

**ÓXIDO NÍTRICO: PROPRIEDADES E POTENCIAIS USOS TERAPÊUTICOS****Ricardo de L. Barreto e Carlos Roque D. Correia\***

Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, CP 6154, 13084-971 Campinas - SP

**Marcelo N. Muscará**

Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 05508-900 São Paulo - SP

Recebido em 30/9/04; aceito em 29/3/05; publicado na web em 24/8/05

NITRIC OXIDE: PROPERTIES AND THERAPEUTIC USE. Nitric oxide (NO) is a substance that acts as a second-messenger and is associated with a number of important physiological functions such as regulation of the vascular tonus, immune modulation and neurotransmission. As a physiological mediator, alteration of its concentration level may cause pathophysiological disfunctions such as hypertension, septic shock and impotence. Possible therapeutic approaches are being developed to control NO levels *in vivo*. We review herein the main physical and chemical properties of NO, its biological functions and available chemical interventions to reduce and increment its physiological concentration levels. Recent developments in the field are also highlighted.

Keywords: nitric oxide; NOS inhibitors; NO-donors.

**HISTÓRICO**

A nitroglicerina, ou trinitrato de glicerina (TNG) foi descoberta em 1847 e ficou mundialmente conhecida pelas pesquisas de Alfred Nobel, que descobriu em 1863 uma forma segura para detoná-la: a dinamite. Ironicamente, no final de sua vida, Nobel padecia de *angina pectoris*, uma doença cardiovascular relacionada à deficiência na circulação coronariana, e teve prescrita TNG como vasodilatador no tratamento. No entanto, Nobel não seguiu as recomendações médicas, pois sabia das terríveis dores de cabeça que os operários de sua fábrica sofriam e que, acreditava ele, seriam decorrentes do contato com TNG. Eis aqui suas palavras transcritas literalmente: "Isn't it the irony of fate that I have been prescribed nitroglycerine to be taken internally!"<sup>1</sup>

Em realidade, até a década de 80, pouco se sabia sobre o mecanismo de ação biológica da TNG e outros nitratos orgânicos, o que somente pôde ser elucidado depois da descoberta das diversas funções fisiológicas e fisiopatológicas do óxido nítrico (NO) no organismo humano (a rigor, por se tratar de uma espécie radicalar, o óxido nítrico deveria ser expresso como NO·, contudo, para simplificar o texto, desse ponto em diante, ele será escrito somente como NO). Esta importante descoberta rendeu o prêmio Nobel de 1998 a Furchgott<sup>2</sup>, Ignarro<sup>3</sup> e Murad<sup>4</sup>.

A partir daí, já apareceram na literatura científica mais de 20000 publicações sobre o assunto e este número tem crescido acentuadamente a cada ano. O objetivo deste artigo é divulgar os aspectos mais recentes sobre esta substância tão simples e ao mesmo tempo tão importante: o NO. Serão apresentadas suas propriedades e potenciais usos terapêuticos, com enfoque especial sobre os inibidores da NO sintase (NOS) e doadores de NO.

**PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS DO NO**

As propriedades físicas e químicas do NO foram muito bem discutidas por Gareth Thomas, que reservou um capítulo inteiro de seu livro<sup>5</sup> somente para este tema. Desta forma, nos limitaremos a

fazer aqui apenas um breve resumo dos aspectos mais relevantes.

Em seu estado puro, sob condições normais de temperatura e pressão, o NO é um gás. Sua solubilidade é moderada em água (1,9 mM a 25°C), sendo muito mais solúvel em solventes apolares, tais como hexano (0,13 M a 25°C)<sup>6</sup>. Desta forma, quando presente em sistemas biológicos, o NO tende a se concentrar em ambientes lipofílicos, como membranas e domínios hidrofóbicos de proteínas<sup>7</sup>.

O NO é uma molécula neutra com 11 elétrons na camada de valência, que possui um elétron não-emparelhado. Seu caráter radicalar lhe confere uma alta reatividade (meia-vida de 5 a 10 s *in vitro*)<sup>8</sup>, especialmente frente a outras moléculas paramagnéticas, tais como oxigênio molecular (O<sub>2</sub>) e ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>). O NO pode também complexar-se com metais de transição como o ferro, deslocalizando o elétron desemparelhado para os orbitais *d* vazios do metal.

Tanto na fase gasosa como na fase aquosa, o NO reage com O<sub>2</sub> formando dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>). Este, por sua vez, pode reagir com outra molécula de NO e produzir trióxido de dinitrogênio (N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) ou com o próprio NO<sub>2</sub> (dimerização), gerando tetróxido de dinitrogênio (N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) (Esquema 1; Equações 1 a 3). Estas espécies reagem rapidamente com água, formando íons nitrito e nitrato (Esquema 1; Equações 4 e 5).

Tanto o N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> como o N<sub>2</sub>O<sub>4</sub> são considerados potenciais doadores de nitrosônio (NO<sup>+</sup>)<sup>9</sup>. Este intermediário hipotético pode ser transferido para uma enorme variedade de nucleófilos presentes em biomoléculas (hidroxilas, aminas ou tióis), levando à formação de nitrito, *N*-nitrosaminas e *S*-nitrosotióis respectivamente (Esquema 2; Equações 6 a 8)<sup>10</sup>.

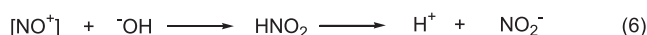
O óxido nítrico pode também reagir com o ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e formar peroxinitrito (ONO<sub>2</sub><sup>-</sup>), o qual, em pH neutro, é protonado rapidamente, formando o ácido peroxinitroso (HONO<sub>2</sub>). Este, por sua vez, é instável e se decompõe rapidamente por duas rotas distintas, produzindo dióxido de nitrogênio, radical hidroxila e íons nitrato (Esquema 3; Equações 9 a 11).

Com base na química envolvida na reação do NO com superóxido, fica evidente que a produção de peroxinitrito, ácido peroxinitroso e seus produtos de decomposição (OH e NO<sub>2</sub>), que são espécies altamente oxidantes, podem ser extremamente danosas às biomoléculas de forma geral, haja visto que são capazes de

\*e-mail: roque@iqm.unicamp.br



Esquema 1. Possíveis reações do NO em solução aquosa



Esquema 2. Possíveis reações do nitrosônio hipotético



Esquema 3. Formação do HONO<sub>2</sub> e sua decomposição

oxidar tióis<sup>11</sup> e bases nitrogenadas do DNA<sup>12</sup>. Por outro lado, muitas proteínas contêm metais de transição em sua estrutura (metalo-proteínas) e podem reagir com NO, formando complexos nitrosil-metálicos<sup>13</sup>. Alguns exemplos são hemoglobina, mioglobina e citocromo oxidase, as quais contêm ferro no grupo heme. Portanto, a exposição a concentrações variáveis de NO pode causar a inibição reversível ou irreversível destas metalo-proteínas.

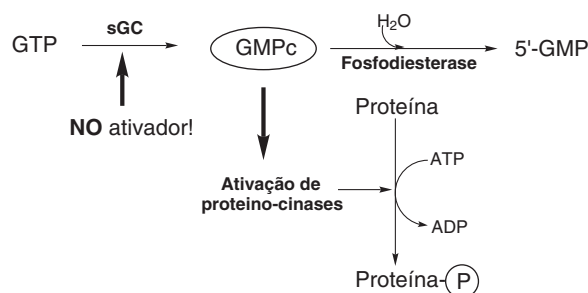
Com todo este potencial toxicológico, como poderia então o NO exercer alguma função biológica?

### Ação biológica do NO

Sua importância fisiológica deve-se ao fato do NO poder atuar como um importante segundo-mensageiro, ativando ou inibindo diversas moléculas-alvo envolvidas em processos tão diversos quanto regulação do tônus vascular, controle imunológico da relação patógeno-hospedeiro e neurotransmissão. Diferentemente de outros mensageiros químicos, o NO não depende de sua “topologia” estrutural para se ligar a um receptor ou enzima, mas sim de sua reatividade redox. Ademais, o NO não é armazenado *in vivo* como outros neurotransmissores, mas sintetizado sobre demanda, difundindo-se rapidamente até seu sítio de ação.

Na área cardiovascular, por ex., o NO liberado pelas células endoteliais é responsável pelo relaxamento do músculo liso adjacente, assim como pela inibição da adesão e agregação plaquetária, através da ativação da enzima guanilato ciclase solúvel (sGC). Esta enzima catalisa a conversão de trifosfato de guanosina (GTP) em

monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), o qual atua ativando diversas proteino-cinases (responsáveis por fosforilações de proteínas a partir de ATP)<sup>14</sup>. A inativação do GMPc ocorre através de sua hidrólise, catalisada por enzimas da família das fosfodiesterases<sup>15</sup> (Esquema 4).

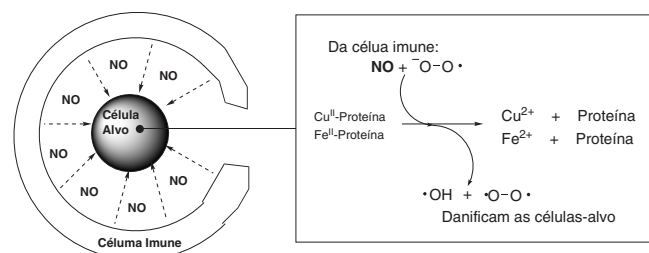


Esquema 4. Representação esquemática da síntese de GMPc, sua função biológica e metabolismo

Em 1978, quando esta hipótese foi levantada, Murad<sup>4</sup> e seus colaboradores não receberam o devido crédito da comunidade científica, pois não se concebia a possibilidade de uma molécula tão reativa como o NO, um conhecido poluente e destruidor da camada de ozônio, ativar uma enzima e atuar como mediador biológico. Entretanto, diversos estudos posteriores demonstraram justamente o contrário... Murad estava certo! Em 1986, de forma independente, Furchgott<sup>2</sup> e Ignarro<sup>3</sup> propuseram que o já conhecido fator de relaxamento derivado do endotélio (EDRF)<sup>16</sup> era realmente o óxido nítrico.

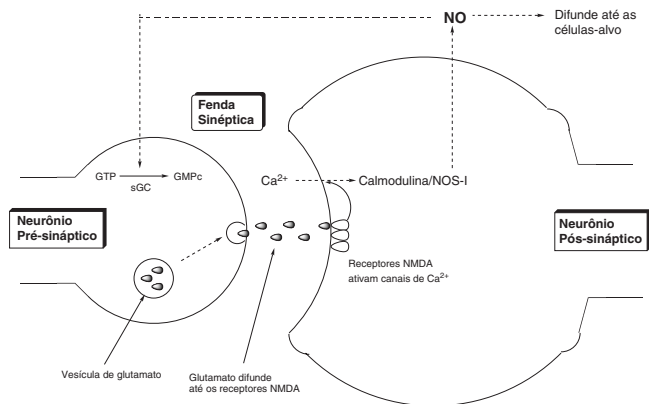
Por outro lado, no sistema imunológico, o óxido nítrico é produzido em quantidades significativas durante a resposta inflamatória por macrófagos e outras células do sistema imune, que expressam a isoforma induzível (ou tipo II) da NO sintase (NOS). O NO gerado nestas circunstâncias ocasiona “danos oxidativos” letais às células-alvo, tais como células cancerosas ou bactérias. O NO “ataca” as metalo-proteínas contendo cobre e ferro, liberando seus íons metálicos e ocasionando a formação de radicais hidroxila e oxigênio molecular, que possuem elevado potencial oxidante (Esquema 5). Várias observações corroboram esta proposição, dentre elas pode-se citar um dos trabalhos pioneiros de Hibbs<sup>17</sup>, que atesta a dependência de L-arginina (L-Arg) por parte de macrófagos ativados citotóxicos (CAMs) para exercerem sua atividade.

No sistema nervoso central (SNC) e periférico, a função do óxido nítrico ainda não está muito bem elucidada. Além do NO atuar como neurotransmissor, ele media a “plasticidade” sináptica<sup>18</sup> (capacidade de modulação e adaptação das sinapses para transmissão do impulso nervoso) e facilita a liberação de outros neurotransmissores e hormônios<sup>19</sup>. Até o presente momento, as evidências sugerem que o NO tem sua ação iniciada pelo glutamato, uma outra substância neurotransmissora liberada quando da transmissão do impulso nervoso no terminal pré-sináptico. O glutamato difunde-se na fenda sináptica, ligando-se aos receptores do tipo



Esquema 5. Representação esquemática da ação do óxido nítrico no sistema imune

NMDA (*N*-metil-D-aspartato) no terminal pós-sináptico. Estes receptores estão acoplados a canais de íons cálcio e sua ativação permite o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  para o interior do terminal pós-sináptico, onde o  $\text{Ca}^{2+}$  se associa à calmodulina e ativa a enzima NO sintase neuronal (ou NOS-I), promovendo a formação de NO. A partir daí, existem diferentes proposições de como o NO pode exercer sua função neurotransmissora. Uma delas sugere que o NO se difunde até o terminal pré-sináptico e estimula a formação de GMPc a partir de GTP pela enzima sGC. O GMPc desencadeia então o processo de fosforilação pelas proteino-cinases (Esquema 6).



**Esquema 6.** Representação esquemática do mecanismo de ação do NO como neurotransmissor

Não obstante, assim como acontece com qualquer outra molécula mensageira, uma alteração nos níveis de concentração do NO endógeno (deficiência ou excesso), pode ser a causa de vários processos fisiopatológicos. Em alguns casos, a deficiência na produção de NO pode resultar em hipertensão, angina e impotência, em outros, sua superprodução pode ocasionar respostas inflamatórias severas, sepse, choque circulatório ou até mesmo infarto. Nesse sentido, emergem duas abordagens terapêuticas distintas para o tratamento destas doenças. No caso da superprodução de NO, a utilização de inibidores da NO sintase (NOS), enzima responsável pela sua biossíntese, pode diminuir sua biodisponibilidade, enquanto que, na sua falta, o uso de doadores de NO pode elevar sua biodisponibilidade.

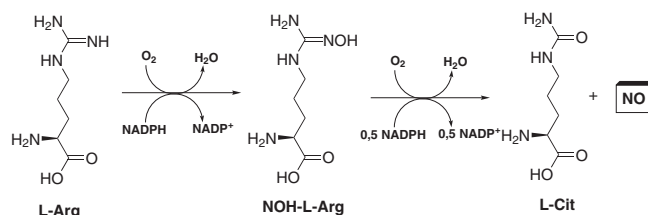
### Inibidores da NO Sintase

Está satisfatoriamente comprovado que diversas doenças estão relacionadas à superprodução de NO, tais como inflamações<sup>20</sup> e choque circulatório<sup>21</sup>. Uma das possíveis abordagens terapêuticas, com o intuito de se diminuir o nível de NO endógeno, consiste na utilização de inibidores seletivos das isoformas da NO sintase (NOS). Desta forma, o entendimento do mecanismo de ação enzimático e a elucidação estrutural da NOS (cristalografia de raios x) são extremamente importantes para desenvolvimento de novos inibidores mais potentes e seletivos, que possam vir a ser utilizados como futuros agentes terapêuticos.

### NO Sintase (NOS)

A família de enzimas NO sintases (NOS) é responsável pela oxidação da L-arginina (L-Arg) a L-citrulina (L-Cit) com geração de NO. Esta reação provavelmente ocorre em duas etapas<sup>22</sup>, ambas envolvendo heme-oxidações com a participação de cinco elétrons ao todo. Primeiramente, a L-Arg é hidroxilada ao intermediário L-*N*<sup>G</sup>-hidroxil-arginina (NOH-L-Arg; a nomenclatura *N*<sup>G</sup> significa que o grupo hidroxila está ligado ao nitrogênio do grupo guanidina), através de uma oxidação análoga àquelas catalisadas por citocromo P450. Em

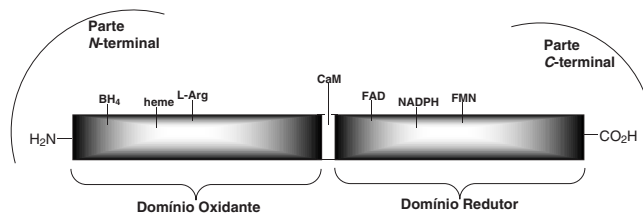
seguida, o NOH-L-Arg é convertido em L-Cit e NO por um mecanismo não usual, envolvendo oxidação pela perda de um único elétron (Esquema 7).



**Esquema 7.** Oxidação da L-Arg a L-Cit catalisada pela NOS

Ambos os passos requerem oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) e fosfato de nicotinamida-adenina dinucleotídeo (NADPH) como co-substratos, além de tetraidrobiopterina ( $\text{BH}_4$ ), flavina-adenina dinucleotídeo (FAD), flavina mononucleotídeo (FMN) e ferroprotoporfirina IX (heme) como cofatores<sup>23</sup>.

Em termos estruturais e funcionais, a família da NOS (EC 1.14.13.39, catálogo enzimático) compreende três isoenzimas distintas: as isoformas endotelial (eNOS ou NOS-III) e neuronal (nNOS ou NOS-I), ambas constitutivas e dependentes de  $\text{Ca}^{2+}$ -calmodulina (CaM), e uma isoforma induzível (iNOS ou NOS-II). Estas três isoenzimas apresentam grande homologia estrutural, podendo ser divididas em dois domínios: um redutor, na parte C-terminal, e outro oxidante, na parte N-terminal. No domínio redutor estão os sítio de ligação para o NADPH e os cofatores FAD e FMN, os quais transferem elétrons para o grupo heme, localizado no domínio oxidante, onde também se ligam o  $\text{BH}_4$  e o substrato L-Arg (Figura 1).



**Figura 1.** Representação pictórica da enzima NOS

Todas as três isoformas da NOS são funcionais somente como estruturas diméricas, através da interação entre seus domínios. É importante observar que, entre os domínios N-terminal e C-terminal, fica situado o sítio de ligação do  $\text{Ca}^{2+}$  à calmodulina (CaM), o qual serve num mecanismo alostérico (em que a interação de um ligante num sítio específico é influenciada pela interação de um outro ligante em sítio distinto), responsável pelo alinhamento do domínio redutor com o domínio oxidante, o que permite a transferência de elétrons das flavinas para o grupo heme<sup>24</sup>.

A estrutura tridimensional da NOS complexada com L-Arg foi obtida pela primeira vez a partir da iNOS de ratos, através de cristalografia de raios x em 1998 por Crane e colaboradores<sup>25</sup>, logo seguida das estruturas da iNOS<sup>26</sup> e eNOS<sup>27</sup> humanas. Entre várias outras coisas, foi revelado que o substrato se liga ao sítio ativo da enzima pelos grupos guanidino e carboxilato da L-Arg, através de uma complexa rede de ligações de H. Além disso, há fortes evidências de que existem diferenças significativas entre as isoformas da NOS, o que sugere, pelo menos em princípio, que é possível a inibição seletiva de uma determinada isoforma em detrimento das outras.

### Inibidores seletivos da NOS

Do ponto de vista terapêutico, a inibição seletiva de uma das

isoformas da NOS é extremamente desejável. Nesse sentido, a abordagem mais promissora tem sido a obtenção de análogos estruturais do substrato natural (L-Arg), que atuam como inibidores reversíveis da NOS.

Em 2001, Kikelj e colaboradores<sup>28</sup> publicaram uma excelente revisão sobre substâncias miméticas da L-Arg, suas sínteses e aplicações clínicas. Os primeiros protótipos (Figura 2) começaram a surgir em meados da década de 90, entretanto, apesar de apresentarem boa atividade biológica, não se mostraram muito seletivos perante as isoenzimas da NOS<sup>29</sup>.

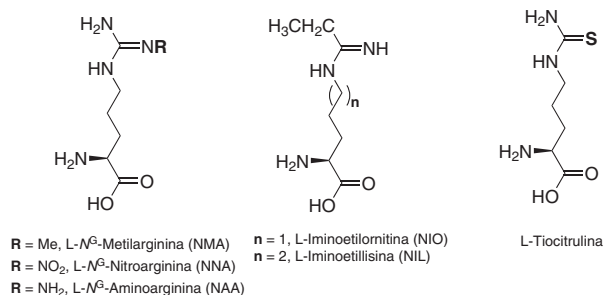


Figura 2. Primeiros exemplos de análogos estruturais da L-Arg

Entre estes primeiros análogos da L-Arg, os melhores resultados foram obtidos com o L-N<sup>G</sup>-Nitro-Arginina (NNA), que teve uma preferência 300 vezes maior pela nNOS em relação à iNOS<sup>30</sup>, e com o L-Imino-etil-Lisina (NIL), cuja seletividade foi 28 vezes maior pela iNOS em relação à nNOS<sup>31</sup>.

Contudo, a possibilidade de inibição seletiva das isoformas da NOS só se tornou viável a partir de 1997 com a síntese do 1400W<sup>32</sup>, apresentando uma inibição 5000 vezes maior da iNOS em relação à eNOS, e da N<sup>ω</sup>-propil-L-arginina<sup>33</sup>, que apresenta uma preferência 3000 vezes maior pela nNOS sobre a iNOS (Figura 3).

Mais recentemente, têm surgido outros inibidores com seletividades distintas à do 1400W. Entre eles, vale a pena citar o dipeptídeo L-Arg<sup>N<sup>O</sup>2</sup>-L-Dbu-NH<sub>2</sub> (Figura 3) preparado por Silverman e colaboradores<sup>34</sup>, que apresentou uma ótima seletividade pela nNOS (1500 vezes com relação à eNOS e 190 vezes se comparado à iNOS). Nessa mesma linha, Wang e colaboradores<sup>35</sup> relataram a N-ciclopropil-N-hidroxiguanidina com preferência de 140 vezes pela nNOS quando comparada à iNOS. Por outro lado, pesquisadores da AstraZeneca<sup>36</sup> relataram uma nova classe de inibidores seletivos da iNOS frente à eNOS (3700 vezes), todos derivados da quinazolinamina (Figura 3), os quais foram testados com sucesso em modelos *in vivo* de artrite inflamatória.

Apesar da síntese de compostos com elevadas seletividades, os estudos de cristalografia de raios x<sup>25-27</sup> das isoformas da NOS revelaram que as estruturas tridimensionais de seus sítios ativos são muito semelhantes, com diferenças sutis, tais como a troca de um aminoácido. Desta forma, à medida que um inibidor se aproxima das cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos, a mudança de uma carga negativa por um grupo neutro, por ex., pode ser responsável pela seletividade observada.

No caso do dipeptídeo L-Arg<sup>N<sup>O</sup>2</sup>-L-Dbu-NH<sub>2</sub><sup>34</sup>, por ex., propôs-se um modelo hipotético de ligação do inibidor ao sítio ativo da nNOS, em que três importantes interações (duas iônicas e uma ligação de hidrogênio entre os grupos amino do dipeptídeo e os resíduos carboxilato da enzima) são fundamentais para a atividade inibitória (Figura 4).

### Síntese de análogos estruturais da L-Arg

Em termos sintéticos, os análogos estruturais da L-Arg podem

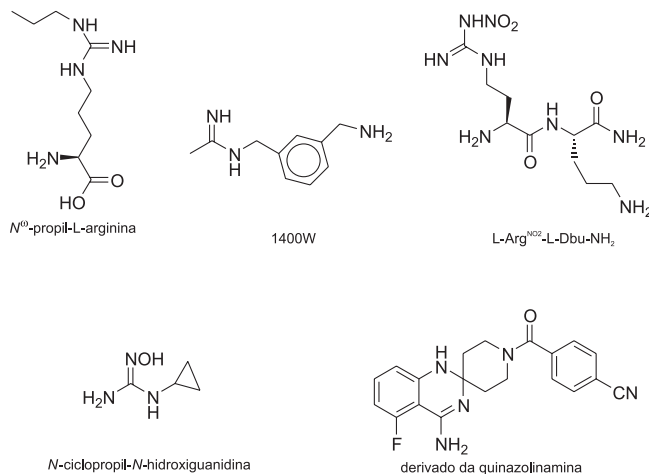


Figura 3. Exemplos de inibidores da NOS com certa seletividade.

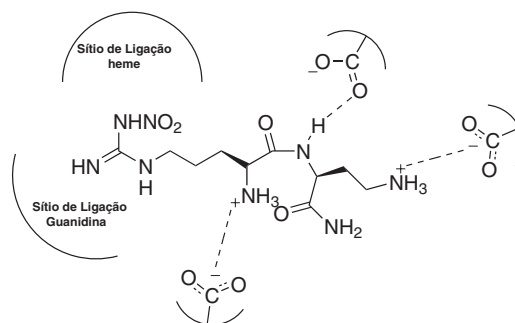


Figura 4. Modelo hipotético de interação do dipeptídeo L-Arg<sup>N<sup>O</sup>2</sup>-L-Dbu-NH<sub>2</sub> com o sítio ativo da nNOS

ser obtidos, na sua grande maioria, através de transformações químicas usuais a partir do aminoácido.

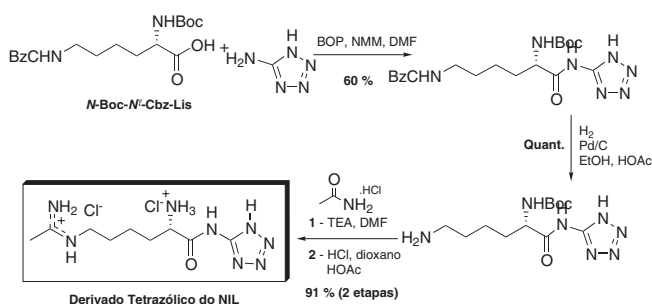
Um exemplo é a síntese de um derivado tetrazólico do NIL<sup>37</sup>, o qual se mostrou muito promissor em estudos pré-clínicos e clínicos de processos inflamatórios, atuando como uma pró-droga (composto inativo que, ao ser metabolizado, é convertido na droga ativa) do NIL e inibindo seletivamente a iNOS.

Este composto foi obtido com rendimento global de 55% para quatro etapas, a partir da L-lisina (L-Lis) protegida, a qual foi inicialmente acoplada com o 5-amino-tetrazol, utilizando-se BOP como agente de acoplamento. A seguir, o grupo protetor Cbz foi removido quantitativamente, através de uma reação de hidrogenólise e a formação do grupo amidina deu-se pela reação com hidrócloro de metilacetimidato. Por fim, o grupo protetor Boc foi removido em condições ácidas, levando à amida tetrazólica de interesse (Esquema 8).

### Análogos estruturais da L-Arg com restrições conformacionais

Uma outra linha de pesquisas muito explorada para conhecimento da relação estrutura-atividade (SAR) da NOS é o uso de análogos estruturais da L-Arg com restrições conformacionais, o que proporciona uma abordagem alternativa para definição das orientações ótimas de ligação do substrato ao sítio ativo da enzima, além de levar a um favorecimento entrópico.

Os primeiros resultados destes estudos, com inibidores derivados *o*-substituídos da fenilalanina<sup>38</sup> (Figura 5), sugerem que o inibidor se liga à enzima preferencialmente em uma conformação torcida, em que os grupos guanidina e ácido carboxílico não estão completamente estendidos.



Esquema 8. Síntese do derivado tetrazólico do NIL

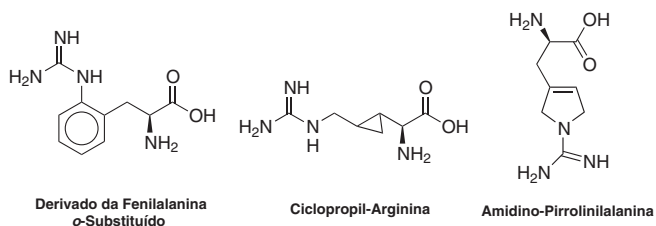


Figura 5. Exemplos de análogos estruturais da L-Arg conformacionalmente restringidos

Algumas outras substâncias também foram obtidas nessa abordagem (Figura 5), dentre as quais destacam-se a ciclopropil-arginina<sup>39</sup> e a amidino-pirrolinilalanina<sup>40</sup>, sendo a última também descrita como um potente inibidor da trombina.

Estes compostos são preparados a partir dos respectivos aminoácidos naturais, como, por ex., o derivado *p*-substituído da fenilalanina<sup>41</sup> (Esquema 9), cuja síntese se iniciou pela nitração e proteção da L-fenilalanina. Em seguida, uma redução catalítica do grupo nitro levou à amina correspondente, a qual foi condensada com *N,N*-bis(Boc-1-guanil)pirazol, produzindo a guanidina protegida. A simples remoção do grupo protetor Boc proporcionou o derivado da L-Arg de interesse com 99% de excesso enantiomérico e rendimento global de 44% para 5 etapas.

## Doadores de NO

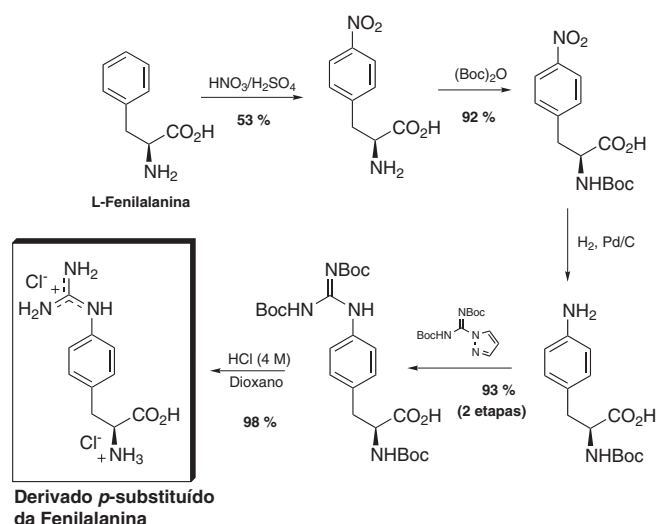
Conforme descrito anteriormente, os nitratos orgânicos, tais como a TNG, já vinham sendo utilizados clinicamente como vasodilatadores há mais de um século. Contudo, seu mecanismo de ação biológica só veio a ser elucidado há pouco mais de 20 anos.

Sabe-se hoje que estes compostos têm potencial liberador de NO *in vivo*, o qual estimula a formação de GMPc, promovendo o relaxamento da musculatura vascular lisa. Mas a questão crucial na época era desvendar como o NO era liberado.

Este processo podia ser facilmente compreendido para compostos nitrosilados, tais como os nitroprussiatos, mas os nitritos e nitratos orgânicos são quimicamente estáveis e deveriam sofrer algum tipo de reação química ou enzimática para poderem liberar NO.

Isto foi constatado por Ignarro<sup>3</sup>, que descobriu a importância do grupo tiol, proveniente da cisteína ou do ditiotreitól, o qual reage com nitritos ou nitratos orgânicos formando *S*-nitrosotióis, que se decompõem liberando NO (Esquema 10). É importante frisar que, provavelmente, estes precursores devem liberar nitrosônio [NO<sup>+</sup>] no meio<sup>9</sup>, o qual deve reagir rapidamente com bons nucleófilos como, por ex., o tiol (Esquema 2, Equação 8)<sup>10</sup>.

Como resultado da intensa pesquisa nesta área, tem havido nos últimos anos um grande ímpeto na descoberta de novos doadores de NO. Devido à grande diversidade de estruturas químicas capazes de gerar NO, estas podem ser divididas em classes, de acordo com os caminhos bioquímicos tomados para sua geração

Esquema 9. Síntese do derivado *p*-substituído da fenilalanina

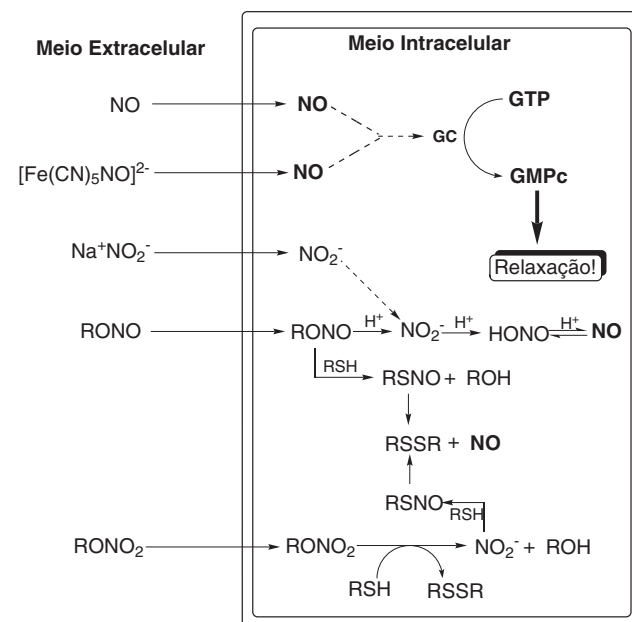
(enzimático ou não-enzimático, redutivo ou oxidativo).

Existem diversas classes de compostos que têm potencial de se decompor e produzir espécies reativas de nitrogênio. Entre elas, pode-se citar os nitritos e nitratos orgânicos, complexos NO-metálicos, *N*-nitrosaminas, *S*-nitrosotióis e *N*-hidroxiguanidinas (Tabela 1).

Recentemente, Wang e colaboradores<sup>42</sup> publicaram uma extensa revisão sobre o assunto, destacando os aspectos mais importantes das classes conhecidas de doadores de NO. Neste trabalho, destacaremos a classe dos nitratos orgânicos, cuja aplicação clínica já foi estudada extensivamente. As estratégias sintéticas para obtenção destes compostos e as tendências no desenvolvimento de novas drogas híbridas serão também abordadas.

## Nitratos orgânicos

Os nitratos orgânicos (RONO<sub>2</sub>) são ésteres do ácido nítrico de álcoois mono ou poli-hidroxilados. Na grande maioria são pouco solúveis em água e apresentam boa estabilidade em condições neu-



Esquema 10. Mecanismos pelos quais os compostos nitrosilados, nitritos e nitratos orgânicos ou inorgânicos liberam NO e relaxam a musculatura lisa

tras ou fracamente ácidas<sup>43</sup>. Entretanto, sob condições fortemente básicas eles podem sofrer hidrólise<sup>44</sup>, levando ao nitrato e ao álcool correspondente, ou então sofrer uma  $\alpha$  ou  $\beta$ -eliminação, fornecendo o aldeído ou nitrito, respectivamente<sup>45</sup>.

Alguns exemplos representativos de nitratos orgânicos doadores de NO (Figura 6) incluem o nicorandil, o dinitrato de isosorbida (DNIS), o já mencionado trinitrato de glicerina (TNG) e o tetranitrato de pentaeritritil (TNPE).

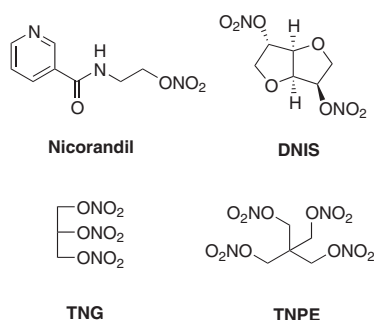


Figura 6. Exemplos de nitratos orgânicos doadores de NO

### Usos clínicos de nitratos orgânicos

Além do conhecido uso da TNG como vasodilatador no tratamento de *angina pectoris*, existem várias outras aplicações clínicas dos nitratos orgânicos.

Ainda como relaxante arterial, a TNG tem sido usada para o tratamento de infarto agudo do miocárdio<sup>46</sup>, falha cardíaca congestiva<sup>47</sup> e controle de hipertensão. A TNG, se administrada na forma de unguento<sup>48</sup>, pode ainda ser usada em crianças para tratamento de fissuras anais e também como alternativa ao sildenafil (Viagra<sup>®</sup>), através de uso tópico (via “spray”) diretamente no pênis<sup>49</sup>.

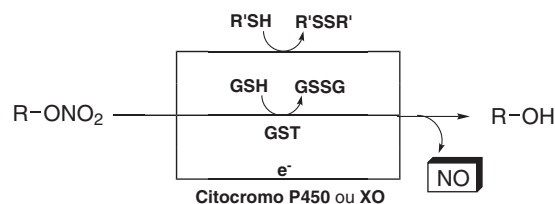
Recentemente, foram ainda relatados outros usos dos nitratos orgânicos. O DNIS, por ex., foi sugerido na terapia transdérmica de longa duração em mulheres grávidas, para se evitar hipertensão e sofrimento do feto<sup>50</sup>. Foi verificado também que os nitratos orgâ-

nicos podem inibir a proliferação celular da musculatura lisa, associada à patogênese e progressão da aterosclerose<sup>51</sup>.

### Metabolismo de nitratos orgânicos

A liberação de NO *in vivo* por nitratos orgânicos pode se dar tanto por via enzimática quanto não-enzimática<sup>52</sup>. Apesar do processo bioquímico não ter sido ainda totalmente elucidado, existem fortes evidências de que pode envolver diversas vias intra e extracelulares<sup>53</sup>.

Seguindo-se a via enzimática<sup>54</sup>, podem estar envolvidas as enzimas glutatona *S*-transferase (GST) e xantina oxidase (XO), ou o complexo citocromo P450. Enquanto que, pela via não-enzimática<sup>55</sup>, a redução se dá via espécies do tipo tióis, que se recombinam formando dissulfetos (Esquema 11).



Esquema 11. Vias metabólicas que liberam NO a partir de nitratos orgânicos

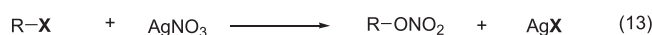
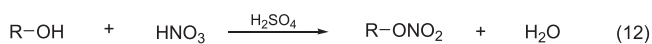
### Síntese de nitratos orgânicos

Em geral, estes compostos podem ser obtidos pela reação de esterificação dos álcoois correspondentes com ácido nítrico ou pela substituição do haleto de alquila com nitrato de prata (Esquema 12, Equações 12 e 13)<sup>56</sup>.

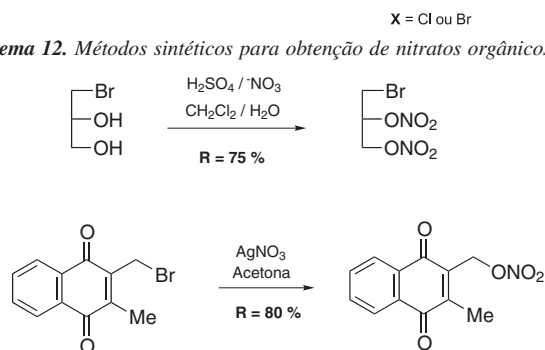
Como exemplos de aplicação destas duas metodologias para obtenção de nitratos orgânicos, destacam-se os trabalhos de Thatcher e colaboradores<sup>57</sup>, que utilizam um diol derivado da glicerina em condições ácidas, e de Goulart e colaboradores<sup>58</sup>, que reagem uma bromoquinona com nitrato de prata (Esquema 13).

Tabela 1. Algumas classes de doadores de NO

Nome	Composto representativo	Caminho para geração de NO	
		não-enzimático	enzimático
Nitritos orgânicos		Hidrólise e nitrosação, tióis, luz e aquecimento	Enzimas citossólicas, enzimas microssômicas e xantina oxidase
Nitratos orgânicos		Tióis	Cit-P450, GST e enzimas ligadas à membrana
Complexos *NO-metálicos	$\text{Na}_2[\text{Fe}(\text{CN})_5\text{NO}]\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Tióis, luz, redutores e nucleófilos	Enzimas ligadas à membrana
<i>N</i> -nitrosaminas		*OH e luz	Cit-P450
<i>S</i> -nitrosotióis		Espontâneo, tióis, luz e íons metálicos	Enzima desconhecida
<i>N</i> -hidroxi guanidinas		Oxidantes	NOS, Cit-P450



**Esquema 12.** Métodos sintéticos para obtenção de nitratos orgânicos



**Esquema 13.** Exemplos de aplicação das metodologias para obtenção de nitratos orgânicos

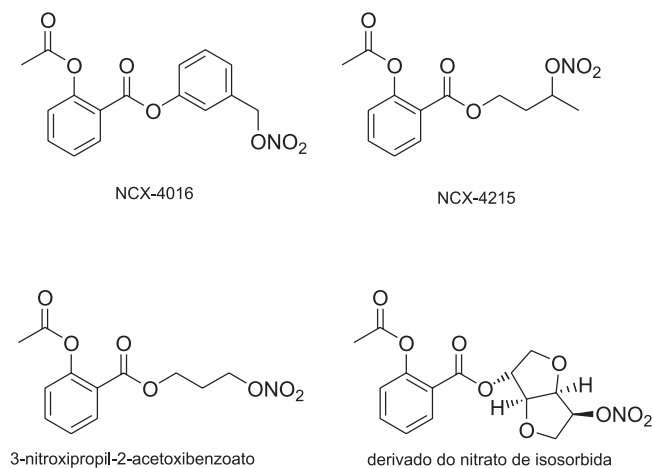
### Drogas híbridas: NO-aspirinas

Uma inovação recente no desenvolvimento deste tipo de compostos é a hibridação de porções liberadoras de NO em drogas já disponíveis comercialmente<sup>59</sup>, o que pode reduzir a toxicidade, além de potencializar a atividade biológica.

Nesse sentido, já foram desenvolvidas algumas drogas híbridas com porções doadoras de NO na forma de seus nitratos (Figura 7), entre as quais podem-se destacar alguns híbridos do ácido acetil salicílico (AAS). Dentre eles, vale mencionar o NCX-4016 e o NCX-4215<sup>60</sup>, ambos desenvolvidos pela Nicox (companhia farmacêutica especializada em drogas doadoras de NO) e o derivado do DNIS, produzido pela CAL International<sup>61</sup>.

Estas NO-aspirinas<sup>62</sup>, como são conhecidas, além de não apresentarem gastrotoxicidade também possuem potencializada sua propriedade antitrombótica<sup>63</sup> de inibição da agregação plaquetária, devido ao efeito sinérgico do NO liberado e à inibição da síntese de tromboxana.

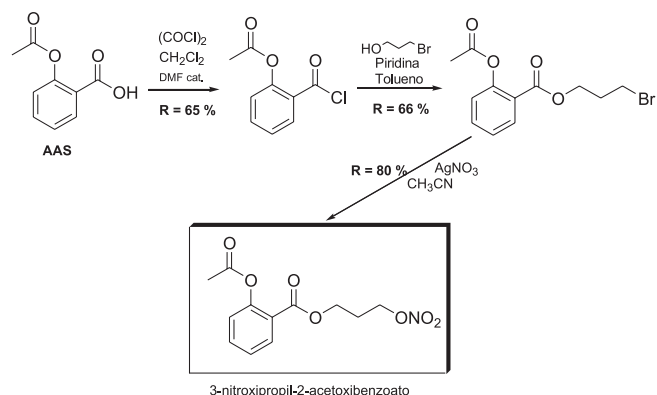
Devido a essas qualidades, estas substâncias são altamente recomendáveis para o uso terapêutico de longa duração na prevenção de infarto do miocárdio e no caso de pacientes que devem fazer uso crônico de antiinflamatórios não esteroidais como, por ex., portadores de artrite reumatóide.



**Figura 7.** Exemplos de híbridos do AAS.

### Síntese de NO-aspirinas

As NO-aspirinas são obtidas com relativa facilidade, conforme se pode constatar pela síntese do composto de referência 3-nitroxipropil-2-acetoxibenzoato<sup>62</sup> (Esquema 14).



**Esquema 14.** Síntese da NO-Aspirina 3-nitroxipropil-2-acetoxibenzoato.

O AAS foi transformado inicialmente no respectivo cloreto de ácido, segundo protocolo desenvolvido por Pelegata e colaboradores<sup>64</sup>. Este, por sua vez, foi acoplado ao 3-bromopropanol, fornecendo o 3-bromopropil-2-acetoxibenzoato, o qual foi levado ao nitrato orgânico correspondente pela reação com nitrato de prata, obtendo-se um rendimento global de 34% para 3 etapas (Esquema 14).

### PERSPECTIVAS DO NO

O “Mesilla Workshop”, considerado um dos mais importantes encontros de química dos EUA, teve em 2004 como tema as novas direções no que se refere à química do NO e espécies correlatas (nitrito, peroxinitrito, nitrosotióis etc.), além de suas interações com enzimas e metais.

O grande destaque do congresso foi uma molécula ainda pouco conhecida: a nitroxila (HNO). O HNO foi apelidado de “a espécie de NO esquecida”, isto por que ainda não existiam evidências sólidas sobre sua formação endógena, até que sua existência foi comprovada por Farmer e colaboradores, que conseguiram capturá-la com a desoximioglobina<sup>65</sup>.

Apesar da grande semelhança com o NO, o comportamento químico e bioquímico do HNO é bem diferente. Sabe-se que uma das principais ações biológicas do NO é elevar a produção de um importante mensageiro bioquímico: o GMPc. Já o HNO parece ativar a produção de um outro mensageiro: o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc). O resultado disso é que estas moléculas acabam tendo efeitos contrários no sistema cardiovascular.

Por ex., no caso de um infarto do músculo cardíaco é sabido que o NO ajuda a controlar os danos causados pela isquemia (uma resposta adaptativa ao stresse oxidativo), enquanto que o HNO, nesta situação, acentua esses danos. Com base nesta observação, o grupo de David Kass explorou uma hipótese ousada, fundamentando-se no fenômeno de pré-condicionamento. Segundo ele, paradoxalmente, a indução de pequenas isquemias poderia tornar o coração mais resistente a uma isquemia de maiores proporções. De fato, ele comprovou esta hipótese através de modelos *in vivo*, aplicando uma substância doadora de HNO (sal de Angeli, Figura 8) e constatou uma resistência muito maior ao infarto por pacientes cardíacos<sup>66</sup>.

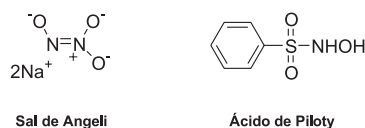


Figura 8. Exemplos de doadores de HNO

A possibilidade dos doadores de HNO serem um novo tipo de droga para tratamento de falências cardiovasculares, substituindo a TNG e outros doadores de NO, abre um novo horizonte de investigação e tem causado grande agitação na comunidade científica. Tamanho ímpeto foi muito bem expresso pela profa. K. Miranda durante o “Mesilla Workshop”: “We’re at the same level now with HNO as at the beginning of the NO field 15 years ago”.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

Passados mais de 20 anos, a reputação do óxido nítrico passou de um gás tóxico e poluente a uma molécula de vital importância, envolvida na fisiologia e fisiopatologia de microorganismos, plantas e organismos superiores. A cada dia, são descobertos novos papéis fisiológicos para o NO e já existem indícios de sua participação em distúrbios de ansiedade, tais como a depressão e o pânico<sup>67</sup>.

Várias drogas já foram desenvolvidas e aprovadas para tratamento de diversas doenças relacionadas ao descontrolo dos níveis de NO, sendo a grande maioria delas inibidoras seletivas da enzima NO sintase ou doadoras de NO. Contudo, a descoberta de novas drogas, mais potentes e seletivas, é um aspecto altamente desejável na química medicinal do NO e as expectativas de que estas estejam disponíveis num futuro bem próximo são grandes.

## AGRADECIMENTOS

Ao apoio financeiro da FAPESP e do CNPq às pesquisas em desenvolvimento e às bolsas de estudo e pesquisas fornecidas.

## ABREVIATURAS

**AAS** – Ácido Acetil-Salicílico; **AMPc** – Monofosfato cíclico de Adenosina; **L-Arg** – L-Arginina; **ATP** – trifosfato de Adenosina **BH<sub>4</sub>** – Tetraidrobiopterina; **Boc** – *t*-Butoxi-Carbonil; **BOP** – Benzotriazol-1-il-oxi-tris-(dimetilamino)fosfônio hexafluorofosfato; **CaM** – Ca<sup>2+</sup>-Calmodulina; **CAMs** – Macrófagos Ativados Citotóxicos; **Chz** – Carbobenziloxi; **L-Cit** – L-Citulina; **DNIS** – Dinitrato de Isosorbida; **EDRF** – Fator de Relaxamento Derivado do Endotélio; **FAD** – Flavina-Adenina Dinucleotídeo; **FMN** – Flavina Mononucleotídeo; **sGC** – Guanilato Ciclastase solúvel; **GMPC** – Monofosfato cíclico de Guanosina; **GST** – Glutathione S-Transferase; **GTP** – Trifosfato de Guanosina; **heme** – ferroporfirina IX; **NADPH** – Fosfato de Nicotinamida-Adenina Dinucleotídeo; **NIL** – L-Imino-etil-Lisina; **NMDA** – *N*-Metil-D-Aspartato; **NNA** – L-N<sup>G</sup>-Nitro-Arginina; **NO** – Óxido Nítrico; **NOS** – NO Sintase; **eNOS** – NO Sintase endotelial; **iNOS** – NO Sintase induzível; **nNOS** – NO Sintase neuronal; **NOH-L-Arg** – L-N<sup>G</sup>-Hidroxi-Arginina; **SAR** – Relação Estrutura-Atividade; **SNC** – Sistema Nervoso Central; **TNG** – Trinitrato de Glicerina; **TNPE** – Tetranitrato de Pentaeritrila; **XO** – Xantina Oxidase; **1400W** – *N*-[3-(amino-metil)benzil]Acetamidina.

## REFERÊNCIAS

- http://www.nobel.se/nobel/alfred-nobel/biographical/tingertz , acessada em Julho 2004.
- Furchgott, R. F.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1870.
- Ignarro, L. J.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1882.
- Murad, F.; *Angew. Chem., Int. Ed.* **1999**, *38*, 1856.
- Thomas, G.; *Medicinal Chemistry*, 1<sup>st</sup> ed., John Wiley & Sons, 2000, cap. 11, p. 431-464.
- Shaw, A. W.; Vosper, A. J.; *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* **1977**, *8*, 1239.
- Kerwin, J. F.; Lancaster, J. R.; Feldman, P. L.; *J. Med. Chem.* **1995**, *38*, 4343.
- Ignarro, L. J.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **1990**, *30*, 535.
- Wink, D. A.; Darbyshire, J. F.; Nims, R. W.; Saavedra, J. E.; Ford, P. C.; *Chem. Res. Toxicol.* **1993**, *6*, 23.
- Ridd, J. H.; *Chem. Rev.* **1961**, *15*, 418.
- Gatti, R. M.; Radi, R.; Augusto, O.; *FEBS Lett.* **1994**, *348*, 287.
- King, P. A.; Jamison, E.; Strahs, D.; Anderson, V. E.; Brenowitz, M.; *Nucleic Acids Res.* **1993**, *21*, 2473.
- McCleverty, J. A.; *Chem. Rev.* **1979**, *79*, 53.
- Greengard, P.; *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1975**, *5*, 585.
- Appleman, M.; Terasaki, W.; *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* **1975**, *5*, 153.
- Furchgott, R. F.; Zawadzki, J. V.; *Nature* **1981**, *288*, 373.
- Hibbs, J. B.; *Res. Immunol.* **1991**, *142*, 565.
- Shibuki, K.; *Biomed. Res.* **1994**, *15*, 65.
- Dawson, D. A.; *Cerebrovasc. Brain Metab. Rev.* **1994**, *6*, 299.
- Mulligan, M. S.; Hevel, J. M.; Marletta, M. A.; Ward, P. A.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1991**, *88*, 6338.
- Klabunde, R. E.; Ritger, R. C.; Helgren, M. C.; *Eur. J. Pharmacol.* **1991**, *199*, 51.
- Marletta, M. A.; *J. Biol. Chem.* **1993**, *268*, 12231.
- Stuehr, D. J.; Griffith, O. W.; *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **1992**, *65*, 287.
- Abu-Soud, H. M.; Stuehr, D. J.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 10769.
- Crane, B. R.; Arvai, A. S.; Ghosh, D. K.; Wu, C.; Getzoff, E. D.; Stuehr, D. J.; Tainer, J. A.; *Science* **1998**, *279*, 2121.
- Li, H.; Raman, C. S.; Gloser, L. B.; Blasko, E.; Young, T. A.; Parkison, J. F.; Whitlow, M.; Poulos, T. L.; *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 21276.
- Li, H.; Raman, C. S.; Martásek, P.; Marters, B. S. S.; Poulos, T. L.; *Biochemistry* **2001**, *40*, 5399.
- Kikelj, D.; Peterlin-Masic, L.; *Tetrahedron* **2001**, *57*, 7073.
- Marletta, M. A.; *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 1899.
- Furfine, E. S.; Harmon, M. F.; Paith, J. E.; Garvey, E. P.; *Biochemistry* **1993**, *32*, 8512.
- Moore, W. M.; Webber, R. K.; Jerome, G. M.; Tjoeny, F. S.; Misko, T. P.; Currie, M. G.; *J. Med. Chem.* **1994**, *37*, 3886.
- Garvey, E. R.; Oplinger, J. A.; Furfine, E. S.; Kiff, R. J.; Lazlo, F.; Nhittle, B. J. R.; Knowles, R. G.; *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 4959.
- Silverman, R. B.; Zhang, H. Q.; Fast, W.; Marletta, M. A.; Martásek, P.; *J. Med. Chem.* **1997**, *40*, 3869.
- Silverman, R. B.; Roman, L. J.; Martásek, P.; Huang, H.; *J. Med. Chem.* **2000**, *43*, 2938.
- Wang, P. G.; Jia, Q.; Cai, T.; Huang, M.; Li, H.; Xian, M.; Poulos, T. L.; *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 2271.
- Tinker, A. C.; Beaton, H. G.; Smith, N. B.; Cook, T. R.; Cooper, S. L.; Rae, L. F.; Hallon, K.; Hamleg, P.; McInally, T.; Nicholls, D. J.; Pimm, A. D.; Wallace, A. V.; *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 913.
- Hallinan, E. A.; Tsymbalov, S.; Dorn, C. R.; Pitzele, B. S.; Hansen, D. W.; *J. Med. Chem.* **2002**, *45*, 1686.
- Shearer, B. G.; Lee, S.; Franzmann, K. W.; White, H. A. R.; Sanders, D. C. J.; Kiff, R. J.; Garvey, E. P.; Furfine, E. S.; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1997**, *7*, 1763.
- Lajoie, G. A.; Fishlock, D.; Perdicakis, B.; Montgomery, H. J.; Guillemette, J. G.; Jervis, E.; *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11*, 869.
- Engh, R.; Konetschnyrap, S.; Krell, H.; Martin, U.; Tsaklakidis, C.; *WO Patent Appl.* **1997**, *9*, 721.
- King, S. B.; Atkinson, R. N.; Moore, L.; Tobin, J.; *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 3467.
- Wang, P. G.; Xian, M.; Tang, X.; Wu, X.; Wen, Z.; Gai, T.; Janczuk, A. J.; *Chem. Rev.* **2002**, *102*, 1091.
- Honeyman, J.; Morgan, J. W.; *Adv. Carbohydr. Chem.* **1957**, *12*, 117.
- Baker, J. W.; Easty, P. M.; *J. Chem. Soc.* **1952**, 1208.
- Capellos, L.; Fisco, W. J.; Ribaldo, C.; Hogan, V. D.; Campisi, F. X.; Castorina, T. C.; Rosenblat, D. H.; *Int. J. Chem. Kinet.* **1984**, *16*, 1009.
- Jugdutt, B. I.; *Am. J. Med.* **1992**, *70*, 82.
- Leir, C. V.; Bombach, D.; Thompson, M. J.; Cattaneo, S. M.; Goldberg, R. J.; Unverferth, D. V.; *Am. J. Cardiol.* **1981**, *48*, 1115.
- Tander, B.; Guven, A.; Demirbag, S.; Ozkan, Y.; Ozturk, H.; Cetinkursun, S.; *J. Pediatr. Surg.* **1999**, *34*, 1810.
- De May, C.; *Curr. Med. Opin.* **1998**, *14*, 187.
- Nakatsuka, M.; Tada, K.; Kimura, Y.; Asagiri, K.; Kamada, Y.; Takata, M.; Nakata, T.; Inove, N.; Kudo, T.; *Gynecol. Obst. Invest.* **1999**, *47*, 13.



51. Osinki, M. T.; Rauch, B.H.; Schror, K.; *Mol. Pharmacol.* **2001**, *59*, 1044.
52. Haatcher, G. R. J.; Weldon, H.; *Chem. Soc. Rev.* **1998**, *27*, 331.
53. Ahlner, J.; Andersson, R. G.; Torfgard, K.; Axelsson, K. L.; *Pharmacol. Rev.* **1991**, *43*, 351.
54. Seth, P.; Funy, H. L.; *Biochem. Pharmacol.* **1993**, *46*, 1486.
55. Chang, S.; Fung, H. L.; *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *42*, 1433.
56. Baker, J. W.; Heggs, T. G.; *Chem. Ind.* **1954**, 464.
57. Thacher, G. R. J.; Zavorin, S. I.; Artz, J. D.; Dumitrasw, A.; Nicolescu, A.; Scutaru, D.; Smith, S. V.; *Org. Lett.* **2001**, *3*, 1113.
58. Goulart, M. O. F.; Abreu, F. C.; Lopes, A. O.; Pereira, M. A.; De Simone, C. A.; *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 8153.
59. Marini, G.; Pozzoli, C.; Coruzzi, G.; *Helv. Chim. Acta* **2000**, *83*, 287.
60. Momi, S.; Emerson, M.; Paul, W.; Leone, M.; Mezassoma, A. M.; Del Soldato, P.; Page, C. P.; Gresele, P.; *Eur. J. Pharmacol.* **2000**, *397*, 177.
61. *CAL Int.*, Patent WO 94/03421, **1994**.
62. Gasco, A.; Ceva, C.; Lolli, M.L.; Lazzarato, L.; Guaiata, E.; Morini, G.; Corozzi, G.; McElroy, S. P.; Megson, I.L.; Frutero, R.; *J. Med. Chem.* **2003**, *46*, 747.
63. Wallace, J. L.; Del Soldato, P.; Cirino, G.; Muscarà, M. N.; *Drugs* **1999**, *2*, 321.
64. Pelegata, S.; Italia, A.; Villa, M.; Palmisance, G.; Lesma, G.; *Synthesis* **1985**, 517.
65. Farmer, P. J.; Sulc, F.; Immoos, C. E.; Pervitsky, D.; *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 1096.
66. Kass, D. A.; Paolucci, N.; *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **2003**, *100*, 5537.
67. Zorzetto, R.; *Pesquisa FAPESP* **2003**, *84*, 30.