

## FUNÇÕES BIOLÓGICAS DO ÓXIDO NÍTRICO

Salette Linhares Queiroz

Instituto de Química de São Carlos - Universidade de São Paulo - Av. Dr. Carlos Botelho 1465 - 13560-970 - São Carlos - SP  
Alzir Azevedo Batista

Departamento de Química - Universidade Federal de São Carlos - Via Washington Luís Km 235 - CP 676 - 13565-905 - São Carlos - SP

Recebido em 15/6/98; aceito em 23/10/98

**BIOLOGICAL FUNCTIONS OF NITRIC OXIDE.** Nitric Oxide has been shown to be involved in many important biological functions. It serves as a vasodilator and a neurotransmitter in the brain and peripheral nervous system. It is also involved in the bacteria-killing process by macrophages. In this review we will discuss progress in nitric oxide chemistry and we will also attempt to explain its action in the cardiovascular, nervous and immune systems.

**Keywords:** nitric oxide; biological functions; diseases.

## INTRODUÇÃO

Nos últimos dez anos a comunidade científica vem assistindo a um crescimento surpreendente no campo das pesquisas que tomam o óxido nítrico como objeto de estudo. A descoberta em 1986/1987 de que células vasculares endoteliais eram capazes de sintetizar NO a partir da L-arginina foi recebida inicialmente com ceticismo por uma grande maioria dos cientistas<sup>1-4</sup>. Porém, atualmente o fato de que o óxido nítrico se formar a partir do aminoácido arginina pela ação catalisadora da enzima NO sintetase já foi comprovado de forma irrefutável e é correntemente aceito<sup>5</sup>. Esta constatação conduziu a um desenvolvimento febril de pesquisas nesta área, o que é evidenciado pela quantidade de publicações que passou de um número pequeno em 1986 para 5000 em 1996<sup>6</sup>. Como fruto destas investigações fez-se possível perceber que, embora uma das mais simples moléculas biológicas na natureza, o óxido nítrico está envolvido em muitos processos fisiológicos no homem, que incluem neurotransmissão, controle da pressão sanguínea, coagulação do sangue e participação na capacidade do sistema imunológico de destruir células tumorais e parasitas intracelulares<sup>5</sup>. Assim, uma grande variedade de estados patológicos, como por exemplo, problemas cardiovasculares e cerebrais, doenças inflamatórias e infecciosas, pode estar relacionada com um baixo ou alto nível de óxido nítrico no organismo<sup>7</sup>. Neste artigo pretende-se divulgar alguns relevantes aspectos da química biológica desta molécula que, em tributo à sua potencial importância na biologia, foi escolhida como a Molécula do Ano em 1992 pelos editores da revista *Science*<sup>8</sup> e considerada, no ano seguinte, a nova estrela surpreendente da bioquímica pela revista *Chemical and Engineering News*<sup>5</sup>.

## 2. ALGUMAS PROPRIEDADES DO ÓXIDO NÍTRICO

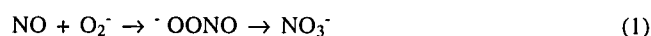
Algumas propriedades físicas e químicas do óxido nítrico serão inicialmente consideradas, uma vez que o conhecimento das mesmas é capaz de proporcionar uma melhor compreensão da sua ação fisiológica.

O óxido nítrico é um gás incolor à temperatura ambiente, pouco solúvel em água, com uma concentração em uma solução saturada (1 atm de NO) de 1,9 mM (25°C), sendo muito mais solúvel em solventes apolares, tal como o n-hexano, onde apresenta uma concentração na saturação de 0,13 M. Assim, esta molécula tende a dissolver-se seletivamente na membrana e fases lipídicas das células<sup>9,10</sup>. A constante de difusão (D) do óxido nítrico em água está na faixa de (2-4) × 10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup>/s e

usando-se microsensores, sob condições fisiológicas, D pode ser calculado como 3,3 × 10<sup>-5</sup> cm<sup>2</sup>/s. Tomando este valor de D, simulações da difusão do óxido nítrico revelam que esta molécula percorre distâncias surpreendentes a partir da célula que a produz, antes da sua inativação<sup>11,12</sup>.

O óxido nítrico é uma molécula neutra com configuração eletrônica (σ2s)<sup>2</sup> (σ2s\*)<sup>2</sup> (σ2pz)<sup>2</sup> (π2p)<sup>4</sup> (π2p\*)<sup>1</sup>, que apresenta um elétron desemparelhado e é, portanto, paramagnética. Esta propriedade é de grande relevância, uma vez que a maioria das interações químicas do óxido nítrico em sistemas biológicos são caracterizadas como estabilizações do elétron desemparelhado. Em geral isto acontece através da reação do óxido nítrico com outra espécie paramagnética ou pela sua complexação a um metal. No primeiro caso, o resultado eventual é a formação de espécies diamagnéticas estabilizadas e no segundo caso, o elétron desemparelhado é dividido entre o óxido nítrico e o metal<sup>13</sup>.

Sendo uma espécie radicalar, o óxido nítrico é capaz de reagir rapidamente com outros radicais importantes do ponto de vista biológico, tais como oxigênio molecular e superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). O significado químico e biológico da oxidação do óxido nítrico pela molécula do oxigênio é objeto de numerosas investigações, e é certo que tais reações são importantes para a sua toxicologia e fisiologia. Uma das mais significativas reações do óxido nítrico é com o O<sub>2</sub><sup>-</sup>, sendo o peroxinitrito, <sup>-</sup>OONO, o produto desta reação<sup>14</sup>. Tais espécies são potentes oxidantes, capazes de oxidar tióis e bases do DNA. Sob condições fisiológicas, o ácido conjugado do peroxinitrito, o ácido peroxinitroso (ONOOH, pKa = 6,8 a 25°C), possui a reatividade do radical hidroxila<sup>13</sup>. A meia-vida do <sup>-</sup>OONO, sob condições fisiológicas, é aproximadamente 1 segundo, decompondo-se espontaneamente para produzir nitrato (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>)<sup>14</sup>, conforme ilustra a equação abaixo:



A possível importância biológica desta reação foi primeiramente apontada por Beckman e colaboradores<sup>15</sup>, que observaram que o peroxinitrito podia ser formado sob condições fisiopatológicas (onde o NO e O<sub>2</sub><sup>-</sup> são produzidos por células fagocíticas, tais como macrófagos) e que o <sup>-</sup>OONO é um forte oxidante com potencial para destruir componentes celulares críticos.

Uma reação do óxido nítrico também muito conhecida, e talvez a mais exaustivamente investigada, é a sua oxidação para dióxido de nitrogênio que pode, naturalmente, ocorrer *in vivo*<sup>9</sup>. Nesta reação, na fase gasosa, duas moléculas de NO reagem com uma molécula de O<sub>2</sub> para produzir duas moléculas de um outro radical paramagnético, dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>)<sup>13</sup>:



Esta oxidação foi também estudada em solução aquosa e a reação ocorre de acordo com a equação:



Um intermediário é formado ( $\text{N}_2\text{O}_3$  ou uma espécie relacionada) que pode eficientemente nitrosar tióis e aminas celulares. Isto pode, em princípio, representar um importante passo na citotoxicidade do NO. Porém, a reação é de segunda ordem com relação ao NO e portanto, extremamente lenta em concentrações fisiológicas submicromolares de NO<sup>16,17,18</sup>.

## A BIOSÍNTESE DO ÓXIDO NÍTRICO

A biossíntese do NO no organismo ocorre via oxidação da L-arginina e é catalisada pela enzima NO sintetase (NOS) com a participação da forma reduzida do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), como um doador de elétron<sup>7</sup>. Esta enzima, responsável pela síntese do NO *in vivo*, tem sido objeto de considerável escrutínio<sup>19-23</sup> e algumas isoformas da mesma são conhecidas; duas delas são constitutivas e uma outra é induzida pelo estímulo imunológico. As enzimas constitutivas estão normalmente presentes na célula, enquanto as outras são induzidas por algum mecanismo externo, que no caso da NO sintetase é o estímulo imunológico. A enzima NO sintetase constitutiva (cNOS), que foi inicialmente descoberta no endotélio vascular, é conhecida como eNOS (NOS endotelial), ao passo que aquela que se encontra presente no cérebro e no sistema nervoso periférico é chamada de nNOS (NOS neuronal). A forma da enzima NO sintetase induzida pelo estímulo imunológico ou inflamatório é designada como iNOS (NOS induzida). Uma comparação entre estas três isoformas da enzima NO sintetase (NOS endotelial, NOS neuronal e NOS induzida) é mostrada na Tabela 2<sup>24</sup>. Cada unidade monomérica da enzima NO sintetase apresenta uma unidade dos grupos prostéticos tetra-hidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e ferro protoporfirina IX (heme). A Figura 1 ilustra estes cofatores presentes na enzima NO sintetase<sup>7,5</sup>.

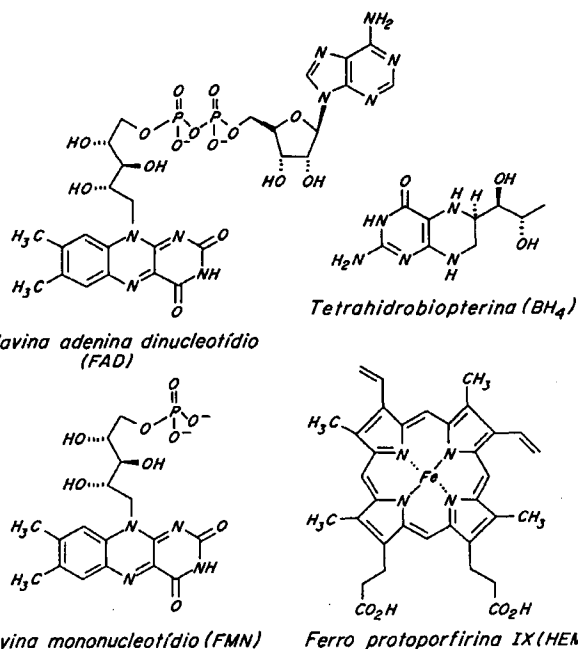


Figura 1. Grupos prostéticos presentes na enzima NO sintetase.

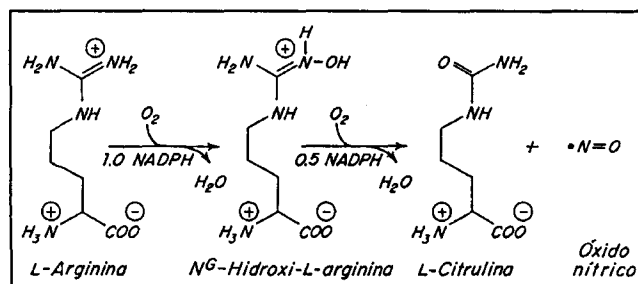


Figura 2. Representação esquemática da biossíntese do óxido nítrico, a partir da L-arginina, catalisada pela enzima NO sintetase.

Tabela 1. Algumas propriedades físicas do óxido nítrico<sup>69</sup>.

Ponto de Fusão	-163,6°C
Ponto de Ebulição	-151,8°C
$\Delta\text{H}^\circ\text{f}$	90,2kJ/mol
Comprimento de Ligação N-O	115pm

Um esquema geral da reação da NO sintetase é ilustrada na Figura 2<sup>5</sup>, onde observa-se que a conversão da L-arginina para L-citrulina e NO, catalisada pela NO sintetase, é uma oxidação de cinco elétrons de um dos nitrogênios guanidínicos da L-arginina. O primeiro passo, a oxidação de dois elétrons, é uma hidroxilação que forma N<sup>G</sup>-hidroxi-L-arginina como um produto intermediário ligado à enzima. O segundo passo, uma oxidação de três elétrons envolve remoção de elétron, inserção de oxigênio e quebra da ligação carbono-nitrogênio para formar L-citrulina e NO. O mesmo doador de elétrons, a forma

reduzida do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH), é requerido em ambas as etapas. Os átomos de oxigênio que são incorporados ao NO e à L-citrulina derivam-se de moléculas distintas de oxigênio<sup>5</sup>.

Não se encontra ilustrado no esquema da reação da síntese do NO (Figura 2), porém pode-se observar através da Tabela 2, a dependência de algumas isoformas da NOS com relação a um cofator adicional, a calmodulina. Na presença de elevada concentração de cálcio, a calmodulina liga-se a certas NOS e as ativa. Este processo está relacionado com as enzimas ditas constitutivas, ou seja, as eNOS e nNOS. No entanto, a situação é diferente para as iNOS, onde a atividade das mesmas é independente da presença de  $\text{Ca}^{2+}$  e da calmodulina<sup>25</sup>. A forma indutiva e as formas constitutivas da enzima NO sintetase diferem não apenas na maneira através das quais elas são ativadas. A forma indutiva produz quantidades muito maiores de óxido nítrico do que as formas constitutivas— um fator chave que diferencia as suas funções no corpo, como veremos a seguir<sup>26</sup>.

Tabela 2. Algumas semelhanças e diferenças entre as isoformas da enzima NO sintetase<sup>24,70</sup>.

	NOS endotelial (eNOS)	NOS neuronal (nNOS)	NOS induzida (iNOS)
Controle Primário	$\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina	$\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina	Expressão Gênica
Localização na Célula	Membrana $\geq$ citossol	Citossol	Citossol $\geq$ membrana
Liberção de NO	Baixa (pmolar)	Baixa (pmolar)	Alta (mmolar)

## FUNÇÕES DESEMPENHADAS PELO ÓXIDO NÍTRICO NA FISIOLOGIA HUMANA

Tendo-se conhecimento da existência das três isoformas da enzima NO sintetase, de como estão distribuídas e das suas maneiras de ativação, não é difícil imaginar que uma diversidade de funções fisiológicas são desempenhadas pelo óxido nítrico gerado a partir da ação catalisadora das mesmas. Algumas destas funções serão discutidas nos tópicos posteriores.

### O óxido nítrico como neurotransmissor

O sistema nervoso, coordenador de todas as atividades orgânicas, integra sensações e idéias, conjuga fenômenos da consciência e adapta o organismo às condições do momento. É formado por células nervosas ou neurônios, elementos altamente diferenciados em excitabilidade e condutibilidade. As células nervosas são alongadas e apresentam 3 partes fundamentais: o corpo celular, os dendritos e os axônios. Os estímulos nervosos são recebidos pelos dendritos, seguem pelo corpo celular, percorrem o axônio e, da extremidade deste, são passados à célula seguinte. A transmissão do impulso nervoso é, portanto, sempre no sentido dendrito → corpo celular → axônio. Ao atingir a extremidade do axônio, o impulso nervoso passa para a célula seguinte. Isto se dá por meio de um sítio específico, denominado sinapse<sup>27,28</sup>.

As células nervosas são, em sua maioria, eletricamente isoladas umas das outras; os axônios de um neurônio estão separados dos dendritos do neurônio seguinte por um espaço denominado espaço sináptico. Quando o impulso nervoso atinge a extremidade do axônio na região da sinapse, a alteração elétrica da membrana do axônio leva à liberação de substâncias químicas denominadas neurotransmissores, que são mediadores químicos. Estas substâncias difundem-se pelo espaço sináptico e provocam alterações elétricas na membrana da célula seguinte, gerando, portanto, um novo impulso nervoso nesta célula<sup>27,28</sup>.

Os neurotransmissores enquadram-se em diferentes classes químicas. Os primeiros neurotransmissores conhecidos, descobertos entre 1930 e 1960, eram todos aminas, moléculas orgânicas derivadas da amônia (NH<sub>3</sub>), e que têm no grupo do nitrogênio seu principal mecanismo de sinalização. Na década de 1960, os pesquisadores começaram a perceber que também aminoácidos eram neurotransmissores. A terceira classe de neurotransmissores abrange os peptídeos. Nos últimos anos, o trabalho em diversos laboratórios de pesquisa levou ao reconhecimento de uma quarta e extraordinária classe de neurotransmissores, que inclui o óxido nítrico e o monóxido de carbono<sup>29,30</sup>. De fato, observou-se que o NO muitas vezes funciona como um neurotransmissor porém, não se assemelha ou age como qualquer outro neurotransmissor conhecido. Conforme mencionou-se anteriormente, quando um neurônio é ativado, libera neurotransmissores, que se encontravam armazenados em vesículas especiais, em uma região de contato entre os neurônios, chamada sinapse. A célula receptora capta o neurotransmissor e é ativada. O NO, no entanto, não é armazenado em vesículas e não apresenta mecanismos especiais de liberação, sendo produzido onde e quando se faz necessário. Além disso, enquanto a maioria dos neurotransmissores acopla-se precisamente a um receptor específico na superfície da célula, o NO não necessita de receptores específicos para penetrar na mesma e é capaz de difundir-se livremente do ponto onde foi sintetizado até sítios intracelulares em células vizinhas<sup>31</sup>.

Os dois neurotransmissores principais no sistema nervoso periférico são acetilcolina e noradrenalina, que atuam como mensageiros na junção nervo/nervo e nervo/músculo. Alguns nervos periféricos não usam nem a noradrenalina nem a acetilcolina como neurotransmissores, sendo classificados como nervos NANC (não-adrenérgicos-não-colinérgicos). Estudos

desenvolvidos por M. Rand, no princípio desta década, sugeriram o NO como sendo um mediador na neurotransmissão NANC<sup>13,32</sup>.

Nervos NANC são encontrados no trato gastrointestinal, trato respiratório, musculatura cardiovascular e sistema urogenital. A ereção peniana, por exemplo, é mediada por nervos NANC, os quais liberam um neurotransmissor que provoca a relaxação dos músculos dos corpos cavernosos (dois cilindros flexíveis de 1 centímetro de diâmetro, de tecido esponjoso, por onde circula o sangue) que, conseqüentemente, são invadidos por sangue. É a tumescência, que culmina na ereção peniana. Muitos estudos apontavam o NO como sendo o neurotransmissor envolvido neste processo e em 1992 conseguiu-se provar definitivamente que no sexo masculino, o NO traduz a excitação sexual em potência, causando a ereção do pênis<sup>8</sup>. Em vista da importância do sexo na vida do homem, menções à presença do óxido nítrico na cascata bioquímica envolvida no processo de ereção já podem ser lidas em revistas de circulação popular<sup>33</sup> e formas não invasivas de aplicação de substâncias liberadoras de NO para o pênis estão sendo sugeridas como uma nova maneira de tratamento para a impotência. Com 10% da população masculina sofrendo deste mal, pesquisadores continuam os estudos nesta área na esperança de alcançar aplicações clínicas<sup>8,9,34,35</sup>.

A função do músculo liso gastrointestinal é também regulada pelos nervos NANC. Neste caso, o NO derivado dos nervos NANC, leva à relaxação da musculatura, regulando a função estomacal<sup>13</sup>.

O óxido nítrico é também um neurotransmissor no cérebro<sup>16</sup>, sendo a sua produção neuronal iniciada quando um neurônio emissor (neurônio pré-sináptico) libera um mensageiro químico, o glutamato, que se difunde pelo espaço sináptico e se liga a um receptor especializado em glutamato, o receptor NMDA (N-metil-D-aspartato) em um neurônio receptor (neurônio pós-sináptico). Esta ligação provoca a abertura de canais no neurônio receptor, propiciando a penetração de Ca<sup>2+</sup> na célula e a sua posterior ligação com a calmodulina. O complexo Ca<sup>2+</sup>/calmodulina liga-se então à forma da NO sintetase encontrada nas células nervosas, nNOS, e esta ligação ativa a enzima que catalisa a oxidação da L-arginina para L-citrulina e NO. O NO recém-sintetizado pode então deixar o neurônio por difusão direta pela membrana da célula<sup>3</sup>. A Figura 3 ilustra este processo e também o papel hipotético desempenhado pelo NO como mensageiro retrógrado<sup>26,36</sup>, que será discutido a seguir.

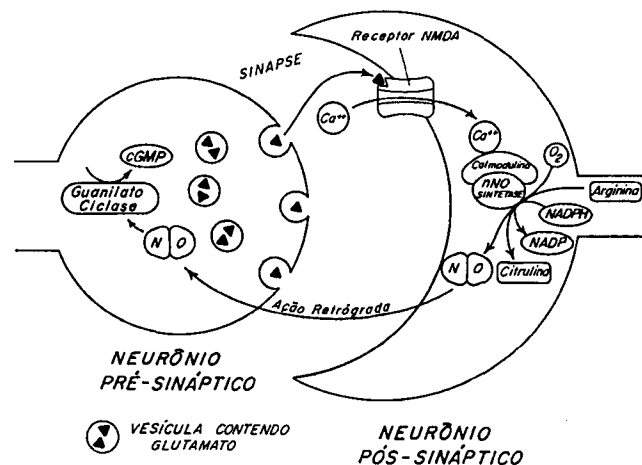


Figura 3. Produção do óxido nítrico a partir da ativação da enzima NO sintetase neuronal (nNOS) e seu mecanismo de atuação como mensageiro retrógrado.

A exata função do NO na fisiologia do cérebro é controversa e a sugestão de que ele desempenha um papel no aprendizado e formação da memória encontra-se ainda sob investigação.

Propostas apresentadas no início desta década<sup>37,38</sup> sugerem que o NO atue como um mensageiro retrógrado, difundindo-se do neurônio pós-sináptico e retornando ao neurônio pré-sináptico, onde ativa a enzima guanilato ciclase (Figura 3). A guanilato ciclase catalisa a reação que produz cGMP (guanosina monofosfato cíclico). A cGMP, por sua vez, desencadeia o processo que resulta na liberação do glutamato e o ciclo se repete. Esta repetição do ciclo fortalece o contato sináptico e providencia um mecanismo celular para o processo de aprendizagem, contribuindo para a formação de uma memória de longo prazo<sup>26,36</sup>. Entende-se por memória de longo prazo a memória que recorda os fatos após muitos anos e por memória de curto prazo aquela que não chega a ser retida; por exemplo, a memória para discar um número telefônico encontrado no catálogo dura em média de 30 segundos a dois minutos<sup>39,40</sup>.

Uma outra função sugerida para o NO neuronal é o seu funcionamento como mediador da neurotoxicidade do glutamato<sup>25,41,42</sup>. A destruição neuronal em um acidente vascular cerebral é proveniente de uma maciça liberação de glutamato que age através do receptor NMDA e proporciona a formação de grandes quantidades de NO; tal processo resulta na morte neuronal<sup>36</sup>. Lipton<sup>43</sup> e colaboradores sugerem que, neste caso, a ação neurotóxica do NO deriva das suas reações com ânions superóxido para formar peroxinitrito, o qual pode ser o agente neurotóxico. Snyder<sup>44</sup> e colaboradores, por sua vez, acreditam que o tratamento de vítimas destes acidentes vasculares cerebrais com inibidores da nNOS possa reduzir os danos nas células nervosas, se os inibidores forem liberados em um tempo conveniente para a região apropriada do cérebro.

#### O óxido nítrico como regulador da pressão sanguínea

De acordo como a estrutura, propriedades de contração e mecanismo de controle, existem três tipos de músculos: músculo estriado esquelético, músculo estriado cardíaco e músculo liso. Os músculos lisos são involuntários e encontram-se envolvendo a parede de órgãos ocos. São responsáveis, dentre outros fenômenos, pelas contrações que empurram os alimentos ao longo do tubo digestivo e que diminuem o calibre das artérias, aumentando a pressão do sangue. Murad e colaboradores sugeriram, no início dos anos oitenta, que a relaxação no músculo liso requer a ativação da enzima guanilato ciclase e seria acompanhada pela conversão da guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (cGMP) (Figura 4), sendo este processo de relaxação desencadeado por mensageiros químicos, tal como a acetilcolina, que atuam diretamente nas células musculares do sistema vascular<sup>9</sup>. Porém, em 1980, Furchgott e Zawadzki descobriram que, na realidade, os mensageiros químicos responsáveis pela dilatação dos vasos sanguíneos agem na camada celular, chamada endotélio, que reveste o interior do vaso sanguíneo. Em reação ao estímulo do mensageiro químico, o endotélio produz uma molécula mensageira que se difunde pelas células musculares situadas sobre ele, que em seguida se relaxam. Furchott e Zawadzki chamaram essa misteriosa molécula de fator relaxante derivado do endotélio (EDRF, do inglês *endothelium-derived relaxing factor*)<sup>45</sup>.

Vários grupos de pesquisa tentaram isolar o EDRF e muitas hipóteses sobre a sua identidade química foram levantadas nos anos seguintes<sup>46-49</sup>. Porém, apenas em 1988 Furchott e Ignarro sugeriram, simultaneamente, que o EDRF e o óxido nítrico eram a mesma molécula<sup>50,51</sup>. Uma série de experimentos realizados independentemente por Moncada e Ignarro deram respaldo a esta proposta. Estes pesquisadores observaram que, assim como o óxido nítrico, o EDRF apresenta uma meia vida extremamente curta na presença de oxigênio; a molécula de hemoglobina, que se liga ao óxido nítrico, previne a ação do EDRF; o complexo formado pela hemoglobina e EDRF é espectralmente indistinguível do formado pela hemoglobina ligada ao óxido nítrico. Além disso, o EDRF reage com o ozônio

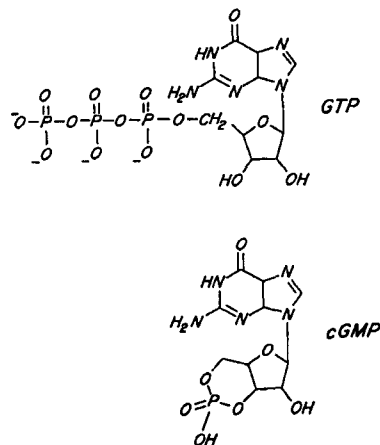


Figura 4. Estruturas da guanosina trifosfato (GTP) e da guanosina monofosfato cíclico (cGMP).

produzindo um produto quimioluminescente, cujas propriedades químicas são idênticas ao produto da reação do ozônio com o óxido nítrico. Porém, a mais convincente evidência da identidade do EDRF como sendo o óxido nítrico originou-se de trabalhos realizados por Moncada e colaboradores<sup>1</sup>, que usaram quimioluminescência para mostrar que as células endoteliais, de fato, liberam NO<sup>26</sup>.

Atualmente, todas as evidências levam a crer que o NO é o principal regulador da pressão sanguínea e este controle é efetuado a partir da produção de óxido nítrico nas células endoteliais. A Figura 5 ilustra este processo, onde observa-se que vários mensageiros químicos, incluindo hormônios e acetilcolina (Ach), podem ativar a enzima NO sintetase endotelial (eNOS) ligando-se a receptores apropriados na membrana da célula endotelial. Estas ligações provocam a abertura de canais que permitem que o cálcio penetre na célula, levando a um aumento na concentração de cálcio dentro da célula e ativando a enzima eNOS. O óxido nítrico produzido difunde-se da célula endotelial para a célula muscular, onde ativa a enzima guanilato ciclase (GC), causando aumento nos níveis de guanosina monofosfato cíclico (cGMP). O aumento nos níveis de cGMP diminui a quantidade de Ca<sup>2+</sup> livre na célula muscular, causando sua relaxação. Ou seja, a contração muscular requer Ca<sup>2+</sup>, e a força da contração é reduzida quando o nível de Ca<sup>2+</sup> diminui<sup>5,52,53</sup>.

Muito antes do entendimento do mecanismo da biossíntese do NO, a nitroglicerina e outros nitratos já eram empregados na medicina clínica para dilatar os vasos sanguíneos e, assim, aliviar a angina pectoris, a dor no peito causada por estreitamento das artérias coronarianas<sup>9,36</sup>. No entanto, pouco se sabia sobre o modo de ação desta classe de compostos até que em 1987/1988 Fellisch e colaboradores observaram que estes nitrovasodilatadores também geram NO em uma reação não-enzimática com a cisteína e que o estímulo da guanilato ciclase por estes compostos é dependente da produção de NO<sup>54,55</sup>. Assim, a manutenção da pressão sanguínea normal requer que as células endoteliais sintetizem constantemente NO. Quando este nível normal não é atingido, seja porque a produção é bloqueada pela administração de um inibidor NOS ou em estados patológicos como a arteriosclerose, o músculo não relaxa apropriadamente. A vasoconstrição resultante aumenta a pressão sanguínea e pode ser responsável por algumas formas de hipertensão. Existe um considerável interesse na descoberta de agentes terapêuticos capazes de aumentar a atividade da eNOS em pacientes hipertensos, porém, até o momento terapias aplicáveis não estão disponíveis e ainda são agentes farmacológicos capazes de liberar NO, tal como a nitroglicerina, que são usados em terapias vasorelaxantes<sup>5</sup>.

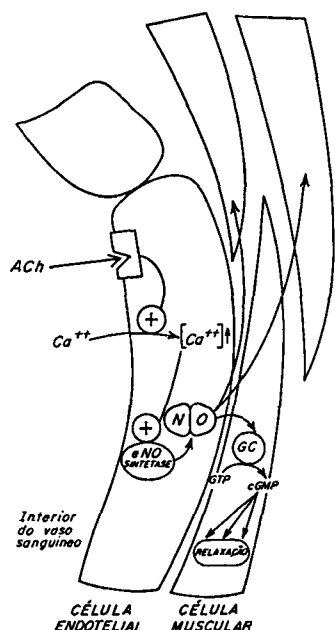


Figura 5. Produção do óxido nítrico a partir da ativação da enzima NO sintetase endotelial (eNOS) e seu mecanismo de atuação na relaxação muscular.

### O óxido nítrico como agente citotóxico

A resposta imunológica é a reação do corpo através da qual materiais estranhos são neutralizados ou destruídos e os macrófagos e as células brancas do sangue, que são ativos no processo inflamatório, apresentam-se como elementos-chave para o sucesso desta resposta, uma vez que são capazes de engolfar e matar células de tumores e de bactérias. Para que um macrófago atue, ele precisa ser ativado por moléculas conhecidas como citocinas, que são liberadas por algumas células do sistema imunológico<sup>56,57</sup>.

A descoberta de que o óxido nítrico também está envolvido nas atividades do sistema imunológico baseou-se em estudos iniciados na década de oitenta, quando observou-se que existe uma correlação entre as atividades deste sistema e níveis elevados de nitrato na urina, de tal forma que a formação de nitratos aumenta de maneira acentuada durante o processo inflamatório. Alguns trabalhos mostraram que a citotoxicidade dos macrófagos contra células tumorais depende da presença da L-arginina e que a sua atividade é acompanhada pela formação de nitrito e citrulina. Assim, conhecendo-se de antemão a produção de NO a partir da L-arginina nas células endoteliais, fez-se possível concluir que um processo similar ocorre nos macrófagos ativados, e que o nitrito formado é proveniente do precursor, NO. Deduziu-se, portanto, que os macrófagos constituem uma fonte de óxido nítrico no corpo e que as funções por eles desempenhadas são devidas à sua capacidade de formar NO, que por sua vez é convertido nos nitratos<sup>5,26,58,59</sup>.

Os macrófagos apresentam a forma da enzima NO sintetase induzida (iNOS), cuja síntese é estimulada por citocinas, tal como  $\gamma$ -interferon. Uma vez iniciada a produção de óxido nítrico pela iNOS, ela se prolonga por várias horas e em concentrações altas o suficiente (da ordem de  $\mu\text{M}$ ) para se mostrar tóxicas à célula alvo<sup>60</sup>.

O NO produzido pela iNOS difunde-se para fora dos macrófagos e penetra na célula tumoral, destruindo-a através da inibição de centros Fe-S em várias enzimas, incluindo a aconitase, uma enzima envolvida no ciclo do ácido tricarbóxico. O NO reage oxidativamente com o Fe(II) do cluster Fe-S, destruindo assim a ação enzimática. O NO pode também atuar de várias outras formas como, por exemplo, desativando

a ribonucleotídeo redutase pela destruição do radical tirosila, essencial na sub-unidade R2 da enzima. Existe também a possibilidade do NO ligar-se ao Fe dos grupos heme da hemoglobina e no citocromo  $a_3$  da citocromo oxidase, resultando no bloqueamento das funções destas proteínas<sup>61,62</sup>. Em suma, o óxido nítrico danifica as células ligando-se a certas enzimas que estão envolvidas na respiração celular, impedindo-as de trabalhar adequadamente. A Figura 6 ilustra a produção do óxido nítrico a partir da ativação da enzima NO sintetase induzida (iNOS) e seu mecanismo de atuação na destruição de células tumorais.

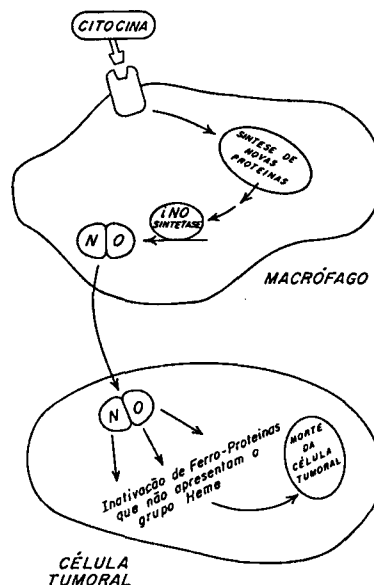


Figura 6. Produção do óxido nítrico a partir da ativação da enzima NO sintetase induzida (iNOS) e seu mecanismo de atuação na destruição de células tumorais.

É importante ressaltar que o NO é citotóxico em algumas células e citostático em outras, o que sugere que a sensibilidade ao NO varia de uma célula para outra. As razões para isto não estão ainda bem esclarecidas, mas podem depender da importância relativa dos centros Fe-S em várias enzimas, em diferentes células<sup>63</sup>.

Uma doença conhecida como choque séptico, que é fatal em mais de 50% dos casos e ameaça a vida de aproximadamente 300.000 pessoas anualmente nos Estados Unidos, é causada por níveis muito elevados de bactérias circulando no sangue. Esta situação ativa a resposta imunológica, estimulando a síntese de i-NOS pelos macrófagos e, conseqüentemente, aumenta a concentração de óxido nítrico. O NO produzido em quantidades excessivas, não apenas destrói as células invasoras, como também provoca vasodilatação, o que conduz a uma queda na pressão sanguínea e a um colapso vascular. Esta situação é crítica devido ao fato de que muitos pacientes não respondem às drogas vasoconstritoras que são normalmente usadas para elevar a pressão sanguínea. Assim, a procura por novas drogas que possam reduzir os níveis de óxido nítrico nesta e em outras doenças é um grande desafio para a química farmacêutica e uma área potencialmente lucrativa para a indústria farmacêutica<sup>9,26,52,64-66</sup>.

### CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Não há dúvida que estudos recentes revelaram importantes funções fisiológicas desempenhadas pelo óxido nítrico e, conseqüentemente, mostraram que um grande número de doenças

pode estar relacionada com o seu baixo ou alto nível no organismo. A constatação deste fato conduziu a um grande interesse no desenvolvimento de drogas capazes de gerar ou inibir a sua produção no meio biológico.

Tendo-se conhecimento de que a formação do óxido nítrico é regulada por enzimas específicas, pode-se inibir a sua produção com drogas inibidoras destas moléculas. Esta é a abordagem, via química orgânica, encontrada para o problema, e muitos cientistas estão tentando modelar inibidores de enzimas potentes e seletivos. Esta estratégia vem sendo usada na tentativa de solucionar os problemas gerados pelo choque séptico. Infelizmente, os inibidores empregados nestes casos provocaram uma série de efeitos colaterais, afetando a circulação sanguínea dentro dos órgãos, notadamente nos pulmões<sup>67,68</sup>. Isto ocorre provavelmente porque além de inibir a produção excessiva do óxido nítrico pelas iNOS eles também inibem a produção do óxido nítrico pelas eNOS. Muitos laboratórios acadêmicos e comerciais estão tentando produzir inibidores seletivos de iNOS, mas até o momento, pouco se tem conseguido neste sentido<sup>52</sup>.

Uma outra estratégia, via química inorgânica, vem sendo explorada por Fricker e colaboradores, na tentativa de reduzir o nível de óxido nítrico produzido pelas enzimas iNOS. Sabendo-se que o óxido nítrico liga-se facilmente a determinados metais de transição, alguns complexos metálicos foram examinados como possíveis aprisionadores de NO e observou-se que o complexo de rutênio denominado JM1226, K[Ru(Hedta)Cl] (Figura 7) apresenta-se como um potencial e eficiente capturador de NO em sistemas biológicos<sup>52</sup>.

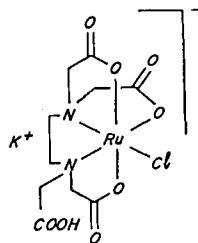


Figura 7. Estrutura do complexo denominado JM1226, K[Ru(Hedta)Cl].

Finalmente, conclui-se que muitas e significativas foram as descobertas sobre as funções biológicas do óxido nítrico e que tratamentos para as doenças por ele causadas necessitam ser desenvolvidos. Felizmente o conhecimento que se tem atualmente da fisiologia e da química do NO nos permite vislumbrar uma solução a prazo não muito distante para este ainda complexo problema.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à FAPESP, CNPq e CAPES pelos auxílios financeiros e aos Profs. Drs. Sérgio R. de A. Leite (Instituto de Química-UNESP-Araraquara) e Eliezer J. Barreiro (Faculdade de Farmácia-UFRJ) pelas sugestões.

## REFERÊNCIAS

- Palmer, R. M. J.; Ferrige, A. G.; Moncada, S.; *Nature (London)* **1987**, *327*, 524.
- Ignarro, L. J.; Buga, G. M.; Wood, K. S.; Byrnes, R. E.; Chaudhuri, G.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1987**, *84*, 9265.
- Palmer, R. M. J.; Ashton, D. S.; Moncada, S.; *Nature (London)* **1988**, *333*, 664.
- Schmidt, H. H. H. W.; Nau, H.; Wittfoht, W.; Gerlach, J.; Prescher, K. E.; Klein, M. M.; Niroomand, F.; Böhme, E.; *Eur. J. Pharmacol.* **1988**, *154*, 213.
- Feldman, P. L.; Griffith, O. W.; Stuehr, D. J.; *Chem. Eng. News* **1993**, *71*, 26.
- The Editors, *Nitric Oxide: Biol. and Chem.* **1997**, *1*, 1.
- Granik, V. G.; Ryabova, S. Y.; Grigoriev, N. B.; *Russ. Chem. Rev.* **1997**, *66*, 717.
- Culotta, E.; Koshland Jr., D. E.; *Science* **1992**, *258*, 1862.
- Butler, A. R.; Williams, D. L. H.; *Chem. Soc. Rev.* **1993**, *22*, 233.
- Shaw, A. W.; Vosper, A. J.; *J. Chem. Soc.; Faraday Trans.* **1977**, *8*, 1239.
- Wise, D. L.; Houghton, G.; *Chem. Eng. Sci.* **1968**, *23*, 1211.
- Wood, J.; Garthwaite, J.; *Neuropharmacology* **1994**, *33*, 1235.
- Kerwin Jr.; J. F.; Lancaster Jr.; J. R.; Feldman, P. L.; *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4343.
- Fukuto, J. M.; Ignarro, L. J.; *Acc. Chem. Res.* **1997**, *30*, 149.
- Beckman, J. S.; Beckman, T. W.; Chen, J.; Marshall, P. A.; Freeman, B. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1990**, *87*, 1620.
- Mayer, B.; Hemmens, B.; *Trends Biochem. Sci.* **1997**, 477.
- Wink, D. A.; Darbyshire, J. F.; Nimes, R. W.; Saavedra, J. E.; Ford, P. C.; *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 23.
- Gaston, B.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 10957.
- Knowles, R. G.; Moncada, S.; *Biochem. J.* **1994**, *298*, 249.
- Bredt, D. S.; Hwang, P. M.; Glatt, C. E.; Lowenstein, C.; Reed, R. R.; Snyder, S. H.; *Nature(London)* **1991**, *351*, 714.
- Mulsch, A.; Bassenge, E.; Busse, R.; *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **1989**, *340*, 767.
- Mayer, B.; Schmidt, K.; Humbert, P.; Böhme, E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**, *164*, 678.
- Weiss, S. W.; Albers, D. S.; Iadarola, M. J.; Dawson, T. M.; Dawson, V. L.; Standaert, D. G.; *J. Neurosci.* **1998**, *18*, 1725.
- Moncada, S. M.; Higgs, A.; Furchgott, R.; *Pharmacol. Rev.* **1997**, *49*, 137.
- Nathan, C.; *FASEB J.* **1992**, *6*, 3051.
- Lancaster Jr, J. R.; *American Scientist* **1992**, *80*, 248.
- Erhart, E. A.; *Elementos de Anatomia Humana*. pp. 121 Atheneu Editora, São Paulo 1973, 4ª edição.
- Mountcastle, V. B.; *Fisiologia Médica- Volume I* pp 153-223, Editora Guanabara Koogan S. A.; São Paulo, 1974, 13ª edição.
- Patrick, G. L.; *An Introduction to Medicinal Chemistry* pp 336, Oxford University Press, Oxford 1995.
- Herman, Z. S.; *Pol. J. Pharmacol.* **1997**, *49*, 1.
- Choi, D. W.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**, *90*, 9741.
- Rand, M. J.; *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **1992**, *19*, 147.
- Pastore, K.; França, V.; *Revista Veja*, **1998**, *13*, 86.
- Rajfer, J.; Aronson, W. J.; Bush, P. A.; Dorey, F. J.; Ignarro, L. J.; *N. Engl. J. Med.* **1992**, *326*, 90.
- Hellstrom, W. J.; Monga, M.; Wang, R.; Domer, F. R.; Kdowitz, P. J.; Roberts, J. A.; *J. Urol.* **1994**, *151*, 1723.
- Ainscough, E. W.; Brodie, A. M.; *J. Chem. Educ.* **1995**, *72*, 686.
- Shuman, E. M.; Madison, D. V.; *Science*, **1991**, *254*, 1503.
- O'Dell, T. J.; Hawkins, R. D.; Kandel, E. R.; Arancio, O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 11285.
- Noltenius, H.; *Fundamentos Biológicos da Patologia Humana* pp 37-38, Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo 1977.
- Poles, C.; *Revista Cláudia* **1998**, *4*, 124.
- Dawson, V. L.; Dawson, T. M.; London, E. D.; Bredt, D. S.; Snyder, S. H.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**, *88*, 6368.
- Nowicki, J. P.; Duval, D.; Poignet, H.; Scatton, B.; *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, *204*, 339.
- Lipton, S. A.; Choi, V. B.; Pan, Z. H.; Lei, S. Z.; Chen, H. S.; Sucher, N. J.; Loscalzo, J.; Singel, D. J.; Stamler, J. S.; *Nature* **1993**, *364*, 626.
- Wu, W.; Liuzzi, F. J.; Schinco, F. P.; Deptie, A. S.; Li, Y.; Mong, J. A.; Dawson, T. M.; Snyder, S. H.; *Neuroscience* **1994**, *61*, 719.
- Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V.; *Nature* **1980**, *288*, 373.
- Griffith, T. M.; Edwards, D. H.; Lewis, M. J.; Newby, A. C.; Henderson, A. H.; *Nature (London)* **1984**, *308*, 645.

47. Cocks, T. M.; Angus, J. A.; Campbell, J. H.; Campbell, G. R.; *J. Cell Physiol.* **1985**, *123*, 310.
48. Rubanyi, G. M.; Lorenz, R. R.; Vanhoutte, P. M.; *Am. J. Physiol.* **1985**, *249*, H95.
49. Martin, W.; Villani, G. M.; Jothianadan, D.; Furchgott, R. F.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1985**, *232*, 708.
50. Furchgott, R. F.; *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endotelium* pp 401- 414, Raven Press, New York 1988.
51. Ignarro, L. J.; Byrns, R. E.; Wood, K. S.; *Vasodilatation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves and Endotelium* pp 427- 436, Raven Press, New York 1988.
52. Fricker, S. P. *Platinum Metals Rev.* **1995**, *39*, 150.
53. Snyder, S. H.; Brecht, D. S.; *Scientific American* **1992**, *May*, 68.
54. Feelisch, M.; Noack, E.; *Eur. J. Pharmacol.* **1987**, *139*, 19.
55. Feelisch, M.; Noack, E.; Schroder, H.; *Eur. Heart J.* **1988**, *9*, 57.
56. Mackaness, G. B.; *J. Exp. Med.* **1969**, *129*, 973.
57. Mackaness, G. B.; *J. Exp. Med.* **1964**, *120*, 105.
58. Stuehr, D. J.; Marletta, M. A.; *Cancer Res* **1987**, *47*, 5590.
59. Hibbs Jr.; J. B.; Vavrin, Z.; Taintor, R. R.; *J. Immunol.* **1987**, *138*, 550.
60. Laurent, M.; Lepoivre, M.; Tenu, J. P.; *Biochem. J.* **1996**, *314*, 109.
61. Kröncke, K.; Feshel, K.; Bachofen, V.; *Nitric Oxide: Biol. and Chem.* **1997**, *1*, 107.
62. Ochiai, E.; *J. Chem. Educ.* **1996**, *73*, 130.
63. Hibbs Jr.; J. B.; Taintor, R. R.; Vavrin, Z.; Granger, D. L.; Drapier, J. C.; Amber, I. J.; Lancaster Jr, J. R.; *Nitric Oxide From L-Arginine: A Bioregulatory System* pp 189-223, Elsevier, Amsterdam 1990.
64. Bone, R. C.; *Ann. Int. Med.* **1991**, *115*, 457.
65. Vallance, P.; Moncada, S.; *New Horizons* **1993**, *1*, 77.
66. Pastor, C. M.; Billiar, T. R.; *New Horizons* **1995**, *3*, 65.
67. Petros, A.; Bennet, D.; Vallance, P.; *Lancet* **1991**, *338*, 1557.
68. Robertson, F. M.; Offner, P. J.; Ciceri, D. P.; Becker, W. K.; Pruitt, B. A.; *Arch Surg.* **1994**, *129*, 149.
69. Kotz, J. C.; Treichel Jr.; P.; *Química e Reações Químicas - Volume I* pp.265, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro 1998.
70. Moncada, S.; Palmer, R. M. J.; Higgs, E. A.; *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 109.