

## 2. O Óxido Nítrico

### 2.1 Introdução

O óxido nítrico (NO), um gás de radical livre, é formado na atmosfera durante tempestades com raios. Foi largamente estudado pelos químicos inorgânicos em reações na atmosfera, pois é um gás potencialmente tóxico, sem cor e poluente, e em processos industriais, mas só recentemente é que se descobriu a importância do NO para os organismos vivos. O NO é também formado numa reação catalisada por enzimas entre o oxigênio molecular e a L-arginina em mamíferos, bem como em espécies mais primitivas.

O óxido nítrico é uma molécula pequena, relativamente instável. É um radical livre que, dependendo da sua quantidade pode ter efeitos benéficos ou maléficos sobre o organismo. Sabe-se que o NO atua como mecanismo fundamental de sinalização nos sistemas cardiovascular e nervoso e desempenha a função de defesa do hospedeiro. Uma das funções fisiológicas do NO foi inicialmente descoberta na vasculatura, quando foi demonstrado que o fator de relaxamento derivado do endotélio, descrito por Furchgott e Zawadzki, em 1980, podia ser explicado pela formação de NO pelas células endoteliais. Foi descoberto, independentemente, que o NO é o ativador endógeno da guanilato ciclase solúvel, resultando na formação de GMP cíclico (cGMP), que atua como segundo mensageiro em muitas células, incluindo nervos, músculo liso, monócitos e plaquetas. O NO compartilha várias propriedades com o O<sub>2</sub>, em particular sua alta afinidade pelo grupo heme e por outros grupos de ferro-enxofre. Isto é importante para a ativação da guanilato ciclase, que contém um grupo heme, e para a inativação do NO pela hemoglobina (Rang et al., 2001; Feldman et al., 1993 e Moncada e Higgs, 1993).

## **2.2**

### **Biossíntese do óxido nítrico**

As enzimas NO sintetases (NOS) são fundamentais para o controle da biossíntese do NO. Existem três principais isoformas conhecidas da NOS: uma forma indutível (expressa nos macrófagos e células de Kupffer, neutrófilos, fibroblastos, músculo liso vascular e células endoteliais em resposta a estímulos patológicos como microrganismos invasores) e duas formas ditas constitutivas, que estão presentes em condições fisiológicas no endotélio e nos neurônios. Essas formas são designadas iNOS, eNOS e nNOS, respectivamente. As NOS são flavoproteínas diméricas, que contêm tetraidrobiopterina e possuem homologia com o citocromo P450. O NO é instável, mas pode formar nitrosotióis mais estáveis, particularmente com um radical de cisteína na globina, de modo que os eritrócitos podem atuar como tampão de NO. É inativado através de combinação com o heme da hemoglobina ou através de oxidação a nitrito e nitrato que é excretado na urina (Rang et al., 2001; Feldman et al., 1993 e Moncada e Higgs, 1993).

#### **2.2.1**

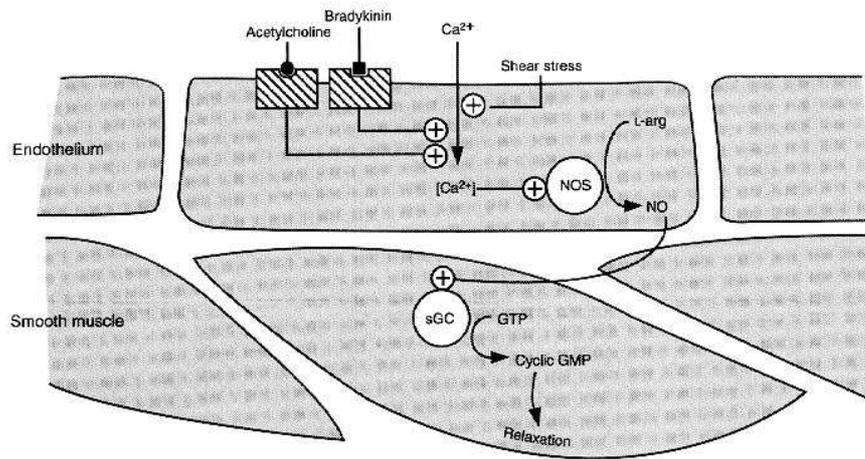
##### **Óxido nítrico no sistema vascular e pulmonar**

No início do século XX, se uma pessoa sofresse de angina, provavelmente seu médico receitaria nitroglicerina. Se o paciente conhecesse a substância (um explosivo) deveria ficar bastante assustado em tê-la de ingerir. O fato é que a nitroglicerina melhorava os sintomas da angina e reduzia a pressão arterial, trazendo conforto ao paciente, porém o mecanismo de ação permaneceu um mistério por muitos anos. Só em 1988 o EDRF, fator relaxante liberado pelo endotélio foi identificado como sendo óxido nítrico. A nitroglicerina funciona doando NO, é um nitrovasodilatador.

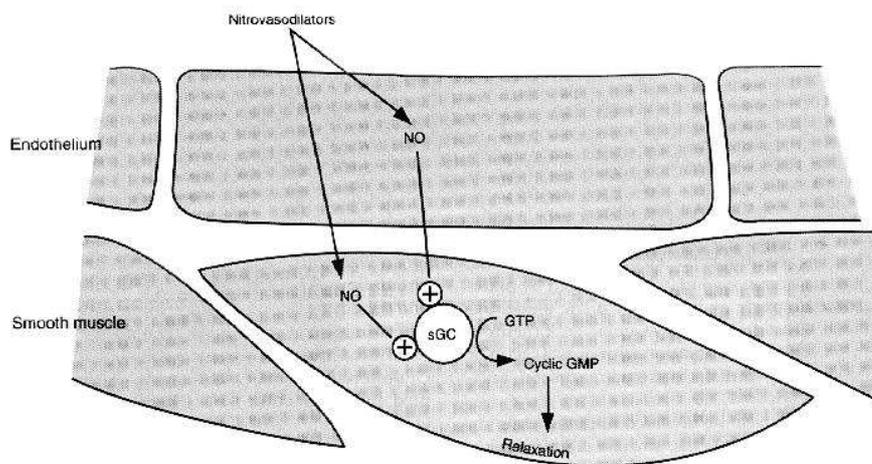
As células do endotélio, formadoras das paredes dos vasos, possuem uma enzima (constitutiva) chamada óxido nítrico sintetase, esta enzima irá catalizar a transformação do aminoácido L-arginina em L-citrulina e NO. Esta catálise será ativada pelo aumento do fluxo de cálcio para o interior da célula, o cálcio e a calmodulina (proteína de baixo peso molecular, que funciona como co-fator para ativar a NOS), irão ligar-se a óxido nítrico sintetase. Esta ligação irá ativá-la e a

catálise da transformação L-arginina em L-citrulina e NO irá ocorrer. Será produzida uma pequena quantidade de NO, porém suficiente para difundir-se para a musculatura lisa. O NO não precisa de transportadores específicos e nem de canais específicos. Ao difundir-se para a musculatura lisa o NO irá ligar-se ao ferro do grupo prostético heme da enzima guanilato ciclase solúvel (GC), e dessa forma a reação da guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclica (cGMP) irá acontecer. A cGMP é responsável pelo relaxamento da musculatura lisa e conseqüente aumento do diâmetro dos vasos sanguíneos, levando ao aumento do fluxo sanguíneo e redução da pressão arterial (Moncada e Higgs, 1993).

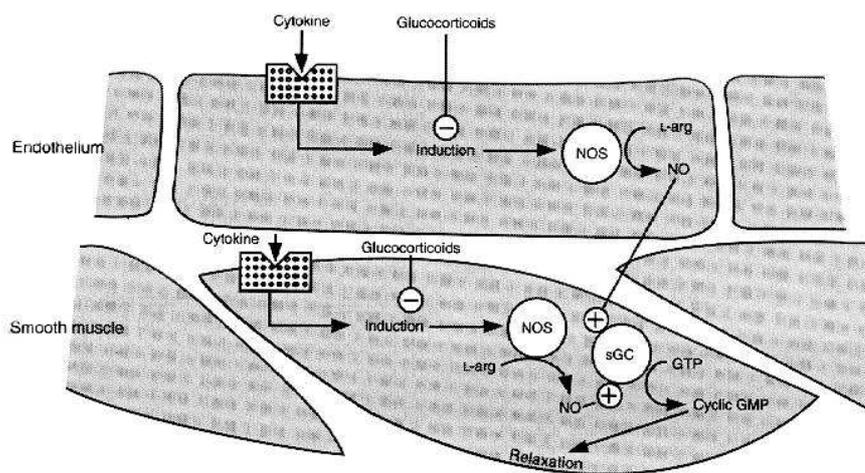
A Fig. 2.1 ilustra o processo. Em A, o aumento da pressão ou ativação de receptores do endotélio vascular por bradiquinina ou acetilcolina resulta no aumento do fluxo de cálcio para o interior da célula. Como conseqüência a NOS é estimulada. O NO formado da L-arginina por esta enzima difunde para as células da musculatura lisa próxima, que estimula a enzima guanilato ciclase solúvel, resultando no aumento da síntese de cGMP da guanosina trifosfato (GTP). Este aumento de cGMP nas células da musculatura lisa leva a sua relaxação. Em B, nitrovasodilatadores como nitroprussiato e nitroglicerina liberam NO, espontaneamente ou através de reações enzimáticas. A liberação de NO estimula a GC na célula da musculatura lisa vascular, resultando na relaxação. Em C, a interação de citocinas com seus receptores nas células endoteliais e da musculatura lisa resulta na indução da óxido nítrico sintetase independente de cálcio. Esta indução é inibida por glucocorticóides. Uma vez induzida, a NOS produz NO continuamente, resultando em ativação continuada da GC e levando à relaxação prolongada, com redução à resposta a vasoconstritores e possível dano aos tecidos. Na Fig. 2.1, sinais de mais (+) indicam estimulação e sinais de menos (-), inibição (Moncada e Higgs, 1993).



A Physiology



B Pharmacology



C Pathophysiology

Figura 2.1 Relaxação Vascular mediada por óxido nítrico (Moncada e Higgs, 1993).

### 2.2.2 Óxido nítrico no sistema nervoso

A produção neuronal de NO é conduzida quando um neurônio ativado, libera um mensageiro químico que difunde para o neurônio vizinho e interage com receptores específicos, que ativam a célula, transmitindo, assim, o impulso nervoso. No exemplo mostrado abaixo, na Fig. 2.2, o mensageiro químico glutamato (um neurotransmissor) é liberado de vesículas no neurônio pré-sináptico e liga-se ao receptor N-metil-D-aspartico (NMDA) do neurônio adjacente. Esta ligação abre um canal no receptor, admitindo  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior da célula, onde se liga a calmodulina, uma proteína de baixo peso molecular que age como uma subunidade para muitas enzimas de  $\text{Ca}^{2+}$ .

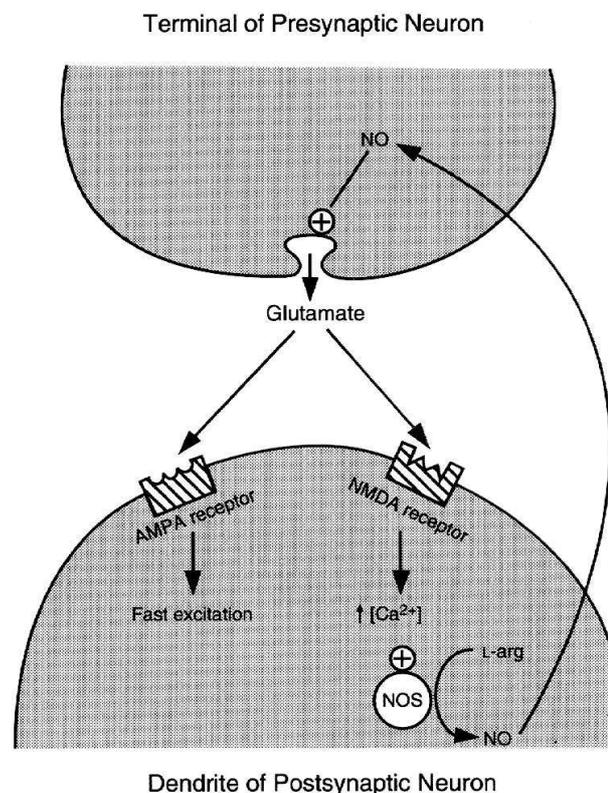


Figura 2.2 O papel do óxido nítrico na potencialização de longo prazo da atividade neuronal (Moncada e Higgs, 1993).

O complexo  $\text{Ca}^{2+}$  / calmodulina liga-se a forma da NOS encontrada nas células nervosas, nNOS. Esta ligação ativa a enzima, que catalisa a oxidação de L-arginina para L-citrulina e NO. O NO formado ativa então outra enzima, guanilato ciclase, pela ligação do ferro do grupo prostético heme da enzima. O NO difunde-

se para o neurônio pré-sináptico para ativar a guanilato ciclase naquela célula. Dessa forma, o NO pode desempenhar um papel importante nos circuitos neurais envolvidos na memória. O NO aumenta a liberação de glutamato no neurônio pré-sináptico, estabilizando a transmissão sináptica (Moncada e Higgs, 1993).

### 2.2.3 Óxido nítrico como agente citotóxico

A forma de NOS encontrada em macrófagos não requer  $\text{Ca}^{2+}$  para ativação. A enzima, chamada de iNOS (i de induzida), é sintetizada como uma nova proteína em resposta a uma mistura de citocinas. A enzima é induzida pelo lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano e/ou citocinas sintetizadas em resposta ao LPS, notavelmente interferon-gama, cujo efeito antiviral é explicado por essa ação. Em resposta ao interferon-gama e ao fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa), que atua de modo sinérgico com o interferon-alfa, seqüências do DNA do macrófago relativas a síntese da iNOS, são transcritas no núcleo para formar o RNA mensageiro, depois de processado, este mRNA é liberado para o citosol, onde será traduzido em proteína pelos ribossomos. Na presença de cofatores apropriados, a cadeia de proteína nascente enovela-se e monta a forma ativa da iNOS. A nova enzima produzida começa imediatamente a converter L-arginina em NO e L-citrulina.

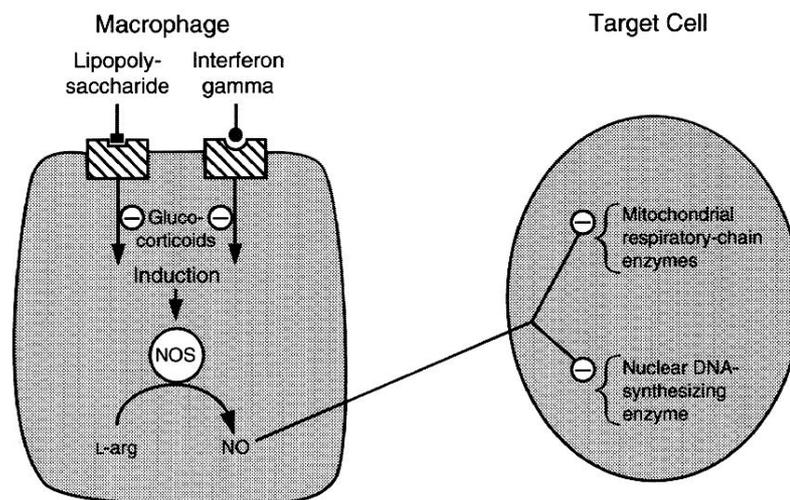


Figura 2.3 Mecanismo de citostase e citotoxicidade induzido por óxido nítrico (Moncada e Higgs, 1993).

Presume-se que o NO difunde-se em todas as direções. A proximidade do macrófago das células do tumor, como mostrado na Fig. 2.3, assegura que parcela significativa de NO entre nas células do tumor, onde irá interferir em diversos processos celulares, incluindo a enzima aconitase, que participa do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA), e complexo I do sistema de transporte de elétrons. Essas interferências diminuem a habilidade da célula formar e usar NADH, levando a diminuição de ATP. NO também inibe a redutase ribonucleotídeo, interferindo com a formação de deoxyribonucleotídeos, necessários para a síntese de DNA e divisão celular (Rang et al., 2001) e (Moncada e Higgs, 1993).

Os mais importantes ativadores da iNOS são : interferon-gama, fator de necrose tumoral-alfa, interleucina-1, interleucina-2, e lipopolisacarídeos, estes não são citocinas, mas um componente da parede celular de bactérias gram-negativas. A indução é inibida pelos glicocorticóides e por outras citocinas, incluindo o fator de crescimento transformador beta (TGF-beta) (Rang et al., 2001) e (Moncada e Higgs, 1993).

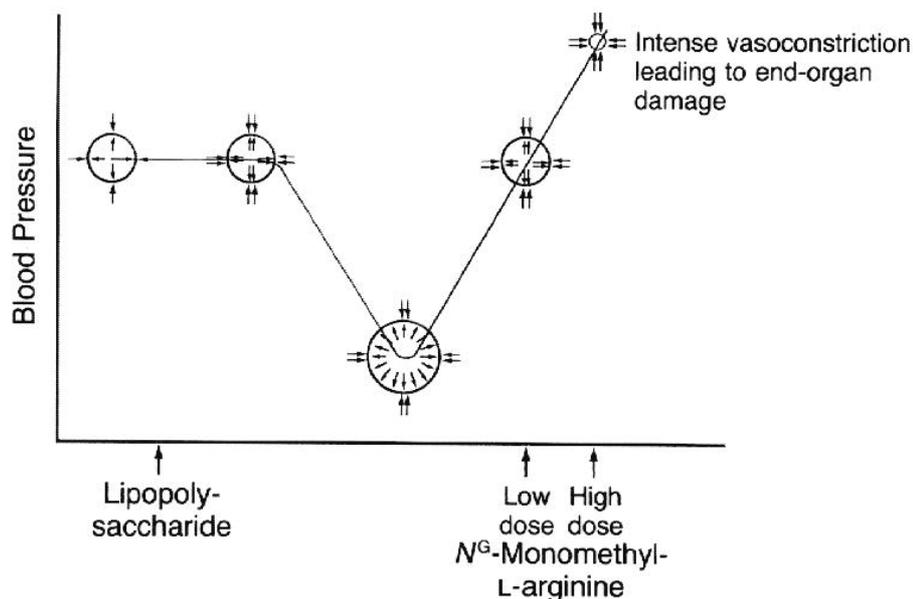


Figura 2.4 Mudanças Vasculares durante o choque séptico e o efeito de N<sup>G</sup> - Monometil-L-Arginina (Moncada e Higgs, 1993).

A Fig. 2.4 mostra mudanças vasculares durante um choque séptico e o efeito da N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina.

Depois da exposição a uma endotoxina (lipopolissacarídeo), há aumento na produção de agentes vasodilatadores (NO – setas internas) e vasoconstritores (vasopressina – setas externas). Eventualmente, as ações da iNOS resultam na produção de NO que supera a ação vasoconstritora e a pressão sanguínea cai. Esta queda pode ser revertida com baixas doses de N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina. Uma alta dose inibe completamente a produção de NO pelas constitutivas e induzidas NOS, levando a uma intensa vasoconstrição, lesão em órgãos e possível morte (Moncada e Higgs, 1993).

### **2.3 Transporte de óxido nítrico**

O NO difunde-se livremente através das membranas celulares, o que explica adequadamente suas ações parácrinas locais sobre o músculo liso vascular ou sobre os monócitos e plaquetas que aderem ao endotélio. O potencial de ação à distância pode ser observado pelo inseto hematófago *Rhodnius prolixus* que produz um vasodilatador/inibidor plaquetário salivar com propriedades de nitrovasodilatador. Este produto consiste numa mistura de hemoproteínas nitrosiladas que se ligam ao NO nas glândulas salivares do inseto, liberando-o depois nos tecidos de sua presa, levando a uma vasodilatação local e a inibição da ativação plaquetária, facilitando assim a extração do sangue (Rang et al., 2001).

Discute-se se existem mecanismos transportadores análogos em mamíferos, como proteínas contendo cisteína e/ou –SH, permitindo a atuação do NO fora do seu local de síntese. Em relação à hemoglobina, quando o NO sofre difusão do endotélio para o sangue, reage rapidamente com o heme, que possui afinidade pelo NO, 10.000 vezes maior que pelo oxigênio. O NO ligado à hemoglobina é inativado na presença de oxigênio, sendo convertido a nitrato, e o ferro hêmico é oxidado a meta-hemoglobina. Porém, sabe-se que o NO pode ligar-se reversivelmente à globina através dos grupos sulfidríla reativos de um resíduo de cisteína. É possível que a hemoglobina S-nitrosilada esteja envolvida na transdução de atividades relacionadas ao NO, como também outras proteínas do sangue que podem sofrer nitrosação (por exemplo, a albumina), controlando a resistência vascular e a pressão arterial, Todas essas possibilidades são muito debatidas atualmente (Rang et al., 2001).