hidrogênio
- H₂SO₄** – ácido sulfúrico
- HNO** – ácido nítrico
- HNO₂** – ácido nitroso
- HOONO**: ácido peroxinitroso
- IFN-γ** – interferon gama
- IL-1** – interleucina 1
- IL-10** – interleucina 10
- IL-13** – interleucina 13

IL-2 – interleucina 2
IL-4 – interleucina 4
IL-6 – interleucina 6
iNOS – enzima óxido nítrico sintase indutível
ip – intraperitoneal / intraperitonealmente
KCl – cloreto de potássio
KH₂PO₄ – Fosfato monopotássico
LMF – fator mobilizador de lipídio
LN – LNAME
LNAME – NG-nitro-L-arginina-metil éster
LTD – *long-term depression*
LTP – *long-term potentiation*
MCP-1 – proteína quimioatraente de macrófagos-1
Mn-SOD – manganês-superóxido dismutase
mtNOS – enzima óxido nítrico sintase mitocondrial
N₂ – nitrogênio molecular
N₂O₃ – trióxido de dinitrogênio
Na₂CO₃ – Carbonato de sódio
Na₂HPO₄ – Fosfato de sódio dibásico
NaCl – cloreto de sódio
NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NaH₂PO₄ – Fosfato de sódio monobásico
NMDA – receptores N-metil-D-aspartato
nNOS – enzima óxido nítrico sintase neuronal
NO⁺ – íon nitrosonium
NO₂ – dióxido de nitrogênio
NO₂⁻ – nitrito
NO₃⁻ – nitrato
NOS I – enzima óxido nítrico sintase I
NOS II – enzima óxido nítrico sintase II
NOS III – enzima óxido nítrico sintase III
NOS – enzima óxido nítrico sintase
O₂⁻ – ânion superóxido
O₂ – oxigênio molecular

OH[•] – radical hidroxil

ONOO⁻ – peroxinitrito

PARS – enzima poli(ADP-ribose) sintetase

PDZ – Domínio da nNOS – PSD95, *discs-large* e *zona occludens-1*

pH – potencial hidrogeniônico

PIF – fator indutor de proteólise

PSD-95 – proteína pós-sináptica

RO₂[•] – radical peroxil

RR'NH – aminas

RSH – grupamento tiol

Sc – subcutânea / subcutaneamente

sGC – guanilato-ciclase solúvel

SNAP – S-nitroso-N-acetilpenicilamina

SNC – sistema nervoso central

SNP – sistema nervoso periférico

TBARs – substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

T-butil – t-butil hidroperóxido

TGF-β – fator de crescimento e transformação beta

TLRs – teceptores Toll

TNF-α – fator de necrose tumoral alfa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 CAQUEXIA: ASPECTOS GERAIS	15
1.2 BIOQUÍMICA DO $\dot{\text{N}}\text{O}$	17
1.3 CEREBELO E $\dot{\text{N}}\text{O}$	21
1.4 $\dot{\text{N}}\text{O}$ COMO NEUROPROTETOR	23
1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO	25
2 OBJETIVOS	30
2.1 OBJETIVO GERAL	30
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 ANIMAIS	31
3.2 REAGENTES	31
3.3 MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS DE TUMOR DE WALKER-256	31
3.4 MODELO EXPERIMENTAL DE CAQUEXIA	32
3.5 OBTENÇÃO E PREPARO DOS CEREBELOS	33
3.6 QUANTIFICAÇÃO DE $\dot{\text{N}}\text{O}$	33
3.7 AVALIAÇÃO DE LIPOPEROXIDAÇÃO	34
3.8 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO CEREBELO	35
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
4 RESULTADOS	38
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA CAQUEXIA	38
4.2 QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR H_2O_2 -LUMINOL PARA QUANTIFICAÇÃO DE $\dot{\text{N}}\text{O}$ NOS CEREBELOS	38
4.3 QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR TERT-BUTIL PARA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS NOS CEREBELOS	42
4.4 MEDIDA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)	45
5 DISCUSSÃO	47

6 CONCLUSÃO..... 52

REFERÊNCIAS 53

INTRODUÇÃO

1.1 CAQUEXIA: ASPECTOS GERAIS

A síndrome caquexia-anorexia representa um estado metabólico complexo caracterizado por progressiva perda e atrofia muscular e anemia secundária. Pode ser decorrente de câncer, falência cardíaca congestiva, doença pulmonar obstrutiva crônica, AIDS, diabetes, entre outras doenças (DELANO; MOLDAWER, 2006). Conforme MacDonald et al. (2003, p.143) a caquexia pode ser definida como a “síndrome que envolve perda de músculos e gorduras diretamente causada por fatores tumorais, ou indiretamente causada por uma resposta alterada do hospedeiro à presença do tumor”. Seus critérios para o diagnóstico clínico variam, entretanto, caracteriza-se em pacientes com câncer como uma perda de peso involuntária de mais de 5% do peso corporal (antes do aparecimento da doença) dentro de 6 meses (INUI, 2002). Ocorre em mais de 80% dos pacientes com câncer em estágios avançados e é responsável pela morte em mais de 20% desses casos. Mais precisamente, a caquexia está relacionada a determinados tipos de câncer, particularmente os do trato gastrointestinal e pulmão e, segundo Slaviero et al. (2003), a morte pode ocorrer quando há uma perda de 30% do peso pré-doença.

Podem ser identificadas três fases da caquexia: caquexia leve, moderada e grave. A caquexia grave é facilmente diagnosticada em pacientes com perda de peso irreversível, perda muscular, anorexia, saciedade precoce, funções físicas reduzidas, fadiga, anemia e edema. Apesar da inespecificidade dos sintomas nos primeiros estágios da caquexia, ela deve ser diferenciada da perda de peso que ocorre devido a pouca ingestão calórica. Assim, a perda de peso serve como marcador do processo caquético, entretanto, a verificação de anormalidades na perda de energia em repouso, que constitui uma parte específica da demanda energética do organismo, tem sido sugerida como possível marcador precoce, uma vez que inicia antes da perda de peso. Desta forma, faz-se necessário o aprimoramento e uso de marcadores precoces desta síndrome para que a intervenção terapêutica seja iniciada antes da detecção da perda de peso (SKIPWORTH et al., 2006).

Segundo Argilés e colaboradores (2005) a competição por nutrientes entre o tumor e o paciente leva ao progressivo estado de debilidade física e promove distúrbios metabólicos severos, como o hipercatabolismo, com déficit energético. Esse processo é regido

por uma série de mediadores, entre os quais, as citocinas são relatadas como os principais fatores humorais envolvidos na promoção e desenvolvimento da caquexia (BARACOS, 2006). Ainda, o tumor gera fatores que tem efeitos catabólicos, como o Fator Indutor de Proteólise (PIF) e Fator Mobilizador de Lipídeos (LMF) (HIRAI et al., 1998; TISDALE, 2003). A ação desses mediadores leva a alterações no metabolismo de carboidratos lipídeos e proteínas (figura 1) e aumento da taxa metabólica basal (TISDALE, 2009).

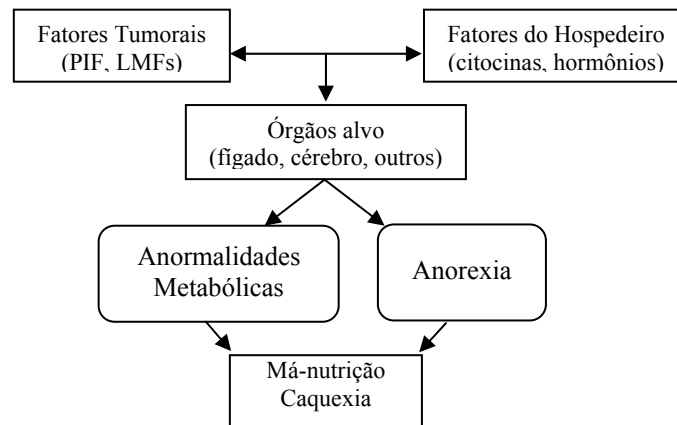


Figura 1 – Alterações promovidas pelo tumor e hospedeiro atuam em diversos locais no organismo e levam à caquexia.

Fonte: Gonçalves et al. (2006)

Segundo Baracos (2006), as citocinas podem atuar diretamente no catabolismo protéico, por isso, há uma concomitância entre inflamação e perda muscular. Os tumores contêm células inflamatórias e produzem diversas citocinas. Durante o câncer, as citocinas pró-inflamatórias estão associadas à fadiga, depressão e prejuízo da capacidade cognitiva (SERUGA et al., 2008).

A associação entre câncer e neurodegeneração é conhecida há muito tempo (NORRIS, 1972). Geralmente, os pacientes com câncer em estado adiantado apresentam delírio (LAGMAN et al., 2005). Segundo Michalak et al. (2006), durante o processo de caquexia em ratos ocorre degeneração cerebelar através de um mecanismo que envolve TNF- α e proteína quimioatraente de macrófagos-1 (MCP-1). Os animais caquéticos apresentaram atrofia no cerebelo, com perdas e alterações nas células de Purkinje e diminuição da densidade celular da camada granulosa do cerebelo. Estes animais caquéticos ainda apresentaram diminuição da atividade locomotora e distúrbios do equilíbrio.

1.2 BIOQUÍMICA DO ·NO

Conforme Pacher et al. (2007) o óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso com solubilidade moderada na água e presente em todos os vertebrados. Concentra-se em ambientes lipofílicos, como membranas e domínios hidrofóbicos de proteínas. Particularmente, o NO tem somente um elétron desemparelhado o que permite a sua ligação ao ferro nos grupos heme e, assim, ativar a guanilato-ciclase solúvel (sGC) ou diminuir a respiração mitocondrial por se ligar a citocromo-*c* oxidase. O NO pode percorrer distâncias surpreendentes a partir da célula que o produz, antes de ser inativado e difundir-se de maneira ampla intra e intercelularmente sem a necessidade de canais ou receptores. Sua constante de difusão em água encontra-se entre $2-4 \times 10^{-14} \text{ cm}^2/\text{s}$ e em condições fisiológicas é de $3,3 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ (WOOD; GARTHWAITE, 1994). A velocidade molecular média estimada de uma molécula com a massa do NO na temperatura ambiente é de, aproximadamente, 400 m/s. Em solução, sua trajetória é repetidamente alterada por cerca de 10 bilhões de colisões por segundo. Assim, esta molécula pode atravessar várias vezes a membrana de uma ou de várias células durante a sua meia-vida de, aproximadamente, um segundo (PACHER et al., 2007).

Segundo seu comportamento e características químicas, o NO é um intermediário entre o oxigênio molecular (O_2) e o nitrogênio molecular (N_2), e esta condição explica a sua baixa reatividade comparada aos outros radicais livres como o ânion superóxido (O_2^-). Contudo, NO também pode reagir com radicais livres ou como terminador da cadeia de reação da lipoperoxidação. Além disso, este radical pode converter radicais tiol em nitroso-tiol e formar produtos intermediários que podem ser reparados por antioxidantes e regenerar o composto original. Esta característica é a principal responsável pelas propriedades antioxidantes atribuídas ao NO (PACHER et al., 2007).

Segundo Ignarro (2000, p.13), a inativação deste radical depende apenas da sua reatividade não enzimática com outras moléculas. Ele pode reagir com oxi-hemoglobina ou oxi-mioglobina para gerar nitrato (NO_3^-) além de hemoproteínas oxidadas, como meta-hemoglobina ou meta-mioglobina.

Apesar de seu histórico como gás tóxico e poluente ambiental, este gás pode ser produzido durante 80 anos pelos neurônios sem apresentar atividade tóxica, pois, por si só ele não é um agente citotóxico importante. Ele é pouco reativo comparado com os outros radicais livres e reage lentamente com a maioria das moléculas biológicas. Por outro

lado, ele reage rapidamente com radicais superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxil (RO_2^{\cdot}), tirosil, triptofanil, hidroxietil, hidroxil (OH), elétrons (e^-) e anion hidrogênio (H) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Segundo Wink e Mitchell (1998), o $\cdot NO$ pode atuar no organismo de maneira protetora, regulatória ou deletéria conforme as suas reações químicas subseqüentes em condições biológicas particulares. Assim, os seus efeitos biológicos são classificados em duas categorias principais: os efeitos diretos e os indiretos. Os efeitos diretos ocorrem através de reações rápidas o suficiente para acontecer entre o $\cdot NO$ e moléculas biológicas específicas. Já, os efeitos indiretos são mediados por espécies reativas do óxido nítrico (ERON). Geralmente, os efeitos diretos acontecem em concentrações baixas, menores que $1 \mu M$, e medeiam funções fisiológicas, enquanto os efeitos indiretos são significativos em concentrações locais maiores que $1 \mu M$, sendo incluídos na química da nitrosação, oxidação e nitratação além de estarem mais envolvidos em processos deletérios (Figura 2).

Segundo Liaudet et al., (2000), os seus efeitos biológicos diretos podem resultar de interações com metais de transição. A reação deste radical com complexos metálicos tem grande importância biológica, acontece de maneira muito rápida e em baixas concentrações do radical livre (WINK; MITCHELL, 1998).

Segundo Espey et al. (2002), ambos os efeitos, diretos e indiretos participam do metabolismo basal, contudo, os efeitos indiretos podem resultar em estresse oxidativo ou nitrosativo, especialmente em condições de elevado influxo de $\cdot NO$. Conforme Wink e Mitchell (1998), os efeitos indiretos são mediados por reações entre $\cdot NO/O_2$ ou $\cdot NO/O_2^{\cdot-}$. Suas propriedades citotóxicas podem estar na origem de diversas doenças neurodegenerativas onde o fator determinante dos efeitos lesivos deste radical será as reações químicas nas quais participa.

A síntese fisiológica do $\cdot NO$ é realizada principalmente pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), uma enzima especializada que cataliza a oxidação dependente de O_2 do nitrogênio guanidino de L-arginina com a produção de $\cdot NO$ e citrulina (KNOWLES et al., 1989; McCALL et al., 1989). Três isoformas de NOS tem sido caracterizadas. Elas são denominadas NOS I (foi primeiramente caracterizada e isolada a partir de cerebelo de ratos e suínos também denominada nNOS ou NOS neuronal (BREDT; SNYDER, 1989)), NOS II (primeiro detectada em macrófagos e também denominada iNOS ou NOS indutível), e NOS III (primeiro detectada no endotélio e também denominada eNOS ou NOS endotelial). Elas pertencem à superfamília das monooxigenases, assim, são homodímeros e tem homologia com citocromo P-450 redutase na porção C-terminal, região denominada “domínio redutase”.

A porção N-terminal da enzima denominada “domínio oxigenase ou heme” contém o local de ligação para o grupo heme ou substrato de L-arginina. Elas também são produtos de diferentes genes e podem apresentar localização, regulação e sensibilidade a inibidores diferentes, além de propriedades catalíticas características (MONCADA et al., 1991).

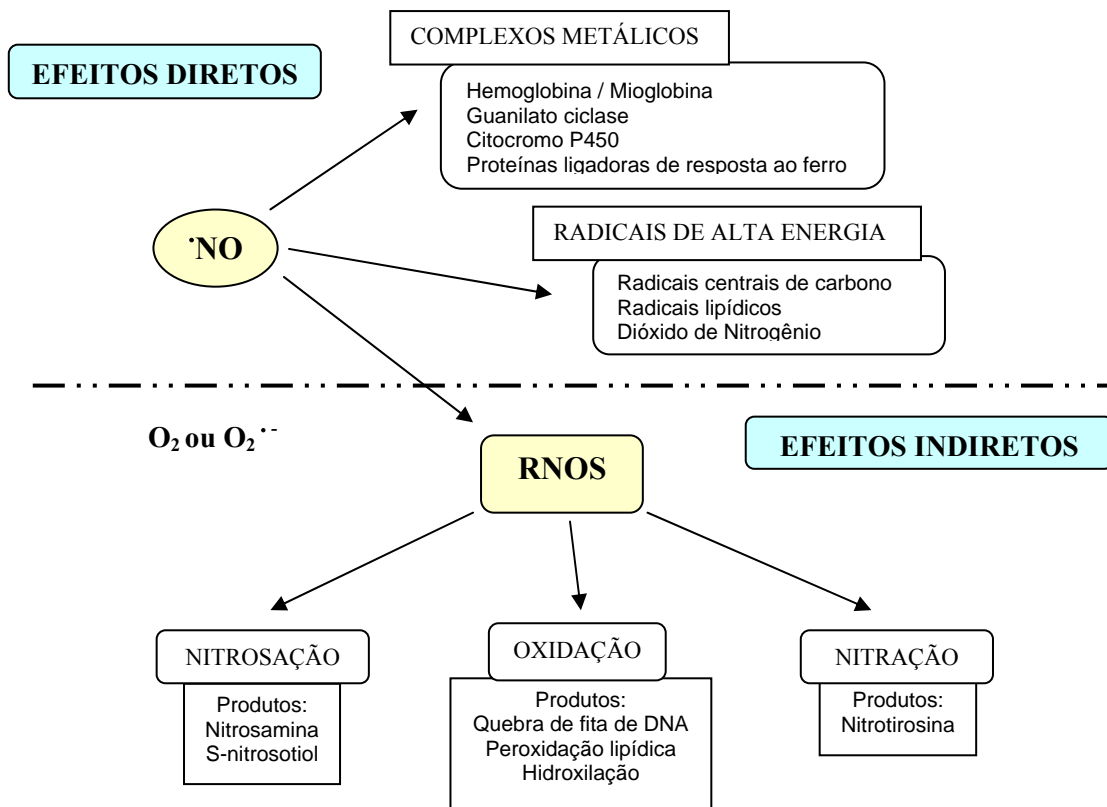


Figura 2 – A química biológica do NO .

Fonte: Wink e Mitchell, 1998.

Alem de oxigênio, L-arginina e de grupo prostético heme, a catálise do NO requer a forma reduzida de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina adenina mononucleotídeo (FMN) bem como tetraidrobiopterina. Todos estes elementos são ligados à enzima. Da mesma forma, o fluxo de elétrons a partir do domínio redutase para o domínio oxigenase é essencial para a catálise do NO e é objeto de uma regulação da ação da enzima *in vivo* (MARTIN et al., 2006).

Todas as isoformas desta enzima contêm uma seqüência semelhante entre o domínio redutase e o domínio oxigenase capaz de se ligar a calmodulina que regula a transferência de elétrons entre estes domínios. As enzimas nNOS e eNOS (são também

denominadas NOS constitutivas (cNOS) por estarem continuamente presentes na célula ligam-se à calmodulina somente após o aumento do Ca^{+2} intracelular ($>500 \text{ nm}$). Em condições normais, a interação com maioria a dos receptores agonistas resulta em influxo de Ca^{+2} ou liberação de Ca^{+2} a partir dos estoques intracelulares com ativação de cNOS. Assim, a natureza transitória destes fluxos determina a produção de NO pelas cNOS e é importante para a sinalização fisiológica através da via NO/cGMP . De outra forma, a NOS indutível recebe este nome porque a produção desta isoforma de NOS pode ser induzida pelas citocinas durante processos inflamatórios. A interação da calmodulina e iNOS pode ocorrer mesmo se a concentração de Ca^{+2} estiver $< 100 \text{ nm}$, o que faz com que esta isoforma não dependa das alterações no Ca^{+2} intracelular. Desta forma, a iNOS é completamente ativa e capaz de gerar grande quantidade de NO no momento em que é sintetizada. De fato, a grande concentração de NO gerado pela iNOS em condições inflamatórias constitui a base do estresse nitrosativo deletério (MARTIN et al., 2006).

Além das isoformas já citadas, em 1997 foi descrita a existência de uma NOS mitocondrial constitutiva que afeta profundamente o funcionamento desta organela celular. Esta enzima foi denominada NOS mitocondrial (mtNOS) (GHAFOURIFAR; RICHTER, 1997). A mtNOS está ativa continuamente e localizada na membrana mitocondrial interna, ainda, é modulada pelo cálcio e regula a respiração mitocondrial, o potencial eletroquímico transmembrana, o gradiente de pH transmembrana, a homeostase do cálcio e a síntese de ATP. (GHAFOURIFAR; SAAVEDRA-MOLINA, 2006).

Por outro lado, o NO também pode ser gerado de maneira independente de NOS. Desta forma, NO e outros óxidos de nitrogênio podem ser gerados a partir de nitrito (NO_2^-) em ambientes ácidos e redutores, como o estômago (LUNDBERG et al., 1994). No pH baixo, o NO_2^- é convertido em ácido nitroso e, subsequentemente, em óxidos de nitrogênio, inclusive NO . Esta via de produção de NO tem sido demonstrada na superfície da pele, onde as glândulas sudoríparas reduzem nitrato (NO_3^-) a NO_2^- e o ambiente ácido converte o NO_2^- a NO (WEITZBERG; LUNDENBERG, 1998). Também há relatos sobre a possibilidade de geração de NO *in vitro* a partir de D- ou L-arginina na ausência de NOS, desde que na presença de H_2O_2 (NAGASE et al., 1997).

Este radical livre pode interagir com diversos alvos intercelulares e desencadear um conjunto de sinais estimulatórios ou inibitórios no organismo. Conforme Calabrese *et al.* (2007), no SNC o NO pode atuar como neuromodulador, neuroprotetor e neurotóxico além de estar associado à função cognitiva, indução e manutenção da plasticidade sináptica, controle do sono, apetite, temperatura corporal, neurosecreção entre outros. Neste

mesmo local, ele deve atuar como uma molécula sinalizadora que modula o metabolismo da glicose em astrócitos e neurônios e estas vias metabólicas mediadas por ele podem determinar a sobrevivência ou morte celular (BOLAÑOS; ALMEIDA, 2006).

Por outro lado, peroxinitrito (ONOO^-) tem sido associado com apoptose em vários tipos celulares como neurônios dopaminérgicos (SHACKA et al., 2006), neurônios primários (BONFOCO et al., 1995), astrócitos (ZHU et al., 2006) e oligodendrócitos (ZHANG et al., 2006). Quando formado em excesso, o ONOO^- causa dano ao DNA e desencadeia a ativação do sistema reparador poli(ADP-ribose) sintetase (PARS), seguido de depleção dos estoques de ATP. Ainda, ONOO^- inibe a aconitase e interfere com a cadeia respiratória mitocondrial (BOLAÑOS; ALMEIDA, 2006).

A atividade neuroprotetora deste gás é essencial para a viabilidade das células em condições patológicas. O papel neuroprotetor do NO neste processo pode ocorrer através da estimulação de expressão e da atividade da Mn-SOD mitocondrial, uma enzima *scavenger* para radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) gerado pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial (SCORZIELLO et al., 2007).

Por outro lado, no SNC o NO também está, fatalmente, envolvido nos diversos processos neurodegenerativos como Doença de Alzheimer, Mal de Parkinson, Doença de Huntington, Esclerose múltipla e processos isquêmicos (GUIX et al., 2005).

1.3 CEREBELO E NO

Segundo Gammie et al. (2000), NO pode atuar como neurotransmissor e neuromodulador no SNC e Sistema nervoso periférico (SNP). Por atuar nas funções neuroendócrinas dos eixos hipotálamo-pituitária-adrenal ele também influencia o aprendizado e memória.

De fato, o NO foi caracterizado primeiro no SNC como um mensageiro intercelular que aumenta os níveis de cGMP seguido de ativação dos receptores de glutamato (GARHWAITE; CHESS-WILLIAMS, 1988). Por sua vez, o aumento dos níveis de cGMP pode modular um grande número de ações do NO nos tecidos neuronais (GARTHWAITE, 1991). A iNOS pode ser induzida em células gliais em um mecanismo inespecífico associado a resposta imune e condições patológicas (MURPHY, 2000). A função da eNOS no SNC está envolvida principalmente na regulação da função vascular, apesar de ser encontrada em

alguns neurônios (DINERMAN et al., 1994) e células da glia (WIENCKEN; CASAGRANDE, 1999). Apesar de as três isoformas de NOS serem encontradas no cérebro, acredita-se que a nNOS é a principal responsável pela sinalização neuronal, plasticidade sináptica, neurotoxicidade, aprendizado e dor (MARTIN et al., 2006).

O cerebelo é essencial na coordenação, adaptação e aprendizado motor. Certamente, esta região do SNC é responsável pelo aprendizado e execução das habilidades motoras especializadas, além de regular o tônus postural e equilíbrio. Da mesma forma, o cerebelo modula os movimentos dos músculos responsáveis pela fala e movimentos oculares e está envolvido no aprendizado e memória (THACH, 1998; KAWATO, 1999). Lesões ou anormalidades no cerebelo podem ser associadas a autismo e déficit cognitivo (GLICKSTEIN, 2006).

A plasticidade sináptica está envolvida em grande parte das funções executadas pelo cerebelo (ITO, 2001). Conforme Citri e Malenka (2008), a plasticidade sináptica consiste em modificações na eficácia ou força da transmissão sináptica de sinapses pré-existentes. Assim, o NO está envolvido no mecanismo de Potenciação de longa duração (*long-term potentiation* - LTP) e na Depressão de longa duração (*long-term depression* - LTD), este último inibe as conexões sinápticas associadas a erros nos movimentos e preserva outras conexões associadas a execução correta destes movimentos (ITO, 2001).

O principal mecanismo de geração de NO neste tecido é aquele associado a nNOS. A síntese de NO no sistema nervoso é predominantemente regulada pelo influxo de Ca^{+2} através de canais dependentes de receptores. Ou seja, na maioria das vezes, a biossíntese de NO no cerebelo é preferencialmente ativada pelo influxo de cálcio através de canais iônicos associados ao receptor glutamatérgico N-metil-D-aspartato (NMDA) (CHRISTOPHERSON et al., 1999). Esta é uma das três classes de receptores cerebrais que podem ser estimulados por aminoácidos excitatórios como o glutamato (BECKMAN, 1991). A nNOS não é estimulada de maneira eficiente através da ativação de outros receptores que geram influxo de cálcio que não sejam receptores NMDA. Diante disso, é sugerida a existência de uma ligação específica entre este receptor e a isoforma desta enzima (CHRISTOPHERSON et al., 1999).

Contudo, o NO livre pode desempenhar dois papéis radicalmente diferentes no sistema nervoso central. Primeiro, ele pode atuar como uma molécula citotóxica na medida em que causa estresse oxidativo e nitrosativo (BROWN; BAL-PRICE, 2003). A morte de células ou o colapso dos gradientes iônicos durante a depleção energética pode causar a liberação maciça de glutamato pelos neurônios, causando um aumento prolongado do Ca^{2+}

intracelular e superprodução de NO através de nNOS (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). Segundo Bonfoco et al., (1995), a neurotoxicidade através da ativação dos receptores NMDA constitui uma via de lesão comum a diversas desordens neurológicas agudas ou crônicas, como isquemia, trauma, epilepsia, Doença de Huntington, Doença de Alzheimer, AIDS, demência, que estão associadas com grande produção de NO por células da glia, fagócitos ou células endoteliais (PACHER et al., 2007).

1.4 NO COMO NEUROPROTETOR

A localização e a concentração de $\cdot\text{NO}$ produzido podem determinar se o seu efeito será benéfico ou deletério (ESPEY et al., 2002). Apesar de ser radical livre, $\cdot\text{NO}$ tem habilidade de atuar como antioxidante e prevenir o estresse oxidativo promovido por EROs e agentes oxidantes derivados dele mesmo, como NO_2 ou o próprio ONOO^- . Conforme Espey et al. (2002), $\cdot\text{NO}$ pode atuar como *scavenger* de EROs formando moléculas menos reativas ou mesmo inócuas. Os mecanismos antioxidantes deste gás envolvem a sua ligação a metais de transição, a radicais livres ou a EROs.

A habilidade deste radical livre em reagir rapidamente através de uma combinação simples entre dois radicais livres permite que ele atue como terminador da cadeia de reação da peroxidação lipídica. De fato, $\cdot\text{NO}$ pode atuar como terminador da reação de lipoperoxidação dependente de O_2 . (Figura 3). Esta reação inicia com a retirada de um átomo de hidrogênio alílico de um ácido graxo poli-insaturado por uma espécie iniciadora ($\cdot\text{X}$) formando um radical lipídico ($\text{Lipídio}\cdot$). Então, este $\text{Lipídio}\cdot$ reage com O_2 para gerar radical alquil-peroxi ($\text{Lipídio-OO}\cdot$) que pode reagir com outro lipídico e propagar a reação. Esta reação pode modificar ou destruir muitos lipídios e prejudicar a integridade das membranas (FUKUTO et al., 2000).

- A) $\text{Lipídio-H} + \cdot\text{X} \rightarrow \text{Lipídio}\cdot + \text{X-H}$
- B) $\text{Lipídio}\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{Lipídio-OO}\cdot$
- C) $\text{Lipídio-OO}\cdot + \text{Lipídio-H} \rightarrow \text{Lipídio-OH} + \text{Lipídio}\cdot \dots \text{etc } \dots$
- D) $\text{Lipídio-OO}\cdot + \cdot\text{NO} \rightarrow \text{Lipídio-OO-NO}$ (cadeia terminada)

Figura 3 – Formação de radical lipídio (A), radical alquil-peroxi (B), propagação da cadeia de peroxidação lipídica dependente de O_2 (C), reação de radical alquil-peroxi com $\cdot\text{NO}$ (D). Fonte: Fukuto, et al., 2000.

Segundo Contestabile e Ciani (2004), no sistema nervoso o $\cdot\text{NO}$ constitui um mensageiro essencial para a sobrevivência de linhagens de células neuronais e neurônios primários em condições neuropatológicas. Uma quantidade fisiológica de $\cdot\text{NO}$ é necessária para manter os neurônios vivos e saudáveis.

Segundo Chiueh (1999), $\cdot\text{NO}$ pode suprimir o estresse oxidativo no cérebro por diversas vias. Por exemplo, ele pode diminuir a geração de $\cdot\text{OH}$ induzida pelo ferro através da reação de Fenton.

Glutathiona reduzida (GSH) é o principal antioxidante tiol das células de mamíferos. No cérebro esta molécula protege contra o estresse oxidativo através de reações não enzimáticas com $\text{O}_2\cdot^-$, $\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{NO}$, ONOO^- ou H_2O_2 (AOYAMA et al., 2008). Contudo, a interação entre $\cdot\text{NO}$ e GSH pode gerar um antioxidante mais potente, S-nitrosoglutathiona (GSNO). GSNO tem sido identificada em células e tecidos que contém NOS e alta concentração de GSH e deve servir como um reservatório intracelular de $\cdot\text{NO}$ no tecido cerebral. Por sua vez, esta molécula é 100 vezes mais potente do que GSH na supressão da geração de $\cdot\text{OH}$ e da peroxidação lipídica (CHIUEH, 1999). De fato, esta molécula é um bom doador de $\cdot\text{NO}$ *in vitro* e *in vivo* (IGNARRO, 2000, p.14).

Segundo Ciani et al. (2002) a inibição prolongada da produção de $\cdot\text{NO}$ induz apoptose neurônios cerebelares e este fenômeno pode ser revertido através de compostos que liberam lentamente o $\cdot\text{NO}$. De fato, a inibição da produção de $\cdot\text{NO}$ por L-NAME em culturas de células granulares cerebelares por 3-4 dias resulta em progressiva morte apoptótica das células diferenciadas. Estas células podem ser recuperadas pela adição ao meio de cultura de doadores de $\cdot\text{NO}$ ou análogos do cGMP. A inibição de guanilato ciclase através de um inibidor específico reproduz o efeito pro-apoptótico da inibição da nNOS, demonstrando o papel essencial do cGMP neste mecanismo.

O receptor NMDA também pode ser modulado através da S-nitrosilação de uma cisteína (Cys 399) na subunidade NR2A. Desta maneira o $\cdot\text{NO}$ diminui a frequência de abertura do canal iônico associado ao receptor e impede a sua ativação excessiva e a exacerbação de desordens neurodegenerativas (CHOI, 2000).

1.5 ESTRESSE OXIDATIVO E NITROSATIVO

Os efeitos indiretos do $\cdot\text{NO}$ podem resultar em estresse oxidativo ou nitrosativo especialmente em condições de produção alta e sustentada. Este estresse oxidativo consiste no envolvimento de grande número de moléculas importantes, como lipídeos, proteínas ou DNA, em reações de oxidação ou nitroação devido ao comprometimento dos mecanismos antioxidantes de defesa celular. As reações entre $\cdot\text{NO}/\text{O}_2$, $\cdot\text{NO}/\text{O}_2^{\cdot-}$ ou HNO/O_2 podem gerar oxidantes (aceptores de elétrons) fortes ou moderados como o NO_2 , um agente oxidante forte que está envolvido na peroxidação lipídica, um dos principais sinais do estresse oxidativo neste local (ESPEY et al., 2002). Particularmente, este radical pode levar a reações de oxidação, nitração ou nitroação conforme os níveis de substrato e de $\cdot\text{NO}$ (ESPEY et al., 2001).

O produto imediato da reação entre $\text{O}_2^{\cdot-}$ e $\cdot\text{NO}$, o ONOO^- , é estável em pH alcalino, no pH fisiológico encontra-se mais na forma de ácido peroxinitroso (HOONO). O HOONO tem potencial para desencadear diversas oxidações, pois é um agente muito mais oxidante do que $\cdot\text{NO}$ ou mesmo $\text{O}_2^{\cdot-}$. Por outro lado, ONOO^- pode ser detoxificado através da reação com o dióxido de carbono (CO_2), uma das mais rápidas reações deste radical devido às características da reação e altas concentrações de CO_2 no ambiente celular (FUKUTO et al., 2000).

Segundo Espey et al. (2000), seus efeitos indiretos ocorrem principalmente em células ou tecidos capazes de gerar altos níveis de $\cdot\text{NO}$ catalisado pela iNOS e durante processos patológicos e toxicológicos. Nestas condições, ele pode desencadear o estresse nitrosativo ou oxidativo através de reações com $\text{O}_2^{\cdot-}$ ou O_2 para formar espécies reativas do óxido nítrico (ERONs) e reações de nitroação ou oxidação. Desta maneira, o estresse nitrosativo acontecerá através de reações mediadas pelo trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), enquanto o estresse oxidativo é mediado por superóxidos e peróxidos, como o ONOO^- (figura 4).

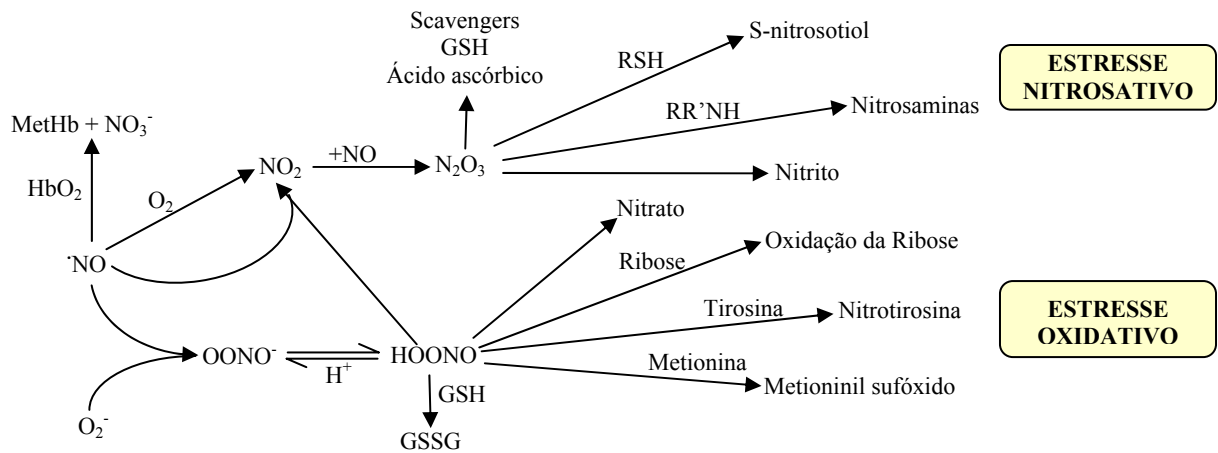


Figura 4 – A química dos efeitos indiretos do ·NO . Fonte: Wink e Mitchell, 1998.

Da mesma maneira, conforme Wink e Mitchell (1998), para compreender o mecanismo da condição patológica não basta saber se este radical inibe uma função celular particular, mas, é necessário entender se isto ocorre por causa de ·NO ou de EROns, ou seja, compreender a química de ·NO naquela concentração e ambiente celular particulares. Primeiramente, ·NO deve ser oxidado para gerar radicais que servem de fonte de íon nitrosonium (NO^+) que é extremamente reativo em um sistema biológico. O estresse nitrosativo pode ocorrer através da nitrosação de grupos tiol, álcool ou amina pelo NO^+ . Um dos mais importantes doadores de NO^+ no sistema biológico é, justamente, N_2O_3 . Predominantemente, N_2O_3 é gerado através da reação de oxidação aeróbica de ·NO ($\text{·NO}/\text{O}_2$), uma reação dependente de altas concentrações do gás no meio. Contudo, este mediador também pode ser gerado a partir de HNO_2 ou pela reação entre $\text{·NO}/\text{O}_2^-$ (ESPEY et al., 2000).

Em síntese, algumas reações de ·NO *in vivo* já estão bem caracterizadas. Assim, a detoxificação deste radical ocorre principalmente através da reação com oxihemoglobina com formação de metahemoglobina e nitrato. Nas condições de acúmulo de ·NO , este radical pode reagir com O_2 para formar N_2O_3 . Fisiologicamente, a geração de $10\mu\text{M}/\text{min}$ de NO *in vivo* gera uma concentração constante de $2\mu\text{M}$, considerando sua meia-vida de um segundo e a detoxificação pela oxihemoglobina (GONZALEZ-ZULUETA et al., 2000, p.697).

De fato, no início de um insulto a grande produção de EROs supera os mecanismos normais de defesa antioxidante do tecido, assim, ocorre estresse oxidativo. Com o aumento dos níveis de ·NO também aumentam as reações de oxidação e nitração com formação de ONOO^- . Neste momento, o ·NO também pode converter o ONOO^- através da

nitrosação. Na seqüência, com o aumento contínuo de $\cdot\text{NO}$ em relação a EROs e ERON, o estresse nitrosativo começa a prevalecer através da via da auto-oxidação do $\cdot\text{NO}$.

Conforme Halliwell e Gutteridge (2007, p.576), alguns mecanismos químicos que acontecem no sistema nervoso tornam este tecido propenso ao estresse oxidativo. Entre eles, a excitotoxicidade do glutamato pode se tornar um ciclo vicioso onde haverá mais liberação de glutamato e geração concomitante de O_2^- e $\cdot\text{NO}$.

Conforme Gonzalez-Zulueta et al. (2000, p.695), a geração excessiva de $\cdot\text{NO}$ pode mediar a lesão neuronal em muitos distúrbios do sistema nervoso. A compreensão das vias através das quais ele causa a morte neuronal é essencial para o desenvolvimento de terapias mais efetivas. O reconhecimento da hipótese de que lesões excitotóxicas são a principal causa de morte neuronal no SNC durante desordens neurológicas constitui um dos maiores avanços na neurologia (MELDRUM; GARTHWAITE, 1990). Segundo Bonfoco et al., (1995), no sistema nervoso, nNOS está estreitamente associada aos receptores NMDA através dos domínios PDZ das duas proteínas e a neurotoxicidade através da ativação deste receptores constitui uma via de lesão comum a diversas desordens neurológicas agudas ou crônicas, como isquemia, trauma, epilepsia, Doença de Huntington, Doença de Alzheimer, AIDS, demência, entre outras. O desacoplamento da interação entre nNOS e PSD-95 provoca atenuação da toxicidade por esta via e prejudica a sinalização excitotóxica pelo Ca^{+2} (SATTLER et al., 1999).

Conforme Halliwell e Gutteridge (2007), as desordens neurodegenerativas podem apresentar diferentes sintomas e afetar partes diferentes do SNC, contudo, elas têm algumas características comuns como: função mitocondrial prejudicada, aumento no dano oxidativo, defeitos no sistema ubiquitina-proteassoma, presença de agregados anormais de proteína, alterações no metabolismo do ferro e envolvimento do mecanismo de excitotoxicidade. A lesão oxidativa pode ser observada através do aumento da peroxidação lipídica e seus produtos finais.

Os resíduos de aminoácidos podem interagir com este radical livre através de reações de nitrosação, para formação de nitrosaminas, grupamentos nitrosotiol e desaminação ou oxidação pelo ONOO^- . Nas condições dos seus efeitos diretos e indiretos, $\cdot\text{NO}$ pode modificar muitos tipos de proteínas, como é exemplo a reação com a enzima guanilato-ciclase. As reações de S-nitrosilação de proteínas para formar grupos S-nitrosotiois pode constituir um mecanismo geral de controle da função protéica. Desta maneira, algumas destas reações participam nos mecanismos de ação fisiológicos deste gás. Entretanto, a modificação de proteínas pode produzir danos no DNA, mitocôndrias e mesmo gerar mais

radicais livres (GONZALEZ-ZULUETA et al., 2000).

Conforme Brown (1999), além da excitotoxicidade, a alta sensibilidade de neurônios ao $\cdot\text{NO}$ é parcialmente devido à inibição da respiração mitocondrial por este radical, um fator importante envolvido em muitos processos neurodegenerativos.

Segundo Pacher et al. (2007), quando o nível de lesão celular induzida pelo ONOO^- supera a possibilidade de reparo o destino desta célula será a morte por necrose ou apoptose. Em diversas condições patológicas cerebrais pode ocorrer a geração simultânea de $\cdot\text{NO}$ e $\text{O}_2^{\cdot-}$ neste tecido. Nestes casos, o $\cdot\text{NO}$ pode ser gerado pelas NOS enquanto o $\text{O}_2^{\cdot-}$ pode surgir a partir da perda de elétrons da mitocôndria, NADPH oxidase, xantina oxidase e sintases desacopladoras. Em quantidades baixas ou moderadas, o ONOO^- pode causar citotoxicidade através da peroxidação lipídica, nitração e oxidação protéica, lesão oxidativa do DNA, ativação de metaloproteinases da matriz e inativação de diversas enzimas celulares.

Segundo Rameau et al. (2003), a ativação dos receptores NMDA promove a ativação da nNOS e, conseqüentemente, acumulação de nitrotirosina e aumento da morte de neurônios. Os níveis de nitrotirosina nas células refletem os níveis de produção de $\cdot\text{NO}$. Também foi constatado neste trabalho um aumento na morte celular nos neurônios com níveis maiores de nitrotirosina.

Segundo Merrill e Van der Veen (2000, p.470), no cérebro encontra-se grande quantidade de ferro divalente livre, enzimas geradoras de EROs e ERNs, fosfolipídios contendo ácidos graxos com muitas ligações além de muito O_2 para manutenção da atividade elétrica. Por outro lado, há níveis diminuídos de glutathiona reduzida (GSH). Diante disso, este tecido constitui um alvo importante para o estresse oxidativo e formação de lipoperóxidos. Diversas ERONs, como $\cdot\text{NO}_2$ e ONOO^- , podem iniciar a lipoperoxidação neste tecido. Geralmente, o processo de lipoperoxidação depende da decomposição mediada por metal de um lipoperóxido pré-existente. Porém, de maneira particular, ONOO^- pode atacar os lipídios em um micro-ambiente onde as moléculas metálicas estão cataliticamente inativas ou ausentes.

O radical peroxil ($\text{LOO}\cdot$) é o elemento central na cadeia da peroxidação lipídica. Este radical pode retirar um hidrogênio de um ácido graxo adjacente para formar um hidroperóxido lipídico e um segundo radical lipídico (figura 5). Este segundo radical pode reagir com O_2 e formar, novamente, $\text{LOO}\cdot$. Desta maneira a cadeia de reação se propaga (HOGG; KALYANARAMAN, 1999).

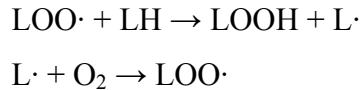


Figura 5 – cadeia de propagação da peroxidação lipídica. Fonte: Hogg e Kalyanaraman, 1999.

Segundo Keynes et al. (2005), a concentração de $\cdot\text{NO}$ no homogenato de células do cerebelo depende da sua taxa de geração e degradação. O consumo deste radical nestas células diminui cerca de 50% com o uso de inibidores da peroxidação lipídica. Ou seja, a peroxidação lipídica neste sistema funciona como um mecanismo que contribui para o consumo de $\cdot\text{NO}$. A peroxidação lipídica é iniciada por uma espécie reativa como $\cdot\text{OH}$. Este radical pode retirar um átomo de hidrogênio de um lipídio insaturado e produzir um radical lipídico ($\text{L}\cdot$). Este $\text{L}\cdot$ pode reagir com O_2 para formar $\text{LOO}\cdot$ e prosseguir a cadeia de reação conforme descrito acima. Contudo, durante os processos inflamatórios além de mediar modificações oxidativas nos lipídios, o ONOO^- pode originar produtos nitrogenados através da nitração. Estes lipídios nitrogenados originam novos sinalizadores para enzimas metabolizadoras de lipídios (RUBBO et al., 2009).

Certamente, no cerebelo, o $\cdot\text{NO}$ pode desempenhar papéis totalmente diferentes como protetor ou neurodegenerativo. Considerando a escassez de trabalhos que associem a produção de $\cdot\text{NO}$ no cerebelo e a lesão lipoperoxidativa neste tecido durante a progressão da caquexia induzida pelo tumor de Walker-256 torna-se justificável a realização deste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Traçar um perfil de produção de $\dot{N}O$ no cerebelo durante a progressão da caquexia induzida por tumor de Walker-256 e relacionar esta produção com a lipoperoxidação;

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar o $\dot{N}O$ no cerebelo de ratos portadores de caquexia induzida por tumor de Walker-256 em diferentes tempos de desenvolvimento da caquexia;
- Avaliar a lipoperoxidação no cerebelo de ratos portadores de caquexia induzida por tumor de Walker-256;
- Relacionar a produção de $\dot{N}O$ e a lesão por lipoperoxidação no cerebelo de ratos com caquexia induzida por tumor de Walker-256;
- Avaliar a capacidade antioxidante (TRAP) no cerebelo de ratos portadores de caquexia induzida por tumor de Walker-256;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos (250 a 350g) fornecidos pelo biotério do Hospital Universitário de Londrina. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno com dimensões de 16x34x40 cm sob o ciclo de claro/escuro de 12 horas. Foram alimentados *ad libitum* com água e alimento completo para ratos (Nutrivial Nutrientes, Curitiba-PR, Brasil) até o início da experimentação. Este projeto encontra-se registrado sob o número 04153, processo de número 28371/2004 na Universidade Estadual de Londrina.

3.2 REAGENTES

Foram utilizados os seguintes reagentes com as respectivas procedências: Aminoguanidina (Sigma); Azul de Tripán (Vetec Química Final); Desferal[®] (mesilato de desferrioxamina, Ciba); Éter etílico (Nuclear); KCl (Reagen Quimibrás); Heparin[®] (heparina sódica 5000 UI, Cristália); H₂O₂ (Synth); LNAME (NG-nitro-L-arginina-metil éster / Fluka); Luminol (5-Amino-2,3-diidro-1,4-ftalazinadiona, Sigma); N₂ (Air Liquide Brasil LTDA); NaCl (Reagen Quimibrás); Na₂CO₃ (Merk); Na₂HPO₄ (Merk); NaH₂PO₄ (Merk); terc-butil hidroperóxido (Sigma).

3.3 MANUTENÇÃO DAS CÉLULAS DO TUMOR DE WALKER-256

As células do tumor de Walker-256 foram mantidas em laboratório através de passagens semanais de 2×10^6 células viáveis para a cavidade abdominal de ratos Wistar adultos machos. Aproximadamente, 6 mL de PBS heparinizado foram inoculados ip para a remoção do líquido ascítico. Após centrifugação 300xg durante 10 min a 4°C, a fração composta por células tumorais foi removida e adicionada a igual volume de PBS. A

viabilidade celular foi determinada em câmara de Neubauer através do método de exclusão pelo azul de Tripan.

3.4 MODELO EXPERIMENTAL DE CAQUEXIA

Foi adotado um modelo experimental de caquexia induzida por câncer que utiliza o tumor de Walker-256, um carcinossarcoma mamário de ocorrência espontânea em ratos Wistar. Este modelo foi realizado conforme descrito por Pereira et al. (2004) com poucas modificações.

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

Também foram realizados grupos controle PBS e *pair-fed*. Ao invés de células de tumor de Walker-256, os animais do grupo controle PBS foram inoculados com 0,5 mL de PBS na porção lateral da pata posterior direita. A ingestão alimentar e peso corporal deste grupo foram registrados diariamente até o 14º dia, quando foram sacrificados e seu cerebelo retirado para os ensaios. Os grupos de animais *pair-fed* foram inoculados com 0,5 mL de PBS na porção lateral da pata posterior direita e alimentados com a mesma quantidade de ração ingerida pelos grupos experimentais com tumor 5 dias (*pair-fed* T5), 10 dias (*pair-fed* T10) e 14 dias (*pair-fed* T14). A ingestão alimentar e peso corporal deste grupo foram registrados diariamente até o dia do sacrifício de cada grupo. Após a decapitação dos animais também foi feita a dissecação cuidadosa e pesagem do tumor nos grupos de animais experimentais T5, T10, T14, T5-AG e T5-LN.

As perdas de massa corpórea (pmc) foram utilizadas como parâmetro para a avaliação do desenvolvimento de caquexia durante os tempos estabelecidos para crescimento tumoral. As pmc foram calculadas através da seguinte equação:

$$\text{PMC (\%)} = \frac{100 \times [\text{MC}_i - \text{MC}_f + \text{MT} + \text{GMC}]}{[\text{MC}_i + \overline{\text{GMC}}]}$$

Onde:

$\overline{\text{GMC}}$: média do ganho de massa do grupo controle nos dias 5, 10 ou 14 após a inoculação de PBS;

MC_f : massa corpórea final do grupo tumor;

MC_i : massa corpórea inicial do grupo tumor;

MT: massa tumoral;

3.5 OBTENÇÃO E PREPARO DOS CEREBELOS

Os cerebelos foram obtidos cirurgicamente após a decapitação destes animais ao fim do tempo previsto para cada grupo de animal. Estes cerebelos foram lavados com solução de KCl 1,15% e estocados em nitrogênio líquido até o momento da análise. Antes de cada ensaio, os cerebelos foram homogeneizados manualmente em um tubo potter com auxílio de um pistilo com solução tampão específica de cada análise em volume suficiente para preparar um homogenato na concentração de 100 mg de cerebelo / mL de solução tampão. Durante os ensaios, estes homogenatos foram diluídos novamente com solução tampão específica de cada análise até a concentração de homogenato previamente padronizada para cada ensaio. Para a técnica de quantificação de NO no cerebelo foi preparado um homogenato na concentração de 1,25 mg/mL. Para a determinação de lipoperoxidação foi preparado um homogenato de 15 mg/ml de cerebelo. Na determinação da capacidade antioxidante do cerebelo foi utilizado homogenato na concentração de 100 mg/mL.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE $\cdot\text{NO}$

A produção de NO foi quantificada no cerebelo nos animais experimentais através da técnica baseada na reação de quimiluminescência iniciada em presença de NO , H_2O_2 e luminol, detectável a 302 nm conforme descrito por Kikuchi et al. (1993), com

algumas alterações.

No banho de gelo e em atmosfera de N_2 , os cerebelos foram suavemente homogeneizados em um tubo potter por aproximadamente 2 minutos. Para isto foi utilizado tampão Na_2CO_3 2 mM, pH 8,5, previamente degaseificado com N_2 , em volume suficiente para obter um homogenato de concentração 100 mg/mL de cerebelo. Após, estes homogenatos foram centrifugados a 1500g por 10 min a 4°C em uma centrifuga Jouan BR4i Multifunction (Thermo Electron Corporation, EUA). Os sobrenadantes foram aliqotados em 4 tubos Eppendofs pequenos onde permaneceram em banho de gelo ao abrigo da luz até o momento da análise. Durante a padronização da técnica foram avaliadas amostras de homogenato de cerebelo nas concentrações de 1,0 a 2,0 mg/ml para escolha da concentração mais adequada para os ensaios. Conforme foi padronizado, para as análises este homogenato na concentração de 100 mg/mL foi diluído a 1,25 mg/mL.

Foi adicionado uma solução composta por Luminol 360 μM / DFX 3 mM a igual volume de solução de H_2O_2 200 mM e 1400 μL de tampão (Na_2CO_3 2 mM). Ambas as soluções foram preparadas com Na_2CO_3 2 mM, pH 8,5, previamente degaseificado com N_2 . A mistura foi incubada à aproximadamente 25°C sob leve agitação durante 5 min. Após este período, esta solução (Luminol 180 μM / DFX 1,5 mM / H_2O_2 200 mM) foi adicionado à amostra de tecido (1,25 mg/mL) através de uma seringa de precisão (SGE, Austrália). 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 650 nm 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 v.7.5 foi utilizado para a construção das curvas de quimiluminescência. Cada amostra foi analisada em quadruplicata.

3.7 AVALIAÇÃO DE LIPOPEROXIDAÇÃO

A lesão lipoperoxidativa foi avaliada no homogenato de cerebelo dos animais experimentais e grupo controle PBS através da reação de quimiluminescência iniciada pelo t-butil hidroperóxido em presença de hidroperóxidos lipídicos, conforme descrito por Gonzalez-Flexa et al. (1991), com algumas modificações.

Foram preparados homogenatos de cerebelo na concentração de 100 mg/mL

com KH_2PO_4 30 mM / KCl 120 mM, pH 7,4. Para isto, os cerebelos foram suavemente homogenizados em um tubo potter com um pistilo em banho de gelo por cerca de 2 min. Após, os homogenatos foram centrifugados a 600xg por 10 min a 4°C em uma centrífuga Jouan BR4i Multifunction (Thermo Electron Corporation, EUA). Os sobrenadantes foram mantidos em banho de gelo ao abrigo da luz até o momento da análise. Para as análises foi adotada a concentração de 15 mg/ml de tecido.

O homogenato foi incubado a 37°C por 5 min e levado ao aparelho onde, após 1 min do acionamento da leitura, a reação foi iniciada com a adição de t-butil hidroperóxido 146,56 mM. O espectro de quimiluminescência foi monitorado durante 60 min pelo luminômetro modelo TD 20/20 (Turner Designs, EUA), com capacidade de detecção em comprimentos de onda de 300 a 650 nm e 68,5% de sensibilidade. O luminômetro foi conectado a um microcomputador através do programa Spreadsheet Interface v1.0, dessa forma, foi realizado o registro da quimiluminescência emitida. Para a construção das curvas de quimiluminescência, foi utilizado o programa Origin v7.5, onde foram analisadas quanto à altura e área. Cada amostra foi analisada em triplicata.

Na avaliação da lipoperoxidação, os resultados das amostras foram corrigidos por mg de tecido através da multiplicação dos valores da curva de emissão pelo fator 102,04.

3.8 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL DO CEREBELO

Segundo Repetto et al. (1996), a técnica de determinação da capacidade antioxidante total do tecido (TRAP) mede os níveis de anti-oxidantes totais de um tecido, principalmente anti-oxidantes de baixa massa molecular. Neste método, utiliza-se o 2,2-azobis (2-amidinopropano diidroclorido) (ABAP), um sistema gerador de radical alcooxil por decomposição térmica, que produz fótons durante a sua oxidação. Estes fótons são amplificados através da reação com luminol e captados pelo luminômetro gerando curvas de emissão (Figura 6). A reação é inibida por análogos da vitamina E e outros antioxidantes solúveis.

A oxidação do ABAP gera uma curva de emissão que surge logo no início da leitura. Com a adição do Trolox (antioxidante análogo da vitamina E) na reação, a oxidação do ABAP foi inibida por um determinado tempo, assim, a curva de emissão aparece

mais tardiamente. O tempo em que o Trolox conseguiu reter a emissão causada pela oxidação do ABAP foi denominado “tempo de indução do Trolox” ($T_{i\text{Trolox}}$). Da mesma forma, a adição do homogenato de cerebello no meio de reação reteve a oxidação do ABAP proporcionalmente à quantidade de antioxidantes de cada amostra. O tempo em que o a amostra conseguiu reter a emissão causada pela oxidação do ABAP foi denominado “tempo de indução da amostra” ($T_{i\text{amostra}}$). A comparação entre $T_{i\text{amostra}}$ e $T_{i\text{Trolox}}$ após a adição de concentrações conhecidas de trolox e homogenato permitiu obter valores de TRAP em relação a 1 μM de Trolox (Figura 6).

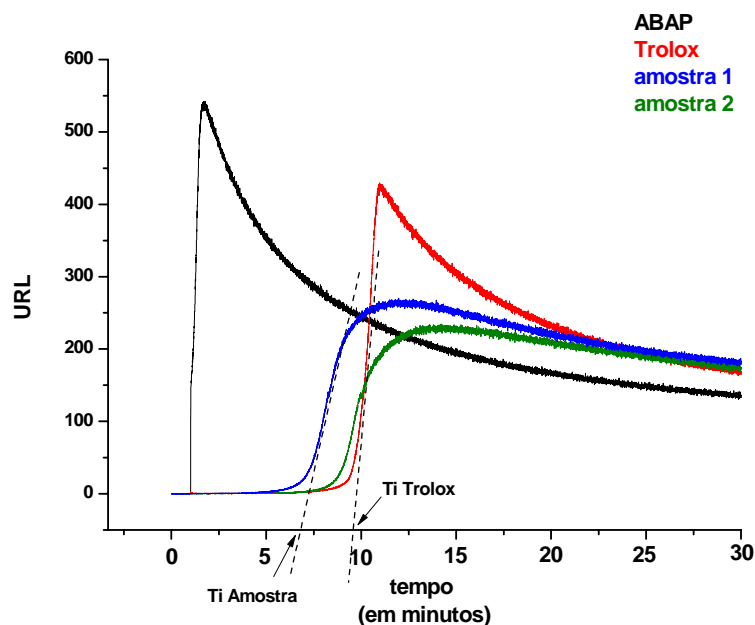


Figura 6 – Gráfico modelo mostrando a emissão de fótons na TRAP pelo tempo de reação em minutos. A inserção das retas representa a fase de indução da reação.

Para obtenção do resultado foi usada a seguinte equação:

$$\text{TRAP } (\mu\text{M Trolox}) = T_{i\text{amostra}} / T_{i\text{Trolox}}$$

Onde:

$T_{i\text{amostra}}$: tempo de indução da amostra;

$T_{i\text{Trolox}}$: tempo de indução provocado pela adição de 1 μM de Trolox

3.9 ANALISE ESTATÍSTICA

Para a quimiluminescência estimulada por H₂O₂-luminol, foi analisado o perfil das curvas por two-way ANOVA e Bonferroni como pós-teste e foi realizada estatística da altura dos picos. A análise estatística da quimiluminescência induzida por t-butil foi realizada pela análise do perfil das curvas através de two-way ANOVA (análise qualitativa) e Bonferroni como pós-teste (análise quantitativa). Na determinação da TRAP foi realizado teste-t para amostras independentes. Os dados foram analisados com o programa GraphPad Instat v3.05 e Origin. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA CAQUEXIA

A tabela 1 mostra a diminuição da porcentagem de ingestão alimentar em relação ao grupo controle dos animais inoculados com células do tumor de Walker-256 e animais tratados com inibidores de NOS. Os valores da massa do tumor e índice de caquexia são apresentados na forma de média \pm erro padrão. Os animais com índice de caquexia igual ou maior do que 10% foram considerados como portadores de caquexia.

Tabela 1 – Parâmetros de perda de massa corpórea em ratos Wistar inoculados com células de tumor de Walker-256 nos dias 5 (T5), 10 (T10) e 14 (T14) após a inoculação e tratados com aminoguanidina (T5AG) e LNAME (T5LN) até o 5º dia da inoculação de tumor de Walker-256.

	T5 (n=4)	T10 (n=4)	T14 (n=4)	T5AG (n=5)	T5LN (n=5)
Diminuição de ingestão alimentar (% em relação ao controle)	10	19	23	28	37
Massa do tumor (mg)	6,19 \pm 2,11	22,05 \pm 5,51 ^a	39,63 \pm 10,34 ^{a,b}	4,72 \pm 0,5	5,7 \pm 0,91
Índice de caquexia (%)	7,88 \pm 0,75	14,09 \pm 1,67 ^a	19,65 \pm 2,87 ^{a,b}	6,11 \pm 1,2	8,15 \pm 1,54

^a p<0,01 em relação ao T5. ^b p<0,001 em relação ao T10.

4.2 QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR H₂O₂-LUMINOL PARA QUANTIFICAÇÃO DE NO NOS CEREBELOS

Para a determinação de NO através da quimiluminescência induzida por H₂O₂-Luminol foi encontrada a concentração de homogenato de cerebelo com o melhor padrão de leitura no luminômetro. A concentração de homogenato adotada para a realização dos ensaios foi aquela cujas emissões foram captadas de maneira excelente pelo luminômetro e, encontrava-se fora da região de “quench”. O fenômeno de “quench” ocorre quando a luz emitida pela reação é absorvida pela própria amostra de tecido e, assim, não pode ser captada pelo luminômetro. A figura 7 representa a quimiluminescência emitida por diferentes

concentrações de homogenato de cerebelo. Para o preparo da amostra foi adotada a concentração de 1,25 mg/mL pois esta concentração de homogenato apresentou a melhor relação dose-resposta. Contudo, a diminuição da emissão entre cada análise da mesma triplicata, correspondente a um intervalo de 3 minutos, foi uma das dificuldades encontradas durante a padronização deste método (figura 8). Para minimizar isto, foi necessário aliquotar os sobrenadantes de homogenato de tecido de modo que a amostra permanecia protegida da luz e do ar e era diluída apenas imediatamente antes do momento da sua análise. Desta forma, o contato da amostra com O₂ e luz, fatores que promovem a diminuição da emissão neste ensaio (IAMAMOTO, 2007), foi insignificante e havendo reprodutibilidade entre as análises da mesma quadruplicata (Figura 9).

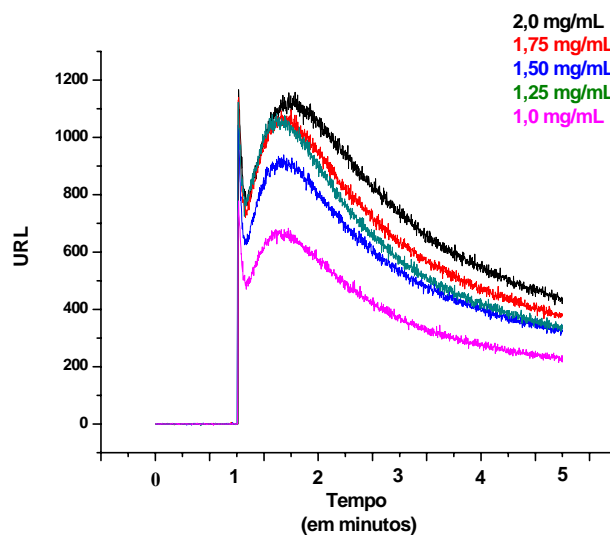


Figura 7 – Quimiluminescência emitida por diferentes concentrações de homogenato de cerebelo de ratos.

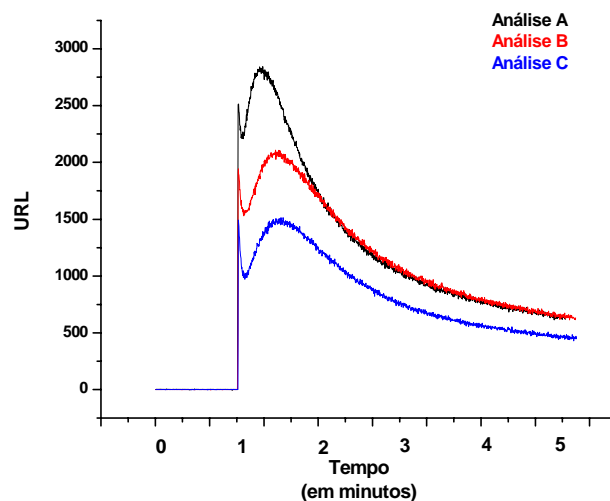


Figura 8 – Diminuição da emissão entre as análises de uma mesma amostra provavelmente relacionada ao tempo de exposição da amostra ao O₂ e luz.

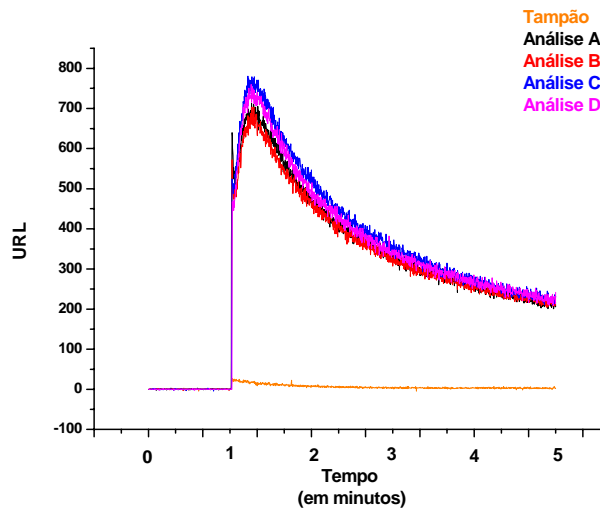


Figura 9 – Reprodutibilidade entre as análises em quadruplicata de um mesmo animal. Ensaio de determinação dos níveis de NO por quimiluminescência induzida por H₂O₂-luminol.

A figura 10 ilustra a quimiluminescência induzida por H₂O₂-luminol para quantificação de NO em cerebelo de ratos controle e inoculados com tumor de Walker-256 por 5, 10 e 14 dias, respectivamente T5, T10 e T14. O nível de NO do grupo T5 ($p < 0,0001$) se mostrou significativamente aumentado em relação ao controle PBS.

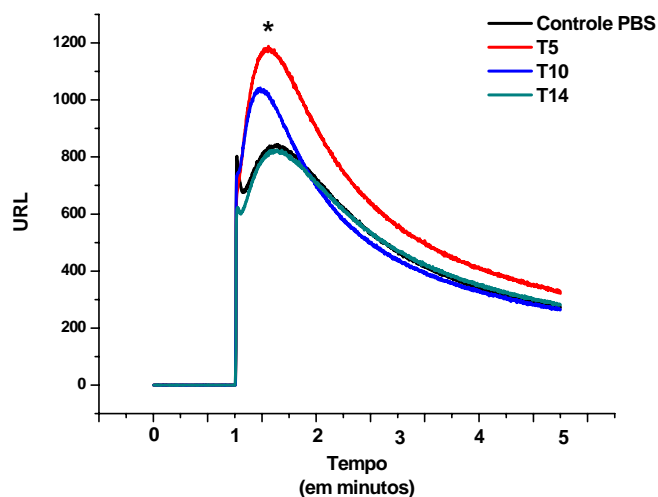


Figura 10 – Efeito da progressão da caquexia na concentração de NO no cerebelo determinada através de quimiluminescência induzida por H₂O₂-luminol em cerebelo de ratos com tumor de Walker-256. * $p < 0,0001$ em relação ao controle PBS.

Os grupos de animais *pair-fed* T5, T10 e T14 (Figura 11) não apresentaram níveis de NO significativamente maiores comparados ao grupo controle PBS. Desta forma, demonstrou-se que a diminuição da ingestão alimentar não interfere no aumento dos níveis de NO no grupo T5.

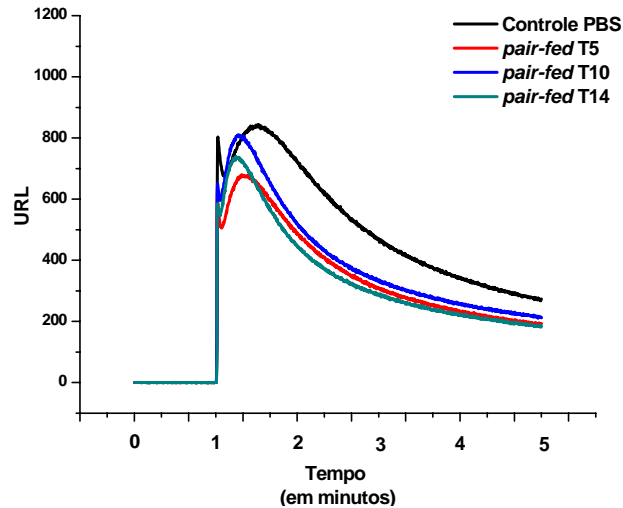


Figura 11 – Determinação dos níveis de NO em animais *pair-fed* T5, T10, T14 e Controle PBS.

A figura 12 ilustra os níveis de NO em cerebelos de animais com tumor de Walker-256 após 5 dias e tratados com inibidores de cNOS (LNAME) e iNOS (Aminoguanidina), respectivamente T5LN e T5AG. As curvas de animais tratados apresentaram diminuição significativa em relação ao grupo T5 ($p < 0,0001$). A inibição com LN é 1300 vezes maior do que com AG, conforme mostrou a relação. Desta forma, a via constitutiva participou mais significativamente para o aumento dos níveis de NO.

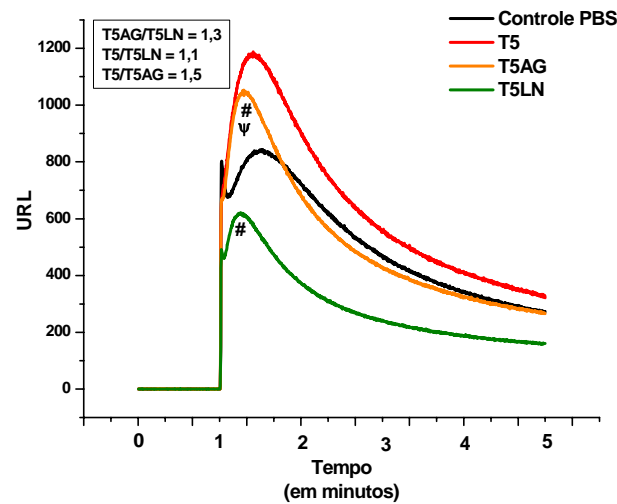


Figura 12 – Efeito dos inibidores de NOS sobre o nível de NO determinado através de quimiluminescência iniciada por H_2O_2 -luminol em cerebelo de ratos inoculados com tumor de Walker-256 por 5 dias (T5). # $p < 0,0001$ em relação ao T5. □ $p < 0,0001$ em relação ao T5LN.

4.3 QUIMILUMINESCÊNCIA INDUZIDA POR TERT-BUTIL PARA DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE HIDROPERÓXIDOS LIPÍDICOS NOS CEREBELOS.

A figura 13 representa a quimiluminescência emitida por diferentes concentrações de homogenato de cerebelo. Para o preparo da amostra foi adotada a concentração de 15 mg/mL. Esta concentração do homogenato foi padronizada para a realização dos ensaios por se encontrar dentro da faixa de linearidade desta curva de concentração (Figura 14). O potencial deste tecido em responder ao estresse oxidativo nesta concentração específica de homogenato foi verificado através da oxidação do cerebelo com 2,2-azo-bis-2-amidinopropano diidrocloreto (ABAP). A incubação do cerebelo com uma solução deste agente fortemente oxidante na temperatura de 37 °C por 30, 60 e 90 minutos promove o deslocamento do pico da curva de emissão para a esquerda e aumento na área e pico. Isto indica que os níveis de antioxidantes na amostra diminuem e a lipoperoxidação tecidual aumenta proporcionalmente ao tempo de exposição ao estresse oxidativo. Este fenômeno é detectado através desta técnica nas condições padronizadas de concentração de homogenato (Figura 15).

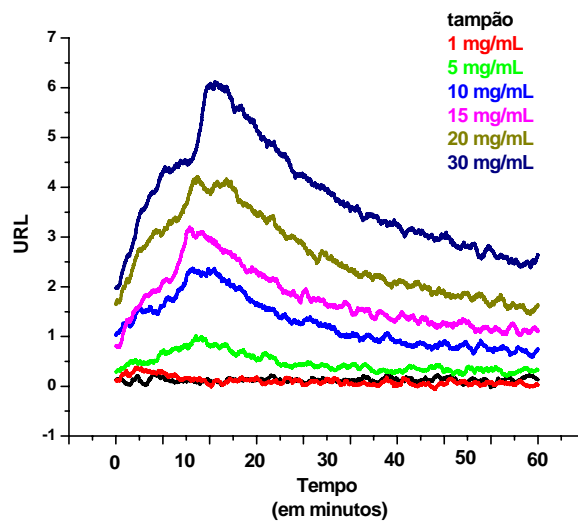


Figura 13 – Quimiluminescência emitida por diferentes concentrações de homogenato de cerebello de ratos Wistar.

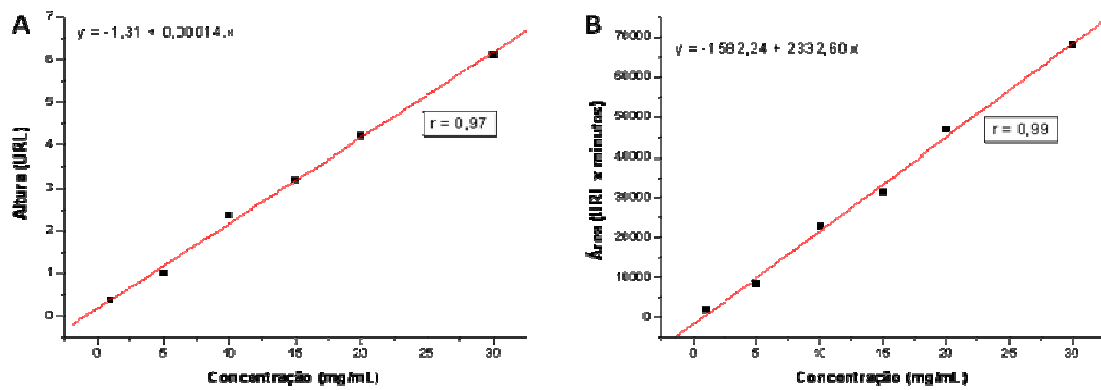


Figura 14 – Correlação entre os parâmetros concentração do homogenato de cerebello e altura (A) ou área (B) da emissão da quimiluminescência induzida por t-butil.

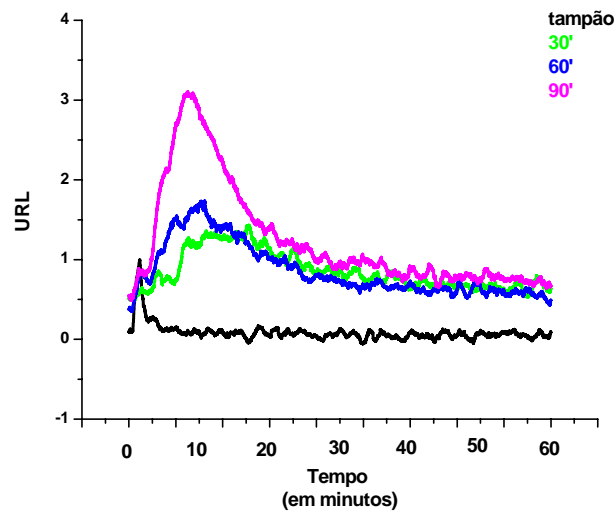


Figura 15 – Quimiluminescência emitida por cerebelos oxidados com ABAP por 30, 60 e 90 minutos.

A figura 16 ilustra a quimiluminescência iniciada por t-butil hidroperóxido emitida pelos grupos experimentais, refletindo os níveis de hidroperóxidos lipídicos formados durante a caquexia induzida por tumor de Walker-256. Os dados representam as médias de 40 pontos extraídos da curva original e a comparação foi feita pelo teste two-way ANOVA. As curvas dos grupos T5, T10 e T14 mostraram-se significativamente maiores ($p < 0,0001$) em relação ao grupo controle.

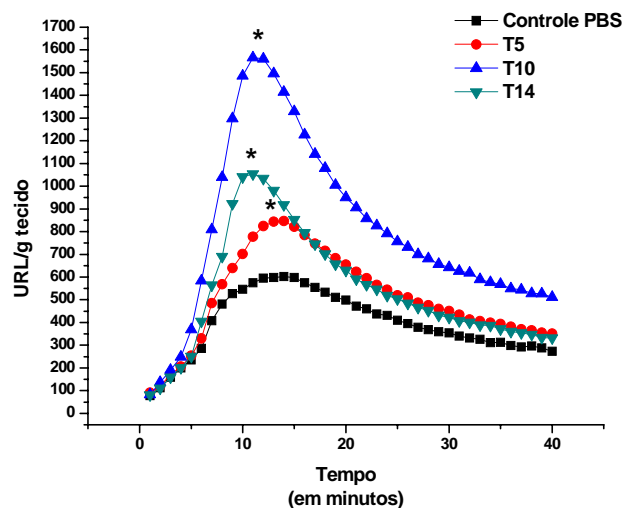


Figura 16 – Efeito da caquexia nos níveis de hidroperóxidos lipídicos determinados por quimiluminescência induzida por t-butil em cerebelos de ratos inoculados com células de tumor de Walker-256 após 5, 10 e 14 dias. $*p < 0,0001$ em relação ao controle PBS.

A figura 17 ilustra os níveis de lipoperóxidos em cerebelos de animais com tumor de Walker-256 após 5 dias tratados com inibidores de cNOS (LNAME) e iNOS (Aminoguanidina), respectivamente T5LN e T5AG. Os grupos T5LN e T5AG apresentaram curvas significativamente menores do que o grupo T5.

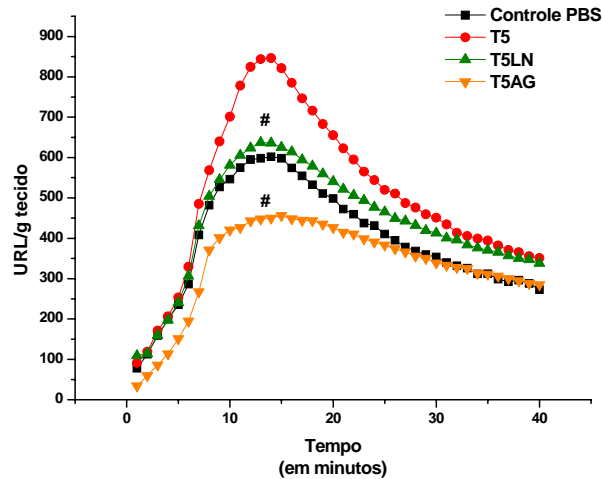


Figura 17 – Efeito dos inibidores de NOS sobre os níveis de lipoperóxidos determinados através de quimiluminescência iniciada por t-butil em cerebelo de ratos inoculados com células de tumor de Walker-256 após 5 dias (T5). # $p < 0,0001$ em relação ao T5.

4.4 MEDIDA DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TRAP)

Este método avalia o nível de antioxidantes solúveis de baixo peso molecular presente no tecido. Não houve alterações significativas na TRAP no 5º dia da inoculação do tumor. Contudo, os níveis de TRAP (Figura 18) apresentam-se significativamente diminuídos em relação ao grupo controle PBS no 10º dia da inoculação do tumor ($p < 0,01$). No grupo T14 a TRAP permanece significativamente diminuída ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle PBS.

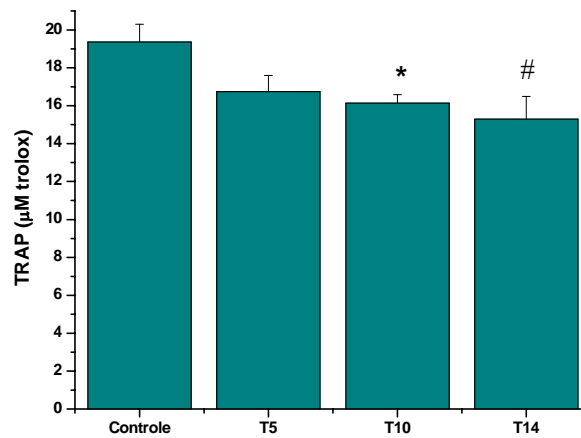


Figura 18 – TRAP dos homogenatos de cerebello de ratos inoculados com tumor de Walker-256 após 5, 10 e 14 dias, respectivamente T5, T10 e T14. O grupo controle PBS foi inoculado com PBS. Estes resultados representam média \pm erro padrão. Os valores de p foram determinados pelo teste-t para amostras independentes. * $p < 0,01$ em relação ao controle. # $p < 0,5$ em relação ao controle.

5 DISCUSSÃO

O tumor de Walker-256 é um modelo bem estabelecido de indução da caquexia, que progride até 14 dias da sua implantação causando uma série de alterações metabólicas no indivíduo. Neste modelo experimental a perda de massa muscular dos animais é evidente, e muitos trabalhos sugerem a participação do estresse oxidativo na ativação da via ubiquitina-proteassoma de proteólise de tecido muscular. Entretanto, poucos estudos relacionam o estresse oxidativo ou nitrosativo no SNC. Por sua vez, o cerebelo constitui uma parte do SNC pouco explorada quanto a sua resposta a caquexia. Contudo, pacientes em estágio avançado de caquexia apresentam alteração na cognição, bem como incoordenação dos movimentos e equilíbrio. Desta forma, é importante a compreensão da lesão das células cerebelares por mecanismos oxidativos e nitrosativos.

O estresse oxidativo é o desequilíbrio entre a produção de EROs e as defesas antioxidantes. Certamente este fenômeno pode ocasionar a diminuição de defesas antioxidantes ou a geração de mais EROs ou ERNs, ou ambos. O acúmulo de lipoperóxidos no tecido constitui um sinal do estresse oxidativo local (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O sistema nervoso está exposto ao estresse oxidativo devido às suas características teciduais. De fato, conforme já foi dito, diversas patologias neuronais envolvem o estresse oxidativo. Além disso, as características da geração de NO no sistema nervoso central, através dos receptores NMDA, nNOS e glutamato, torna este tecido especialmente vulnerável ao estresse oxidativo e nitrosativo mediado por este radical livre (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Um dos principais efeitos deletérios da peroxidação lipídica é a diminuição da fluidez da membrana, facilitando as trocas entre os lados da sua bicamada lipídica. Isto promove o aumento de fendas por onde passam substâncias que antes não passariam facilmente, como o Ca^{2+} , além de causar dano a proteínas da membrana, inativando enzimas e canais iônicos. Da mesma forma, isto pode desencadear um ciclo entre ativação de nNOS pelo Ca^{2+} e excitotoxicidade do glutamato levando a célula a morte (RAMEAU et al., 2003).

A atuação do estresse oxidativo no sistema nervoso foi investigada em cerebelo, córtex e hipocampo de ratos inoculados com tumor de Walker-256 através da determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARs), atividade de superóxido dismutase (SOD) e catalase. A presença do tumor causou aumento de TBARs e

diminuição da atividade de catalase nestas regiões do SNC. Assim, estes resultados indicam o estresse oxidativo causado no cérebro por este tumor (FREITAS, 2001).

Neste trabalho foram avaliados os cerebelos em 3 momentos da progressão da caquexia após a inoculação do tumor de Walker-256 por 5, 10 e 14 dias, respectivamente T5, T10 e T14. Estes tecidos foram analisados em relação à produção de $\dot{\text{N}}\text{O}$, lipoperoxidação e capacidade antioxidante. Além disso, foi verificado o efeito da inibição da geração de $\dot{\text{N}}\text{O}$ pela via constitutiva e indutível nos níveis de lipoperoxidação.

Os grupos T10 e T14 apresentaram índice de caquexia (Tabela 1) compatível com um estado caquético bem estabelecido. As alterações da síndrome caquexia-anorexia podiam ser facilmente constatadas nestes animais. Os animais do grupo T5 apresentaram índice de caquexia menor de 10% (Tabela 1) uma vez que a caquexia estava na fase inicial. Estes resultados estavam dentro do esperado para este grupo de animais neste modelo de caquexia.

De acordo com o ensaio de quimiluminescência induzida por H_2O_2 -luminol, os níveis de $\dot{\text{N}}\text{O}$ estavam significativamente aumentados no T5. No grupo T10 e T14 os níveis de $\dot{\text{N}}\text{O}$ não se mostraram significativamente diferentes dos níveis do grupo controle. O uso de inibidores LNAME e AG mostrou-se eficaz em diminuir significativamente os níveis de $\dot{\text{N}}\text{O}$ até o 5º dia da inoculação do tumor.

Isto indica que tanto a via constitutiva quanto a via indutível estão envolvidas na geração de $\dot{\text{N}}\text{O}$ pelo cerebelo. Com a utilização de LNAME a diminuição da produção de $\dot{\text{N}}\text{O}$ foi 1300 vezes mais acentuada do que com a utilização de AG. Isto pode sugerir a nNOS como o principal favorecedor da produção de $\dot{\text{N}}\text{O}$ no cerebelo. Quanto ao perfil da produção de $\dot{\text{N}}\text{O}$ pode-se evidenciar a alta produção $\dot{\text{N}}\text{O}$ logo no início do desenvolvimento da caquexia (T5), seguido por um declínio progressivo desta produção. A diminuição de $\dot{\text{N}}\text{O}$ no 14º dia de caquexia pode indicar a diminuição de células viáveis em relação ao controle. Este dado pode ser confirmado com técnicas de histopatologia, utilizando marcadores de apoptose.

O aumento de $\dot{\text{N}}\text{O}$ no 5º dia é seguido pelo aumento de lipoperoxidação do cerebelo (Figura 16). Esta lipoperoxidação evidenciada no início da caquexia parece ser dependente da produção de $\dot{\text{N}}\text{O}$ e, provavelmente, de seus produtos de reação com radicais livres. Isto pode ser confirmado com a utilização dos inibidores LNAME e AG que levaram à diminuição da lipoperoxidação neste momento da caquexia (Figura 17). Entretanto, a continuidade da lesão nos tempos T10 e T14 não parece ter relação com a produção de $\dot{\text{N}}\text{O}$.

Entre os radicais gerados a partir do $\dot{\text{N}}\text{O}$, ONOO^\cdot é o principal mediador do

estresse oxidativo no cérebro. Este radical é um oxidante poderoso e pode interagir com diversas moléculas para causar nitração de tirosina, oxidação de grupos tiol, peroxidação lipídica ou quebra do DNA, além de depletar as reservas antioxidantes (ESPEY et al., 2002). O ONOO⁻ é relativamente estável e pode se difundir por alguns micrometros na sua meia-vida biológica. Também pode atravessar as membranas e suportar milhões de colisões com agentes redutores até reagir com grupamentos ferro-enxofre ou outros onde ele é mais reativo. Devido a esta seletividade relativa, o ONOO⁻ pode se tornar mais tóxico do que outros agentes mais oxidantes do que ele, como o [•]OH (GONZALEZ-ZULUETA et al., 2000, p.697).

Quanto à capacidade antioxidante total do cerebelo, o perfil encontrado foi a diminuição desta atividade a partir do 10º dia da progressão da caquexia. Porém, fica claro que, apesar de não haver alteração no comportamento antioxidante deste tecido em T5, neste grupo de animais já existe lipoperoxidação ocasionada pelo aumento da produção de [•]NO.

Conforme Ghiselli et al. (2000), a medida da TRAP é um método sensível e confiável na detecção de alterações do estresse oxidativo in vivo que não pode ser avaliado através da medida de um único antioxidante. Segundo Evelson et al. (2001), os valores de TRAP de homogenatos de cérebro, fígado, coração e rins de ratos são utilizados para avaliar se o método é satisfatório para a determinação da condição anti-oxidante dos tecidos em situações de estresse. Os valores foram comparados com a intensidade de luminescência obtida quando os homogenatos foram submetidos ao estresse oxidativo por t-butil hidroperóxido. Desta forma foi observado que o aumento da susceptibilidade do tecido ao estresse oxidativo está correlacionado com a diminuição das defesas anti-oxidantes. Além disso, foi observado que a GSH é o principal antioxidante que contribui para estes níveis de TRAP, seguida de ácido úrico, ácido ascórbico, bilirrubina e tocoferol.

A liberação de fatores neurotóxicos pela microglia tem um papel desencadeador no desenvolvimento de desordens neurodegenerativas. Após ativação, microglia e astrócitos produzem diversos fatores como TNF- α , EROs e ERNs e, especialmente, NO que contribuem para neurodegeneração (PANNU; SINGH, 2006). Neste momento, o estado redox determinado pela proporção GSH/GSSG celular é fundamental na sinalização das funções ou morte celular (SCHAFER; BUETTNER, 2001). O tratamento de neurônios corticais primários com NO resulta em perda nos níveis de glutathione correlacionado com o aumento da morte celular e prejuízo na função mitocondrial (GEGG et al., 2003).

Os dois inibidores de NOS utilizados neste trabalho promoveram a diminuição significativa da geração de [•]NO no cerebelo dos animais T5. Assim, as duas vias

enzimáticas, constitutiva e induzível, devem participar desta geração precoce de NO na caquexia.

Da mesma forma, o aumento da lipoperoxidação a partir de T5 indica a existência de estresse oxidativo no tecido no início do processo caquético. De fato, comparados ao grupo controle, os níveis de lipoperoxidação estavam aumentados nos três tempos de evolução do tumor analisados, T5, T10 e T14. A inibição da geração de NO pela iNOS e cNOS promoveu a diminuição significativa dos níveis de lipoperoxidação em animais T5. Assim, este radical livre deve contribuir para a lesão lipoperoxidativa nesta fase do crescimento do tumor.

Em um sistema de lipossomos, NO sozinho não induz lipoperoxidação. Contudo, se estes lipossomos forem expostos a EROs geradas pela XO, a presença de NO no meio de reação pode estimular ou inibir a lipoperoxidação conforme a concentração de cada radical livre. Em concentrações baixas, NO funcionará como um potente terminador da cadeia de peroxidação lipídica. Seus efeitos pró-oxidantes ocorrerão em concentrações aumentadas de NO e EROs no meio de reação, principalmente, através da formação de ONOO⁻. Certamente, há uma relação direta entre lipoperoxidação e formação de ONOO⁻ (RUBBO et al., 1994). Como foi observado neste trabalho, o aumento de NO gera elevação da lesão celular lipoperoxidativa.

Segundo Fukuto et al. (2000), este radical tem a habilidade de reagir rapidamente através da combinação radical-radical com espécies possuindo elétrons desemparelhados como NO₂, O₂ e O₂⁻. A sua reação com outros radicais livres pode gerar NO₂, NO⁻ ou ONOO, estes agentes são mediadores do estresse oxidativo. Conforme Miranda et al. (2000, p.48), quando a taxa de formação de O₂⁻ e NO é proporcional não ocorre estresse oxidativo devido aos mecanismos de defesa antioxidante. Contudo, no início de um insulto, a geração de EROs pode superar as defesas antioxidantes e causar efeitos lesivos, como observado neste trabalho pelos níveis normais da TRAP no T5 e lipoperoxidação neste mesmo tempo de indução da caquexia.

Nos animais do grupo T10 não foi observado alteração significativa nos níveis de NO em relação ao grupo controle. Por outro lado, a TRAP destes animais apresentou-se significativamente diminuída em relação ao controle. Ou seja, as defesas antioxidantes já não sustentam mais o equilíbrio do estado redox da célula. Nestas condições, a diminuição do nível de NO deve-se, provavelmente, ao consumo deste radical através de reações com outras espécies reativas. Segundo Keynes et al. (2005), a concentração de NO no homogenato de células do cerebelo depende da sua taxa de geração e degradação. O consumo

deste radical nestas células diminui cerca de 50% com o uso de inibidores da peroxidação lipídica. Ou seja, a peroxidação lipídica neste sistema funciona como um mecanismo que contribui para o consumo de NO.

Os animais do grupo T14 apresentaram níveis significativamente diminuídos de NO e TRAP comparados ao grupo controle. Por outro lado, a lipoperoxidação mostrou-se significativamente maior se comparada ao grupo controle. Neste grupo o estado caquético estava mais pronunciado. Este estado avançado de caquexia pode indicar uma resposta metabólica anormal e até mesmo não verdadeira, pois todos os sistemas envolvidos na homeostasia do animal estão comprometidos.

Neste estudo de progressão da caquexia em animais com tumor de Walker-256 pode-se sugerir que o estresse oxidativo inicia antes da caquexia estar estabelecida no tempo de 5 dias após a implantação das células tumorais. Os níveis de óxido nítrico também aumentam no início do processo caquético e diminuem até níveis abaixo do grupo controle no estágio final.

O perfil da produção de NO pelo cerebelo caracteriza-se pelo aumento significativo no 5º dia e diminuição nos dias subsequentes até o 14º dia. O aumento do NO é devido à ativação das enzimas óxido nítrico sintase constitutiva e indutível. Este aumento de NO pode ser o principal responsável pela lipoperoxidação observada no 5º dia de caquexia. Entretanto a lipoperoxidação nos demais dias de progressão da síndrome caquética parece não ser causada pelos produtos de reação do NO. Somado a isto, a capacidade antioxidante total do cerebelo passa a estar comprometida a partir do 10º dia, entretanto, no 5º dia, apesar de as defesas estarem nos níveis normais, ela não é capaz de conter a lipoperoxidação ocasionada pela elevação do NO.

6 CONCLUSÃO

No modelo experimental de caquexia induzida por tumor de Walker-256, houve o aumento da geração de $\dot{N}O$ pelo cerebelo no início do desenvolvimento da caquexia, evidenciado pela elevação de $\dot{N}O$ no 5º dia e retorno aos níveis normais de $\dot{N}O$ no 10º e 14º dia, fase terminal do processo. Com o uso de LNAME e AG, inibidores de cNOS e iNOS respectivamente, a geração de $\dot{N}O$ até o 5º dia da inoculação das células tumorais foi inibida, sugerindo que ambas as vias devem contribuir para este aumento dos níveis de $\dot{N}O$. Este aumento precoce da geração de $\dot{N}O$ até o 5º dia da progressão da caquexia foi acompanhado pelo aumento dos níveis de lipoperoxidação no cerebelo. Contudo, a lipoperoxidação manteve-se elevada nos grupos T10 e T14, alcançando os maiores níveis até o 10º dia após a inoculação das células tumorais. O uso dos inibidores de NOS foi capaz de diminuir significativamente os níveis de lipoperoxidação do cerebelo no grupo T5, evidenciando a participação do $\dot{N}O$ neste mecanismo de lesão celular por lipoperoxidação. A capacidade antioxidante do cerebelo apresentou-se normal até o 5º dia de evolução da caquexia, contudo, apresentou-se diminuída nos grupos T10 e T14. O estresse oxidativo no cerebelo ocorre já na fase inicial do processo caquético conforme pode ser observado através da elevação dos níveis de peroxidação lipídica no grupo T5. Contudo, no grupo T5 as defesas antioxidantes ainda estão normais, por outro lado, nos grupos T10 e T14 a capacidade antioxidante do cerebelo apresentou-se diminuída. Apesar de normal, a TRAP no 5º dia não foi capaz de conter a lipoperoxidação causada pelos produtos de reação do $\dot{N}O$. Isto foi compatível com os altos níveis de lipoperoxidação encontrados nestes dois momentos da evolução da caquexia e com a pré-disposição do cerebelo ao estresse oxidativo.

REFERÊNCIAS

AOYAMA, K.; WATABE, M.; NAKAKI, T. Regulation of Neuronal Glutathione Synthesis. *Journal of Pharmacological Sciences*, v.108, p.227-238, 2008.

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

BARACOS, V.E. Cytokines and the Pathophysiology of Skeletal Muscle Atrophy. In: HOFBAUER, K.G.; ANDKER, S.D.; INUI, A.; NICHOLSON, J.R. *Pharmacotherapy of Cachexia*. Boca Raton-FL: Taylor & Francis Group, 2006, p.101-114.

BECKMAN, J.S. The double-edged role of nitric oxide in brain function and superoxide-mediated injury. *Journal of Developmental Physiology*, v.15, p.53-59, 1991.

BOLAÑOS, J.P.; ALMEIDA, A. Modulation of Astroglial Energy Metabolism by Nitric Oxide. *Antioxidants & Redox Signaling*, v.8, n.5 e 6, p.955-965, 2006.

BONFOCO, E.; KRAINIC, D.; ANKARCORONA, M.; NICOTERA, P.; LIPTON, S.A. Apoptosis and necrosis: Two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with *N*-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.92, p.7162-7166, Ago. 1995.

BREDT, D.S.; SNYDER, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.86, p.9030-9033, Nov. 1989.

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

BROWN, G.C.; BAL-PRICE, A. Inflammatory Neurodegeneration Mediated by Nitric Oxide, Glutamate, and Mitochondria. *Molecular Neurobiology*, v.27, n.3, p.325-355, 2003.

CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELLI, E.; BUTTERFIELD D.A.; STELLA, A.M.G. Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity. *Nature Reviews*, v.8, p.766-775, Out. 2007.

CHIUEH, C.C. Neuroprotective Properties of Nitric Oxide. *Annals New York Academy of Sciences*, p.301-311, 1999.

CHOI, Y.B.; TENNETI, L.; LE, D.A.; ORTIZ, J.; BAI, G. Molecular basis of NMDA receptor-coupled ion channel modulation by S-nitrosylation. *Nature Neuroscience*, v.3, n.1, Jan. 2000.

CHRISTOPHERSON, K.S.; HILLIER, B.J.; LIM, W.A.; BREDT, D.S. PSD-95 Assembles a Ternary Complex with the N-Methyl-D-aspartic Acid Receptor and a Bivalent Neuronal NO Synthase PDZ Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, v.274, n.39, p.27467-27473, 1999.

CIANI, E.; VIRGILI, M.; CONTESTABILE, A. Akt pathway mediates a cGMP-dependent survival role of nitric oxide in cerebellar granule neurones. *Journal of Neurochemistry*, v.81, p.218-228, 2002.

CITRI, A.; MALENKA, R.C. Synaptic Plasticity: Multiple Forms, Functions, and Mechanisms. *Neuropsychopharmacology Reviews*, v.33, p.18-41, 2008.

CONTESTABILE, A.; CIANI, E. Role of nitric in the regulation of neuronal proliferation, survival and differentiation. *Neurochemistry International*, v.45, p.903-914, 2004.

DELANO, M.J.; MOLDAWER, L.L. The Origins of Cachexia in Acute and Chronic Inflammatory Diseases. *Nutrition in Clinical Practice*, v.21, p.68-81, Fev. 2006.

DINERMAN, J.L.; DAWSON, T.M.; SCHELL, M.J.; SNOWMAN, A. Endothelial nitric oxide synthase localized to hippocampal pyramidal cells: implications for synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.91, p.4214-4218, Maio 1994.

ESPEY, M.G.; MIRANDA, K.M.; FEELISCH, M.; FUKUTO, J.; GRISHAM, M.B.; VITEK, M.P.; WINK, D.S. Mechanisms of Cell Death Governed by the Balance between Nitrosative and Oxidative Stress. *Annals New York Academy of Sciences*, p.209-221, 2000.

ESPEY, M.G.; MIRANDA, K.M.; THOMAS, D.D.; WINK, D.A. Distinction between Nitrosating Mechanisms within Human Cells and Aqueous Solution. *The Journal of Biological Chemistry*, v.276, n.32, p.30085-30091, 2001.

ESPEY, M.G.; MIRANDA, K.M.; THOMAS, D.D.; XAVIER, S.A.; CITRIN, D.; VITEK, M.P.; WINK, D.A. A Chemical Perspective on the Interplay Between NO, Reactive Oxygen Species, and Reactive Nitrogen Oxide Species. *Annals New York Academy of Sciences*, v.962, p.195-206, 2002.

EVELSON, P.; TRAVACIO, M.; REPETTO, M.; ESCOBAR, J.; LLESUY, S.; LISSI, E.A. Evaluation of Total Reactive Antioxidant Potential (TRAP) of Tissue Homogenates and Their Cytosols. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.388, n.2, p.261-266, Abr. 2001.

FREITAS, J.J.S. Walker-256 tumor growth causes oxidative stress in rat brain. *Journal of Neurochemistry*, v.77, p.655-663, 2001.

FUKUTO, J.M.; CHO, J.Y.; SWITZER, C.H. The Chemical Properties of Nitric Oxide and Related Nitrogen Oxides. In: IGNARRO, L.J. *Nitric Oxide - Biology and Pathobiology*. San Diego: Academic Press, 2000, Chapter 2, p.23-40.

GAMMIE, S.C.; DAWSON, V.L.; NELSON, R.J. Influence of Nitric Oxide on Neuroendocrine Function and Behavior. In: IGNARRO, L.J. *Nitric Oxide - Biology and Pathobiology*. San Diego: Academic Press, 2000, Chapter 27, p.429-438.

GARTHWAITE, J. Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *TINS*, v.14, n.2, p.60-67, 1991.

GARTHWAITE, J.; CHESS-WILLIAMS, R. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. *Nature*, v.336, p.385-388, 1988.

GEGG, M.E.; BELTRAN, B.; SALAS-PINO, S.; BOLANOS, J.P.; CLARK, J.B.; MONCADA, S.; HEALES, S.J.R. Differential effect of nitric oxide on glutathione metabolism and mitochondrial function in astrocytes and neurons: implications for neuroprotection/neurodegeneration?. *Journal of Neurochemistry*, p.1-10, 2003.

GHAFOURIFAR, P.; RICHTER, C. Nitric oxide synthase activity in mitochondria. *FEBS Letters*, v.418, p.291-296, 1997.

GHAFOURIFAR, P.; SAAVEDRA-MOLINA, A. Functions of Mitochondrial Nitric Oxide Synthase. In: LAMAS, S.; CADENAS, E. *Nitric Oxide, Cell Signaling, and Gene Expression*. Boca Raton-FL: Taylor & Francis Group, 2006, p.77-98.

- GHISELLI, A.; SERAFINI, M.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Total Antioxidant Capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radical Biology & Medicine*, v.29, n.11, p.1106-1114, 2000.
- GLICKSTEIN, M. Thinking about the cerebellum. *Scientific Commentaries*, v.129, p.288-292, 2006.
- GONÇALVES, C.G.; CAMPOS, A.L.C.; COELHO, J.C.U.; SUZUKI, S.; MEGUID, M.M. Malnutrition and Cachexia. In: HOFBAUER, K.G.; ANDKER, S.D.; INUI, A.; NICHOLSON, J.R. *Pharmactotherapy of Cachexia*. Boca Raton-FL: Taylor & Francis Group, 2006, p.3-15.
- GONZALEZ-FLECHA, B.; LLESUY, S.; BOVERIS, A. Hidroperoxide-initiated chemiluminescence: an assay for oxidative stress in biopsies of heart, liver, and muscle. *Free Radical Biology & Medicine*, v.10, p.93-100, 1991.
- GONZALEZ-ZULUETA, M.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Neurotoxic Actions and Mechanisms of Nitric Oxide. In: IGNARRO, L.J. *Nitric Oxide - Biology and Pathobiology*. San Diego: Academic Press, 2000, Chapter 43, p.695-710.
- GUIX, F.X.; URIBESALDO, I.; COMA, M.; MUÑOZ, F.J. The physiology and pathophysiology of nitric oxide in the brain. *Progress in Neurobiology*, v.76, p.126-152, 2005.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*. ed.4, 2007.
- HIRAI, K.; HUSSEY, H.J.; BARBER, M.D.; PRICE, S.A.; TISDALE, M.J. Biological Evaluation of a Lipid-mobilizing Factor Isolated from The Urine of Cancer Patients. *Cancer Research*, v.58, p.2359-2365, 1998.
- HOGG, N.; KALYANARAMAN, B. Nitric Oxide and lipid peroxidation. *Biochimica et Biophysica Acta*, v.1411, p.378-384, 1999.
- IAMAMOTO, C.A. *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. 198f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

IGNARRO, L.J. Introduction and Overview. In: IGNARRO, L.J. *Nitric Oxide - Biology and Pathobiology*. San Diego: Academic Press, 2000, Chapter 1, p.3-19.

INUI, A. Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome: Current Issues in Research and Management. *A Cancer Journal for Clinicians*, v.52, p.72-91, 2002.

ITO, M. Cerebellar Long-Term Depression: Characterization, Signal Transduction, and Functional Roles. *Physiological Reviews*, v.81, n.3, Jul. 2001.

KAWATO, M. Internal models for motor control and trajectory planning. *Current Opinion in Neurobiology*, v.9, p.718-727, 1999.

KEYNES, R.G.; GRIFFITHS, C.H.; HALL, C.; GARTHWAITE, J. Nitric oxide consumption through lipid peroxidation in brain cell suspensions and homogenates. *Biochemical Journal*, v.387, p.685-694, 2005.

KIKUCHI, K.; NAGANO, T.; HAYAKAWA, H.; HIRATA, Y.; HIROBE, M. Detection of Nitric Oxide Production from a Perfused Organ by a Luminol-H₂O₂ System. *Analytical Chemistry*, v.65, n.13, p.1794-1799, 1993.

KNOWLES, R.G.; PALACIOS, M.; PALMER, R.M.J.; MONCADA, S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. v.86, p.5159-5162, Jul. 1989.

LAGMAN, R.L.; DAVIS, M.P.; LEGRAND, S.B.; WALSH, D. Common Symptoms in Advanced Cancer. *Surgical Clinics of North America*, v.85, p.237-255, 2005.

LIAUDET, L.; SORIANO, F.G.; SZABÓ, C. Biology of nitric oxide signaling. *Critical Care Medicine*, v.28, n.4, p.N37-52, 2000.

LUNDBERG, J.O.; WEITZBERG, E.; LUNDBERG, J.M.; ALVING, K. Intra-gastric nitric oxide production in humans: measurements in expelled air. *Gut*, v.35, p.1543-1546, 1994.

MACDONALD, N.; EASSON, A.M.; MAZURAK, V.C.; DUNN, G.P.; BARACOS, V.E. Understanding and Managing Cancer Cachexia. *Journal American College of Surgeons*, v.197, n.1, 143-161, Jul. 2003.

MARTIN, E.; SHARINA, I.; SEMINARA, A.R.; KRUMENACKER J.; MURAD, F. Nitric Oxide Cell Signaling Mediated by cGMP. In: LAMAS, S.; CADENAS, E. *Nitric Oxide, Cell Signaling, and Gene Expression*. Boca Raton-FL: Taylor & Francis Group, 2006, p.167-215.

McCALL, T.B.; BOUGHTON-SMITH, N.K.; PALMER, R.M.J.; WHITTLE, B.J.R.; MONCADA, S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. *Biochemical Journal*, v.261, p.293-296, 1989.

MELDRUM, B.; GARTHWAITE, J. Excitatory amino acid neurotoxicity and neurodegenerative disease. *TiPS*, v.11, p.379-387, Set. 1990.

MERRILL, J.E.; VAN DER VEEN, R.C. Nitric Oxide and Autoimmune Disease in the Nervous System. In: IGNARRO, L.J. Introduction and Overview. In: IGNARRO, L.J. *Nitric Oxide - Biology and Pathobiology*. San Diego: Academic Press, 2000, Chapter 30, p.465-481.

MICHALAK, S.; WENDER, M.; MICHALOWSKA-WENDER, G. Cachexia – induced cerebellar degeneration: Involvement of serum TNF and MCP-1 in the course of experimental neoplastic disease. *Acta Neurobiologiae Experimentalis*, v.66, p.113-122, 2006.

MIRANDA, K.M.; ESPEY, M.G.; JOURD'HEUIL, D.; GRISHAM, M.B.; FUKUTO, J.M.; FEELISCH, M.; WINK, D.A. The Chemical Biology of Nitric Oxide. In: IGNARRO, L.J. *Nitric Oxide - Biology and Pathobiology*. San Diego: Academic Press, 2000, Chapter 3, p.41-55.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGS, E.A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. *Pharmacological Reviews*, v.43, n.2, p.109-142, 1991.

MURPHY, S. Production of Nitric Oxide by Glial Cells: Regulation and Potential Roles in the CNS. *GLIA*, v.29, p.1-14, 2000.

NAGASE, S.; TAKEMURA, K.; UEDA, A.; HIRAYAMA, A.; AOYAGI, K.; KONDOH, M.; KOYAMA, A. A Novel Nonenzymatic Pathway for the Generation of Nitric Oxide by the Reaction of Hydrogen Peroxide and D- or L-Arginine. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.233, n.1, p.150-153, 1997.

NORRIS JR., F.H. The Remote Effects of Cancer on the Nervous System. *Journal of Neurology*, v.201, n.3, p.201-210, 1972.

PACHER, P.; BECKMAN, J.S.; LIAUDET, L. Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Review*, v.87, p.315-424, Jan. 2007.

PANNU, R.; SINGH, I. Pharmacological strategies for the regulation of inducible nitric oxide synthase: Neurodegenerative versus neuroprotective mechanisms. *Neurochemistry International*, v.49, p.170-182, 2006.

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*, v.1688, p.187-196, 2004.

RAMEAU, G.A.; CHIU, L.; ZIFF, E.B. NMDA receptor regulation of nNOS phosphorylation and induction of neuron death. *Neurobiology of Aging*, v.24, p.1123-1133, 2003.

REPETTO, M.; REIDES, C.; CARRETERO, M.L.G.; COSTA, M.; GRIEMBERG, G.; LLESUY, S. Oxidative stress in blood of HIV infected patients. *Clinica Chimica Acta*, v.255, p.107-117, 1996.

RUBBO, H.; RADJ, R.; TRUJILLO, M.; TELLERI, R.; KALYANARAMAN, B.; BARNES, S.; KIRK, M.; FREEMAN, B.A. Nitric Oxide Regulation of Superoxide and Peroxynitrite-dependent Lipid Peroxidation. *The Journal of Biological Chemistry*, v.269, n.42, p.26066-26075, Oct. 1994.

RUBBO, H.; TROSTCHANSKY, A.; O'DONNELL, V.B. Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: Mechanisms and consequences. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v.484, p.167-172, 2009.

SATTLER, R.; XIONG, Z.; LU, W.Y.; HAFNER, M.; MACDONALD, J.F.; TYMIANSKI, M. Specific Coupling of NMDA Receptor Activation to Nitric Oxide Neurotoxicity by PSD-95 Protein. *Science*, v.284, p.1845-1848, Jun. 1999.

SCHAFFER, F.; BUETTNER, G. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radical Biology & Medicine*, v.30, n.11, p.1191-1212, 2001.

SCORZIELLO, A.; SANTILLO, M.; ADORNETTO, A.; DELL'AVERSANO, C.; SIRABELLA, R.; DAMIANO, S.; CANZONIERO, L.M.T.; DI RENZO, G.F.; ANNUNZIATO, L. NO-induced neuroprotection in ischemic preconditioning stimulates mitochondrial Mn-SOD activity and expression via RAS/ERK1/2 pathway. *Journal of Neurochemistry*, v.103, p.1472-1480, 2007.

SERUGA, B.; ZHANG, H.; BERNSTEIN, L.J.; TANNOCK, I.F. Cytokines and their relationship to the symptoms and outcome of cancer. *Nature*, v.8, p.887-899, Out. 2008.

SHACKA, J.J.; SAHAWNEH, M.A.; GONZALEZ, J.D.; YE, Y-Z; D'ALESSANDRO, T.L.; ESTÉVEZ, A.G. Two distinct signaling pathways regulate peroxinitrite-induced apoptosis in PC12 cells. *Cell Death and Differentiation*, v.13, p.1506-1514, 2006.

SKIPWORTH, R.J.E.; DAHELE, M.; FEARON, K.C.H. Diseases Associated with Cachexia: Cancer. In: HOFBAUER, K.G.; ANDKER, S.D.; INUI, A.; NICHOLSON, J.R. *Pharmactotherapy of Cachexia*. Boca Raton–FL: Taylor & Francis Group, 2006, p.117-142.

SLAVIERO, K.A.; READ, J.A.; CLARKE, S.J.; RIVORY, L.P. Baseline assessment in Advanced Cancer Patients Receiving Palliative Chemotherapy. *Nutrition and Cancer*, v.46, n.2, p.148-157, 2003.

THACH, W.T. A Role for the Cerebellum in Learning Movement Coordination. *Neurobiology of Learning and Memory*, v.70, p.177-188, 1998.

TISDALE, M.J. Pathogenesis of Cancer Cachexia. *The Journal of Supportive Oncology*, v.1, n.3, p.159-167, Set./Out. 2003.

TISDALE, M.J. Mechanisms of Cancer Cachexia. *Physiological Reviews*, v.89, p.381-410, Abril 2009.

WEITZBERG, E.; LUNDENBERG, J.O.N. Nonenzymatic Nitric Oxide Production in Humans. *Biology and Chemistry*, v.2, n.1, p.1-7, 1998.

WIENCKEN, A.E.; CASAGRANDE, V.A. Endothelial Nitric Oxide Synthetase (eNOS) in Astrocytes: Another Source of Nitric Oxide in Neocortex. *GLIA*, v.26, p.280-290, 1999.

WINK, D.A.; MITCHELL, J.B. Chemical Biology of nitric oxide: insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology & Medicine*, v.25, n.4/5, p.343-456, 1998.

WOOD, J.; GARTHWAITE, J. Models of the Diffusional Spread of Nitric Oxide: Implications for Neural Nitric Oxide Signalling and its Pharmacological Properties. *Neuropharmacology*, v.33, n.11, p.1235-1244, 1994.

ZHANG, Y.; WANG, H.; LI, J.; DONG, L.; XU, P.; CHEN, W.; NEVE, R.L.; VOLPE, J.J.; ROSENBERG, P.A. Intracellular Zinc Release and ERK Phosphorylation Are Required Upstream of 12-Lipoxygenase Activation in Peroxynitrite Toxicity to Mature Rat Oligodendrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, v.281, n.14, P.9460-9470, Abril 2006.

ZHU, C.; XU, F.; WANG, X.; SHIBATA, M.; UCHIYAMA, Y.; BLOMGREN, K.; HAGBERG, H. Different apoptotic mechanisms are activated in male and female brains after neonatal hypoxia-ischaemia. *Journal of Neurochemistry*, v.96, p.1016-1027, 2006.