

Revisão sobre óxido nítrico

Recebido em 06/02/03
Aceito para publicação em 05/05/03

Nitric oxide revision

Luci Maria Sant'Ana Dusse
Lauro Mello Vieira
Maria das Graças Carvalho

unitermos	resumo
Óxido nítrico	<p>O óxido nítrico (NO) é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado. Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais. Atualmente, o NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Este radical é produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima NO-sintase constitutiva (c-NOS) e induzível (i-NOS). O NO apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo. Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. Constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o NO é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante. A determinação laboratorial do NO é complexa, e a caracterização de ativadores e inibidores específicos da síntese de NO constitui o novo desafio para o entendimento e o tratamento de várias doenças. Estudos envolvendo o NO têm sido um dos principais alvos da indústria farmacêutica.</p>
Óxido nítrico sintase	
Radicais livres	
Estresse oxidativo	

abstract

key words

Nitric oxide (NO) is an inorganic and incolor free radical gas containing seven electrons from nitrogen and eight from oxygen and one unpaired electron. Until middle of 1980 decade, NO was considered as a member of an undesirable and environmental pollutants family and as a potential carcinogen agents. At the moment, NO constitutes one of the most important mediators of intra and extra cellular processes. This radical is produced from the L-arginine involving a reaction mediated by constitutive and inducible NO synthase. NO presents a dubious role, sometimes it brings benefits, sometimes it is harmful. It is involved in the vascular relaxing and it protects the blood vessels. It constitutes an important cytotoxic mediator on immune activated cells capable of killing pathogenic agents and tumor cells. It also has a role as messenger/modulator in a variety of essential biological processes. However, NO is a potentially toxic agent, whose toxicity could be particularly denoted in stress oxidative conditions, by the generation of O₂ intermediates and antioxidant system deficiency. Laboratory measurement of NO is complex and the characterization of specific activators and inhibitors of the NO synthesis constitutes the new challenge for a better comprehension and treatment of a number of pathologies. NO studies have been one of the main target for pharmaceutical industries.

Nitric oxide
Nitric oxide synthase
Free radical
Stress oxidative

Introdução

O óxido nítrico (NO) constitui uma das menores e mais simples moléculas biossintetizadas (45). O NO é um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, que possui sete elétrons do nitrogênio e oito do oxigênio, tendo um elétron desemparelhado (4).

Até meados da década de 1980, o NO era considerado apenas membro de uma família de poluentes ambientais indesejáveis e carcinógenos potenciais (26). O interesse pelas funções biológicas do NO foi conseqüente ao desfecho, praticamente simultâneo, de três linhas de pesquisa, absolutamente independentes, que culminou com um ponto em comum, o envolvimento desta molécula no processo em questão.

A primeira linha de pesquisa constava da investigação do papel do endotélio vascular no processo de relaxamento do vaso sanguíneo. O interesse por esta questão teve origem nas conclusões de Furchgott e Zawadzki (15) de que a ação de alguns vasodilatadores, como a acetilcolina, era inteiramente dependente da presença do endotélio intacto e envolvia a liberação de um fator essencial para o relaxamento vascular, o qual chamaram de *endothelial-derived relaxing factor* (EDRF). Rapoport e Murad (53) propuseram que o mecanismo pelo qual o EDRF causava o relaxamento vascular era mediado pela guanosina monofosfato cíclica (GMPc). Cerca de sete anos após a descoberta do EDRF, estudos detalhados da sua ação biológica nos vasos (24, 44, 50) e nas plaquetas (52) demonstraram que este composto era idêntico ao NO. Curiosamente, dez anos antes, dois grupos de pesquisadores, Katsuki *et al.* (28) e Schultz *et al.* (57), buscavam um respaldo científico para uma conduta terapêutica introduzida, empiricamente, pela medicina chinesa há mais de cem anos. Tratava-se do uso de nitratos orgânicos e de nitroglicerina como tratamento da *angina pectoris*, da insuficiência cardíaca congestiva, da hipertensão pulmonar e de outras complicações vasculares. Ambos os grupos concluíram que nitratos orgânicos induzem a um aumento dos níveis de GMPc dependente da dose e que estes compostos eram, a princípio, inativos, mas sua metabolização resultava na produção de NO. Posteriormente, esses investigadores concluíram que o NO era a molécula efetora comum a todos os nitrovasodilatadores, que resultava na dilatação das artérias coronárias, melhorava o suprimento sanguíneo ao coração e, conseqüentemente, aliviava os sintomas. Katsuki *et al.* (28) demonstraram que o mecanismo pelo qual estes compostos causavam vasodilatação envolvia a ati-

vação da enzima guanilato ciclase (GC), mediada por NO, e o conseqüente acúmulo de GMPc. É oportuno comentar que a trinitroglicerina é o composto ativo da dinamite e que, ironicamente, seu inventor, Alfred Nobel, embora relutante, teve que autorizar seu médico a lhe administrar nitroglicerina internamente quando foi acometido por uma crise de angina (59). As conclusões de Katsuki *et al.* (28) e de Rapoport e Murad (53) estabeleceram definitivamente a importância do NO, exógeno ou endógeno, no processo de relaxamento vascular.

A segunda linha de pesquisa tratava da questão da produção de óxidos de nitrogênio pelos mamíferos. Schmidt e Walter (56) relataram que no início do século foi sugerido que os mamíferos produziam óxidos de nitrogênio, quando se demonstrou que a quantidade eliminada destes compostos excedia a quantidade ingerida. Esta observação, entretanto, foi ignorada até o final da década de 1970. Durante todo este período, acreditou-se que óxidos de nitrogênio inorgânicos eram produzidos somente por bactérias, via reações de nitrificação e desnitrificação, e que, em mamíferos, estes compostos derivavam da dieta (61). Bredt e Snyder (59) citaram que a constatação de que o organismo humano era capaz de converter nitrato (NO_3^-) e nitrito (NO_2^-) da dieta em nitrosaminas carcinogênicas, após a reação do NO_2^- com aminas, foi recebida com grande temor, levando a alterações nos hábitos alimentares, de onde *bacon* e outros alimentos curados foram excluídos. Um maior impacto ocorreu quando foi demonstrado que camundongos e seres humanos alimentados com uma dieta pobre em NO_3^- excretavam quantidades substanciais deste composto, comprovando, de modo inquestionável, a produção endógena de NO_3^- nos mamíferos (19). Posteriormente foi demonstrada a produção de NO_3^- em camundongos isentos de germes (19), e um estudo do balanço metabólico comprovou a biossíntese de NO_3^- em homens saudáveis (18).

As observações de que altas concentrações de NO_3^- eram um achado constante em crianças com diarreia aguda de etiologias diversas sugeriram, pela primeira vez, uma associação entre a produção de NO_3^- e o sistema imunológico (21). As observações de que animais portadores de uma deficiência de macrófagos apresentavam baixa excreção de NO_3^- reforçaram a relação entre o sistema imune e NO_3^- (59). Estes dados, aliados à demonstração da produção de NO_3^- e NO_2^- por macrófagos de rato *in vitro*, em resposta ao lipolissacarídeo de *Escherichia coli*, estabeleceram, de forma definitiva, uma associação entre a presença de macrófagos, a resposta imune e a síntese de NO_3^-

(60). Estudos subseqüentes, desenvolvidos por Hibbs *et al.* (22), esclareceram a origem do NO_3^- , estabelecendo a L-arginina como o aminoácido essencial para a sua produção. Esses pesquisadores estudaram os mecanismos envolvidos nas reações citotóxicas mediadas por macrófagos e verificaram que as atividades tumoricida e bactericida dos macrófagos eram dependentes de L-arginina e inibidas por um análogo desta, a N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA). Desta forma, demonstraram que o NO_3^- e o NO_2^- não eram os responsáveis pela citotoxicidade dos macrófagos e sugeriram a existência de um precursor destes compostos na cultura. Palmer *et al.* (49) demonstraram que a L-arginina era o precursor fisiológico do NO nas células endoteliais. Com base nesta informação, vários grupos de investigadores suspeitaram que o NO era o provável precursor da síntese de NO_3^- e NO_2^- em macrófagos. Subseqüentemente, esta hipótese foi comprovada e ficou demonstrado que o NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune (23, 39).

A última linha de pesquisa referida estava associada à investigação do mecanismo de ação de neurotransmissores. Ferrendelli *et al.* (14) demonstraram que o glutamato, um conhecido neurotransmissor, provocava um aumento de GMPc no sistema nervoso central. Miki *et al.* (40) demonstraram a ativação da guanilato ciclase cerebral pelo NO. Nessa mesma época, foi constatada a presença de um fator endógeno, de baixo peso molecular, capaz de ativar a GC em sinaptossomas do cérebro de rato (10, 66). Posteriormente, o ativador endógeno da GC em células de neuroblastoma foi identificado (11). Naturalmente, nessa época não havia, ainda, qualquer conhecimento do NO como molécula mensageira e tampouco da sua formação a partir da arginina. O estabelecimento da via L-arginina:NO(49) e do paralelismo entre síntese de NO e acúmulo de GMPc (53) nas células endoteliais levou vários grupos a pesquisar a existência desta via no sistema nervoso central. Em 1989, foi confirmada a produção de NO no sistema nervoso (6, 30) e demonstrado que o glutamato é o mediador da liberação de NO por receptores N-metil-d-aspartato (NMDA) estimulados (16). No ano seguinte, foi isolada do cerebelo de rato e purificada uma isoforma da enzima responsável pela formação de NO, a óxido nítrico sintase (NOS).

O desfecho comum dessas três linhas de pesquisa fez com que o NO passasse da condição de molécula sem importância biológica e pouco estudada para a de um dos

mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Nas duas últimas décadas, o NO tem sido alvo de uma infinidade de estudos e está constantemente surpreendendo a comunidade científica, dada a quantidade de processos biológicos em que está envolvido.

Síntese e inibição

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (37, 43). Uma variedade de isoformas de NOS tem sido purificada em diferentes tecidos de mamíferos e muitas já tiveram seus genes clonados. Estudos bioquímicos e análise seqüencial de aminoácidos revelaram que estas isoformas representam uma família de proteínas e, aparentemente, são produtos de três genes distintos. Assim, as isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, a NOS constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e a NOS induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (38, 43).

A c-NOS e a i-NOS diferem quanto ao peso molecular, à forma de ativação e à capacidade de síntese de NO (38) e já foram caracterizadas, purificadas e tiveram os genes clonados (5, 35, 48). A isoforma constitutiva compreende a NOS neuronal (n-NOS, tipo I), presente normalmente nos neurônios (6, 30), e a NOS endotelial (e-NOS, tipo III), presente normalmente nas células endoteliais vasculares (43) e nas plaquetas (51). As isoformas da NOS estão esquematizadas na Figura 1.

A c-NOS produz pequenas quantidades de NO, da ordem de nano ou picomols, e sua ativação depende da interação com a calmodulina, que, por sua vez, é contro-

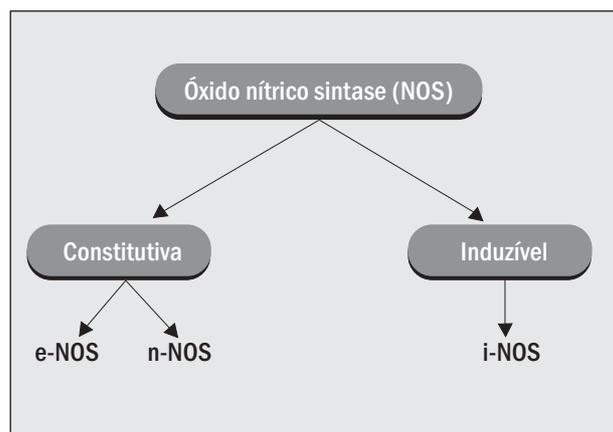


Figura 1 – Isoformas da NO-sintase

lada pelos níveis de Ca^{++} (38, 43). A i-NOS não é expressa sob condições normais, é induzida por citocinas e/ou endotoxinas em uma variedade de células, incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condriócitos, neutrófilos e plaquetas (43). Esta isoforma requer algumas horas para ser expressa, mas, uma vez sintetizada, libera quantidades maiores de NO que a c-NOS e a produção deste continua indefinidamente até que a L-arginina ou os co-fatores necessários para sua síntese sejam depletados ou ocorra a morte celular (13).

A síntese de NO, esquematizada na Figura 2, envolve duas etapas. Na primeira, ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar N^G -hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza NADPH e oxigênio (O_2) e, provavelmente, envolve o complexo heme da NOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em NO e citrulina. Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e a tetraidrobiopterina (BH_4) são utilizados como co-fatores na reação (38, 39).

Todas as isoformas de NOS podem ser inibidas por análogos da arginina N-substituídos, como a N^G -monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-L-ornitina (L-NIO), N^G -amino-L-arginina (L-NAA), N^G -nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o N^G -nitro-L-arginina-metil-éster (L-Name). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estereoespecíficos da NOS (43, 54). Além destes inibidores, a aminoguanidina é também capaz de inibir a NOS e apresenta uma relativa seletividade para i-NOS (61). Vários destes inibidores têm sido utilizados em estudos da função do NO, tanto em células isoladas como *in vivo*.

Mecanismo de ação do NO

NO produzido pela e-NOS

O NO produzido pelas células endoteliais tem um papel essencial no processo de relaxamento do vaso sangüí-

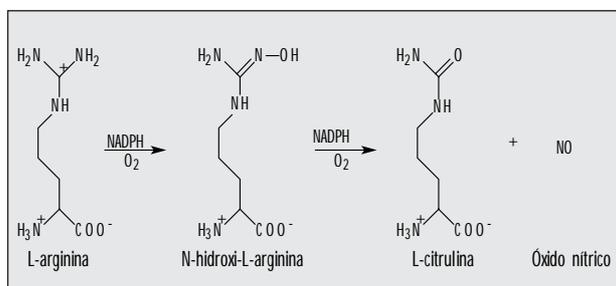


Figura 2 – Reação catalisada pela NO-sintase

neo. Em condições fisiológicas, o relaxamento vascular ocorre quando receptores da membrana das células endoteliais são ativados por estímulos solúveis (incluindo-se acetilcolina, bradicinina, adenosina difosfato, substância P, serotonina e outros) ou quando há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial (*shear-stress*), levando à ativação da e-NOS presente nestas células e à consequente produção de NO (7). A e-NOS está estrategicamente ancorada à membrana da célula endotelial, o que favorece a presença de grandes quantidades de NO próximo à camada muscular do vaso e às células sangüíneas circulantes. Em resposta a agonistas como a bradicina, ocorre a fosforilação da e-NOS, determinando sua translocação para o citosol. Este mecanismo provavelmente tem um papel na regulação da produção de NO *in situ* e na sua atividade biológica (41). O NO produzido na célula endotelial difunde-se rapidamente para a célula muscular e para o lúmen vascular. A difusão rápida e a facilidade com que esta molécula penetra em outras células, graças ao seu pequeno tamanho e à sua característica lipofílica, são cruciais para o entendimento das suas atividades biológicas (43). No interior da célula muscular, o NO interage com o ferro do grupo heme da enzima guanilato ciclase, acarretando uma alteração da conformação desta enzima, tornando-a ativa (GCa). A GCa catalisa a saída de dois grupamentos fosfato da molécula de guanosina trifosfato (GTP), resultando na formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O sistema GC-GMPc parece ter uma importância central para a ação fisiológica do NO (34, 59). A Figura 3 esquematiza a formação de GMPc mediada por NO.

O aumento da concentração de GMPc na célula muscular resulta no relaxamento desta célula. O mecanismo de relaxamento envolve a diminuição da entrada de Ca^{++} para a célula, a inibição da liberação de Ca^{++} do retículo endoplasmático e o aumento do seqüestro de Ca^{++} para o retículo endoplasmático (17). O mecanismo pelo qual o NO é removido da GC após ocorrer a vasodilatação ne-

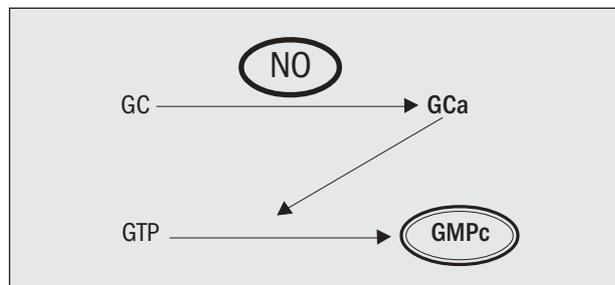


Figura 3 – Formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc), a partir da guanosina trifosfato (GTP), mediada por NO

cessária é desconhecido. Sabe-se que a produção de GMPc é interrompida segundos após a remoção do NO da enzima guanilato ciclase (4).

O NO que deixa a célula endotelial em direção à corrente sanguínea pode penetrar nas plaquetas, especialmente nas que se encontram justapostas à parede do vaso ou nas hemácias. No interior das plaquetas, de modo análogo ao discutido para a célula muscular, o NO promove um aumento de GMPc e a conseqüente diminuição do Ca^{++} livre. Como o Ca^{++} é essencial para o processo de ativação plaquetária, esse processo estará inibido (65). As plaquetas humanas possuem e-NOS e são também produtoras de NO. Tanto o NO oriundo das células endoteliais quanto o produzido endogenamente são importantes no controle da função plaquetária (51, 62). Das *et al.* (9) sugeriram que a propriedade de inibir a agregação plaquetária apresentada pelo alho resulta da sua capacidade de estimular a c-NOS.

Se o NO penetra nas hemácias, ele é eliminado através de sua reação com o ferro da hemoglobina, tanto oxigenada (Hb-O₂) quanto desoxigenada (65).

- $Hb-O_2 + NO \rightarrow \text{Metemoglobina (metHb)} + NO_3^-$
- $Hb + NO \rightarrow \text{Nitrosil-hemoglobina (NO-Hb)}$
- $NO-Hb + O_2 \rightarrow \text{MetHb} + NO_3^-$

Recentemente, o citrato de sildenafil mostrou-se eficaz para tratamento da disfunção erétil. A ação deste medicamento se dá pela inibição potente e seletiva da enzima fosfodiesterase tipo 5 (PDE5), que promove a degradação da GMPc. Assim, o citrato de sildenafil promove a manutenção de níveis elevados de GMPc, responsável pelo relaxamento da musculatura lisa do corpo cavernoso do pênis, facilitando a ereção e mantendo-a por mais tempo.

NO produzido pela i-NOS

O NO resultante da ativação da i-NOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais. A citotoxicidade do NO resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. A base bioquímica para a ação direta do NO consiste na sua reação com metais (especialmente o ferro) presentes nas enzimas do seu alvo (26, 43). Desta forma, são inativadas enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia de transporte de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular. Em processos infecciosos, células ativadas como macrófagos, neutrófilos

e células endoteliais secretam simultaneamente NO e intermediários reativos do oxigênio, e a ação citotóxica indireta do NO consiste, principalmente, na sua reação com esses intermediários do oxigênio. Uma ação tóxica cooperativa de NO e ânion superóxido (O₂⁻) resulta na formação de peroxinitrito (ONOO⁻), um poderoso oxidante de proteínas. O ONOO⁻ pode, posteriormente, protonar-se na presença de íon hidrogênio (H⁺), originando um radical altamente reativo e tóxico, o hidroxil (HO[•]), aumentando efetivamente a ação tóxica do NO e do O₂⁻ (4). A célula produtora de NO e sua vizinhança não estão a salvo da toxicidade dessa molécula, podendo ser destruídas. Evidências estão se acumulando no sentido de admitir que o NO contribui para algumas condições patológicas como asma (20), artrite reumatóide (55), lesões ateroscleróticas (8), tuberculose (47), esclerose múltipla (3), Alzheimer (63) e gastrite induzida por *Helicobacter pylori* (36).

Óxido nítrico e vasoproteção

Atualmente, está bem estabelecido que o NO resultante da e-NOS tem um papel crucial na proteção do vaso sanguíneo. Esta ação está associada a:

Manutenção do tônus vascular

O tônus vascular é normalmente mantido por uma constante liberação de quantidades ínfimas de NO sempre que há um aumento do atrito exercido pelas células circulantes sobre a camada endotelial do vaso (*shear-stress*), resultando em uma discreta vasodilatação (64). Além disso, a pressão sanguínea e o fluxo pulsátil contribuem para regular a liberação de NO em condições fisiológicas (46).

Regulação da pressão sanguínea

Experimentos com modelos animais comprovam que a inibição de NO resulta em um aumento drástico da pressão arterial (46).

Prevenção da agregação plaquetária

Através da elevação da GMPc e da diminuição do Ca^{++} intraplaquetário (62).

Inibição da adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio vascular

A adesão de neutrófilos ao endotélio vascular é um complicador importante para a patogênese da aterosclerose. A adesão depende da expressão de moléculas de adesão na superfície da célula endotelial, como a molécula

la de adesão da célula vascular (VCAM-1), a molécula de adesão intercelular (ICAM), a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1), a selectina e as citocinas. Estas moléculas são expressas quando há um aumento do estresse oxidativo na célula endotelial. Doadores de NO têm mostrado potentes inibidores da adesão de monócitos e neutrófilos à camada endotelial (32).

Efeito antiproliferativo

A proliferação das células da camada muscular do vaso tem um papel-chave no estreitamento da luz vascular. Um estímulo proliferativo é o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF). Nesse processo, as células da camada muscular apresentam alterações importantes da sua função, com perda da atividade contrátil. As células musculares podem migrar para a íntima, contribuindo para a hiperplasia desta. Tem sido demonstrado que o NO produzido pelo endotélio vascular ou oriundo de doadores exógenos é capaz de inibir a proliferação da camada muscular, embora o mecanismo de atividade antiproliferativa não esteja completamente esclarecido (17, 58).

Efeito antioxidativo

O estresse oxidativo do vaso contribui para as doenças tromboembólicas. O NO produzido pela e-NOS induz a produção da enzima superóxido dismutase (SOD) na camada muscular do vaso e extracelular, diminuindo o O_2^- disponível e, conseqüentemente, a produção de ONOO⁻. O NO também induz a síntese de ferritina, que se liga a íons ferro livres e previne a geração de O_2^- . Por outro lado, na presença da placa aterosclerótica, os macrófagos ativados produzem O_2^- , expressam i-NOS e produzem NO. Desta forma, são produzidos ONOO⁻ e OH⁻, comprometendo, ainda mais, a integridade tissular, favorecendo a ativação da coagulação e contribuindo para a obstrução da luz vascular (65).

Determinação laboratorial de NO

A detecção do NO em amostras biológicas representa um desafio, em função da ínfima concentração e da meia-vida extremamente curta deste composto, cerca de 4 a 6 segundos no plasma e 10 a 60 segundos nos tecidos (2, 29). Diversos métodos utilizando as mais avançadas tecnologias têm sido propostos na literatura para determinação de NO, tanto direta quanto indiretamente, através de ensaios que reflitam a sua presença. A determinação direta de NO é obtida utilizando-se metodologias complexas (como a ressonância eletrônica para- magnética (EPR) e a quimio-

luminescência) e por detecção eletroquímica, utilizando sensores intravasculares (2, 29). A determinação indireta pode ser feita por dosagem plasmática ou urinária de nitrato e nitrito (produtos da reação do NO com o oxigênio), da GMPc, do co-produto (L-citrulina), da detecção de nitrosil hemoglobina (NO-hb) nas hemácias circulantes, da quantificação histoquímica da NOS, da determinação da atividade da NOS, da avaliação de suas ações fisiológicas, como o relaxamento vascular e a inibição da agregação plaquetária, do uso de inibidores da NOS e da detecção de resíduos de 3-nitrotirosina, formados pela ação do ONOO⁻ sobre os resíduos tirosina das proteínas. O *turn-over* de proteínas contendo resíduos 3-nitrotirosina gera resíduos livres de 3-nitrotirosina (2, 12, 29).

Na prática clínica almeja-se encontrar um marcador de inflamação e destruição celular, e a detecção de 3-nitrotirosina por HPLC tem sido um marcador promissor. A dosagem no plasma ou no líquido sinovial de 3-nitrotirosina reflete a exposição ao ONOO⁻ proveniente da reação do NO e O_2^- (27).

Considerações finais

O NO derivado das células endoteliais é atualmente considerado essencial para a homeostase vascular e tem sido o alvo para a prevenção de doenças cardiovasculares. O NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema imune. Tem um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o NO é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante.

O uso de inibidores de NO tem mostrado um efeito benéfico em várias patologias. Na artrite induzida experimentalmente em animais, ocorre uma atenuação dos sinais clínicos e histológicos da doença (42). Na glomerulonefrite, há uma diminuição da deposição de complexos imunes nos rins, levando a uma considerável melhora clínica (42). No diabetes dependente de insulina (tipo I), induzido imunologicamente, estudos demonstraram que a destruição de células pancreáticas beta é mediada pelo NO e as primeiras tentativas de inibir a i-NOS foram animadoras (31). No transplante renal, foi obtida uma melhora substancial dos sinais clínicos de rejeição após a inibição seletiva da i-NOS (1). No choque séptico, a inibição seletiva da i-NOS foi benéfica (61).

O campo está aberto para investigação do papel do NO em circunstâncias diversas, e o número de publicações relacionadas a esta molécula tem aumentado exponencialmente. A determinação de ativadores e ini-

bidores específicos da síntese de NO constitui o novo desafio para o entendimento e o tratamento de várias doenças, e tem sido um dos principais alvos da indústria farmacêutica.

Referências

- Albrecht, E.W.J.A. et al. Nitric oxide production and nitric oxide synthase expression in acute human renal allograft rejection. *Transplantation*, 70(11): 1610-6, 2000.
- Archers, S. Measurement of nitric oxide in biological models. *FASEB J.*, 7: 349-60, 1993.
- Bagasra, O. et al. Activation of inducible form of Inducible nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92: 12041-5, 1995.
- Beckman, J.S. & Koppenol, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am. J. Physiol.*, 271: C1424-37, 1996.
- Bredt, D.S. & Snyder, S.H. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 87: 682-685, 1990.
- Bredt, D.S. & Snyder, S.H. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 9030-3, 1989.
- Busconi, L. & Michel, T. Endothelial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem.*, 268(12): 8410-3, 1993.
- Buttery, L.D.K. et al. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. *Lab. Invest.*, 85: 75-7, 1996.
- Das, I. et al. Nitric oxide synthase activation is a unique mechanism of garlic action. *Biochem. Soc. Trans.*, 23: 136s, 1995.
- Deguchi, T. Endogenous activating factor for guanylate cyclase in synaptosomal soluble fraction of rat brain. *J. Biol. Chem.*, 252: 7617-9, 1977.
- Deguchi, T. & Yoshioka, M. Arginine identified as an endogenous activator for soluble guanylate cyclase from neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.*, 257:10147-52, 1982.
- Dusse, L.M.S. Óxido nítrico (NO): o desafio de sua determinação. *Laes & Haes*, 1: 176-84, 1998.
- Dusting, G.J. & MacDonald, P.S. Endogenous nitric oxide in cardiovascular disease and transplantation. *Ann. Med.*, 27: 395-406, 1995.
- Ferrendelli, J.A. et al. Elevation of cyclic GMP levels in central nervous system by excitatory and inhibitory amino acids. *J. Neurochem.*, 22: 535-40, 1974.
- Furchgott, R.T. & Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 288: 373-6, 1980.
- Garthwaite, J. et al. NMDA receptor activation induces nitric oxide synthesis from arginine in rat brain slices. *Eur. J. Pharmacol.*, 172: 413-6, 1989.
- Gewaltig, M.T. & Kojda, G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potencial. *Cardiovasc. Research*, 55: 250-60, 2002.
- Green, L.C. et al. Nitrate biosynthesis in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 78: 7764-8, 1981a.
- Green, L.C. et al. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*, 212: 56-8, 1981.
- Hamid, Q. et al. Induction of nitric oxide synthase in asthma. *Lancet*, 342: 1510-3, 1993.
- Hegesh, E. & Shiloah, J. Blood nitrates and infantile methemoglobinemia. *Clin. Chim. Acta*, 125: 107-42, 1982.
- Hibbs, J.B. et al. L-arginine is required for the expression of the activated metabolic in target cells. *J. Immunol.*, 138: 550-65, 1987.
- Hibbs Jr., J.B. et al. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 157: 87-94, 1988.
- Ignarro, L.J. Endothelium derived relaxing factor from pulmonary artery and vein possesses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ. Res.*, 61: 866-79, 1987.
- Ignarro, L.J. Signal transduction mechanisms involving nitric oxide. *Biochem. Pharmacol.*, 41(4): 485-90, 1991.
- James, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. *Microbiol. Rev.*, 59(4): 533-47, 1995.
- Kamisaki, Y. Sensitive determination of nitrotyrosine in human plasma by isocratic high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B.*, 685: 343-7, 1996.
- Katsuki, S.A. et al. Stimulation of guanylate cyclase by sodium nitroprusside, nitroglycerin and nitric oxide in various tissue preparations and comparison to the effects of sodium azide and hydroxylamine. *J. Cyclic. Nucleotide Res.*, 3: 23-5, 1977.
- Kiechle, F.L. & Marlinski, T. Nitric oxide: biochemistry, pathophysiology and detection. *Am. J. Clin. Pathol.*, 100: 567-75, 1993.
- Knowles, R.G. et al. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: a transduction mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 86: 5159-62, 1989.
- Kröncke, K.D. Nitric oxide: Cytotoxicity versus cytoprotection – How, why, when and where? *Nitric oxide: Biology and Chemistry*, 1: 107-20, 1997.
- Kubes, P. et al. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 88: 4651-5, 1991.
- Kuo, P.C. & Schroeder, R.A. The emerging multifaceted roles of nitric oxide. *Ann. Surgery*, 221(3): 220-5, 1995.
- Lenhinger, A.L. *Princípios de bioquímica*. São Paulo: Sarvier, 1986.
- Lyons, C.R. et al. Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line. *J. Biol. Chem.*, 267: 6370-4, 1992.

36. Mannick, E.E. *et al.* Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effects of antibiotics and antioxidants. *Cancer Res.*, 43: 3238-43, 1996.
37. Marletta, M.A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J.Biol.Chem.*, 268(17): 12231-4, 1993.
38. Marletta, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. *Cell*, 78: 927-30, 1994.
39. Marletta, M.A. *et al.* Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry*, 27: 8706-11, 1988.
40. Miki, N. *et al.* Activation of cerebral guanylate cyclase by nitric oxide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 75: 851-6, 1977.
41. Michel, T. *et al.* Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90: 6252-6, 1993.
42. Moilanen, E. & Vappatalo, H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann. Med.*, 27: 359-67, 1995.
43. Moncada, S. *et al.* Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Reviews*, 43(2): 109-42, 1991.
44. Moncada, S. *et al.* Endothelium-derived relaxing factor: identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem. Pharmacol.*, 37: 2495-501, 1988.
45. Morris, S.M. & Billiar, T.R. New insights into regulation of inducible nitric oxide synthesis. *Am. J. Physiol.*, 266: E829-39, 1994.
46. Nava, E. & Lüscher, T.F. Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: nitric oxide and endothelin. *J. Hypert.*, 13(suppl. 2): S39-48, 1995.
47. Nicholson, S. *et al.* Inducible nitric oxide synthase pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J. Exp. Med.*, 183: 2293-302, 1996.
48. Nishida, K. *et al.* Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial nitric oxide synthase. *J. Clin. Invest.*, 90: 2092-6, 1992.
49. Palmer, R.M.J.; Ashton, D.S. & Moncada, S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 333: 664-6, 1988.
50. Palmer, R.M.J. *et al.* Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 327: 524-6, 1987.
51. Radomski, M.W. *et al.* An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 5193-7, 1990.
52. Radomski, M.W. *et al.* Comparative pharmacology of endothelium-derived relaxing factor, nitric oxide and prostacyclin in platelets. *Br. J. Pharmacol.*, 92: 181-7, 1987.
53. Rapoport, R.M. & Murad, F. Agonist induced endothelium-dependent relaxation in rat thoracic aorta may be mediated through cyclic GMP. *Circ. Res.*, 52: 352-7, 1983.
54. Rees, D.D. *et al.* Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, 101: 746-52, 1990.
55. Sakurai, H. *et al.* Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthritides. *J. Clin. Invest.*, 96: 2357-63, 1995.
56. Schmidt, H.H.H.W. & Walter, U. NO at work. *Cell*, 78: 919-25, 1994.
57. Schultz, K.D. *et al.* Sodium nitroprussiate and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rat ductus deferent. *Nature*, 265: 750-1, 1977.
58. Scott-Burden, T. & Vanhoutte, P.M. The endothelium as a regulator of vascular smooth muscle proliferation. *Circulation*, 87(suppl. 5): 51-5, 1993.
59. Snyder, S.H. & Bredt, D.S. Biological roles of nitric oxide. *Scientific American*, may: 28-35, 1992.
60. Stuehr, D.J. & Marletta, M.A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 7738-42, 1985.
61. Szabó, C. Alterations in nitric oxide in various forms of circulatory shock. *New Horizons*, 3(1): 2-32, 1995.
62. Vasta, V. *et al.* Identification of a specific transport system for L-arginine in human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 206(3): 878-84, 1995.
63. Vodovotz, Y. *et al.* Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. *J. Exp. Med.*, 33: 1425-33, 1996.
64. Wennmalm, A. Endothelial nitric oxide and cardiovascular disease. *J. Int. Med.*, 235: 317-27, 1994.
65. Wolin, M.S. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20: 1430-42, 2000.
66. Yoshikawa, K. & Kuriyama, K. Characterization of cerebellar guanylate cyclase using N-methyl-N'-nitro-N-nitroguanidine. Presence of two types of guanylate cyclase in soluble and particulate fractions. *Biochim. Biophys. Acta*, 157: 87-94, 1988.

Endereço para correspondência

Luci Maria Sant'Ana Dusse
 Av. Olegário Maciel 2360/608 - Lourdes
 CEP 30180-112 - Belo Horizonte-MG
 e-mail: lucim@farmacia.ufmg.br