

O Impacto Científico da Descoberta do Óxido Nítrico como Vasodilatador e Antitrombótico Endógeno

Paulo Roberto B. Evora
Ribeirão Preto, SP

Considera-se o endotélio, na atualidade, como um órgão que exerce inúmeras funções metabólicas, participando da regulação do tono vascular. Esta regulação utiliza variados mecanismos (metabólicos, miogênicos e neuro-endócrinos), existindo, na verdade, uma importante interação entre todos esses mecanismos. Este texto tem a finalidade, apenas, de discutir aspectos da regulação parácrina do tono vascular, ressaltando o impacto científico do estabelecimento do óxido nítrico, como um vasodilatador e antitrombótico endógeno.

Em 1980 Furchgott e Zawadzki¹, devido a um erro experimental de um de seus técnicos, descobriram um fato que durante muitos anos, foi um grande enigma da farmacologia: o porquê da acetilcolina em algumas situações ser um vasoconstritor e em outras, agir como um vasodilatador. A simples verificação de que a acetilcolina só age como vasodilatador na presença do endotélio, desencadeou uma era de intensos trabalhos na década de 80, a qual estabeleceu o endotélio como a sede do desencadeamento da maioria das doenças cardiovasculares. Postulou-se, então, a existência de um fator relaxante derivado do endotélio que, em 1982, foi denominado de *endothelium-derived relaxing factor* (EDRF). Nesses trabalhos pioneiros determinou-se que o EDRF não era um prostanóide, pelo fato de que a indometacina, um bloqueador da via ciclo-oxigenase, não inibia o relaxamento dependente do endotélio, produzido pela acetilcolina e por uma série de outros agonistas, tais como, ADP, serotonina, histamina e muitos outros. Determinou-se, ainda, que o EDRF era difusível e dependente de íons cálcio. Uma grande contribuição, do ponto de vista científico, ocorreu em 1985, quando Cocks e Angus² foram capazes de cultivar células endoteliais e instalá-las em um circuito de perfusão. Isso permitiu a obtenção de grandes quantidades de EDRF para manipulação bioquímica e farmacológica. Descobriu-se, então, que o relaxamento dependente do endotélio associava-se a uma elevação de GMP cíclico na musculatura lisa vascular, podendo ser inibido pelo azul de metileno (GMP cíclico) e pela hemoglobina (“seqüestrador” ou *scavenger* do

EDRF). Descobriu-se, também, que o EDRF podia ser destruído por ânions superóxidos e outros radicais livres, suportando o conceito de que o EDRF, por si só, era um radical. Com o acúmulo de evidências de que o EDRF tinha muitas das características dos nitrovasodilatadores, Furchgott e Ignarro^{3,4} propuseram, independentemente, no IV Simpósio sobre “Mecanismos de Vasodilatação” realizado na Mayo Clinic em 1986, que o EDRF era o óxido nítrico (*nitric oxide* - NO). As pesquisas direcionaram-se, então, no sentido de se determinar como o endotélio produz o radical e culminaram com a proposição de Palmer e Moncada^{5,6} que postularam ser a L-arginina a fonte de óxido nítrico sob a ação de uma enzima, a óxido nítrico sintetase.

Existe hoje uma série de eventos que participam de uma “cascata da formação do EDRF/NO”. Tomando-se como exemplo o relaxamento dependente do endotélio, induzido pela acetilcolina (ACH), simplificada, o processo assim ocorreria: a ACH estimula um receptor muscarínico, libera EDRF/NO que difunde-se para a musculatura lisa vascular, provocando um aumento do GMP cíclico com vasodilatação. Esta é apenas uma visão parcial, já que o processo é um pouco mais elaborado, envolvendo um sistema de transdução com mensageiros secundários que incluem G-proteínas, as quais fazem a conexão com a via fosfatidil-inositol que, por sua vez, mobiliza o cálcio intracelular necessário para a formação do óxido nítrico, a partir da L-arginina pela ação da óxido nítrico sintetase. Esta cascata de eventos está longe de ser definitiva, razão pela qual pesquisadores de várias partes do mundo têm se esforçado por descobrir “marcadores” farmacológicos para o estudo dos diversos passos da via clássica de liberação do EDRF/NO, todos eles podendo ter uma participação na gênese de moléstias cardiovasculares.

As alterações a nível de receptores são estudadas por diversos agonistas, sendo muito utilizados a ACH como um neurotransmissor estimulador de receptores muscarínicos e o ADP como um produto plaquetário. Em relação à transdução do sinal entre receptores e os processos intracelulares, embora ainda não totalmente aceito como um marcador definitivo, inúmeros experimentos sugerem que o fluoreto de sódio produz relaxamento dependente do endotélio, através de uma via sensível à toxina pertussis^{7,8}. A “ferramenta” para se estudar a via fosfatidil-inositol é a fosfolipase C, ressaltando-se a sua especificidade, uma vez que as fosfolipases B e D não in-

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP. CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Correspondência: Paulo Roberto B. Evora

Rua Rui Barbosa, 455/140 - CEP 14015-120 - Ribeirão Preto, SP

Recebido para publicação em 9/11/92

Aceito em 30/4/93

duzem vasodilatação dependente do endotélio. É possível que o sinergismo entre o EDRF/NO e a prostaciclina ocorra através da via fosfatidil-inositol⁹. A seguir, merece destaque o ionóforo cálcico A23187, o qual, promovendo uma vasodilatação dependente do endotélio, mostra que a célula endotelial mantém a capacidade de produzir EDRF/NO.

A liberação do EDRF ou EDRFs, uma vez que se postula a existência de mais de um fator endotelial, pode ocorrer através de diferentes vias envolvendo G-proteínas e mecanismos independentes. A G-proteína é responsável pela mediação de efeitos inibitórios de receptores na via da adenil-ciclase. Pouco se conhece em relação ao sinal de transdução, envolvendo a síntese ou liberação do EDRF/NO. Um estágio precoce na maioria das respostas mediadas por receptores é a ativação de G-proteínas na membrana celular, a qual pode iniciar a modulação de uma variedade de eventos intracelulares. A ativação de G-proteínas regulatórias associa-se com a estimulação agonista da maioria dos receptores ligados à membrana celular. Portanto, certas interações agonista-receptores facilitam a ligação de guanina-trifosfato a uma alfa-subunidade da proteína e a G-proteína é ativada. Esta G-proteína dissocia-se, então, do receptor causando a redução da afinidade do receptor pelo agonista e a alfa subunidade é liberada. As distintas alfa-subunidades derivadas de diferentes G-proteínas são capazes de ativar vários processos intracelulares. A identidade desta G-proteína(s) e a sua relação com G-proteínas, envolvendo a estimulação alfa 1-adrenérgica da fosfolipase-C não é conhecida. O papel da G-proteína(s) na fisiopatologia do vasoespasmó após isquemia global e reperfusão, também é obscuro. A sua participação foi comprovada estudando-se, comparativamente, os relaxamentos vasculares causados pelo fluoreto de sódio. Esse elemento foi capaz de produzir respostas bifásicas em coronárias humanas, bovinas e de porcos, causando, especificamente, um relaxamento dependente e uma contração independente do endotélio. A disfunção dessas G-proteínas no endotélio tem sido, também, postuladas como responsáveis pela disfunção endotelial em condições com regeneração da célula endotelial após lesão, aterosclerose e vasoespasmó coronariano¹⁰. Embora a descrição do sistema de transdução mediado por G-proteínas seja um tanto complexa, justifica-se a sua inclusão neste texto dada a enorme perspectiva científica do seu estudo na gênese das moléstias cardiovasculares. Ressalte-se que o mesmo participa da transdução de sinal, não só do EDRF/NO, mas também de vários outros mediadores.

Outros elementos importantes para o estudo farmacológico da função endotelial, são os bloqueadores dos efeitos e da síntese do EDRF/NO. Entre eles os mais importantes são: o azul de metileno (bloqueio a nível do GMP cíclico); a hemoglobina ("seqüestrador" ou *scavenger* do EDRF/NO); e as formas nítrica (N_G-nitro-L-

arginina, a L-NOARG) e metilada (N_G-monometil-L-arginina, a L-NMMA) da L-arginina que são bloqueadores da óxido nítrico sintetase. Acresça-se, ainda, a L-arginina e a D-arginina, utilizadas para comprovar-se a especificidade da L-arginina. Como as formas metilada e nítrica da L-arginina bloqueiam a óxido sintetase por competição, a adição de uma grande concentração de L-arginina reverte o bloqueio da enzima, o que não ocorre com a D-arginina. Na prática laboratorial, a reversão do bloqueio enzimático pela adição de L-arginina é mais evidente nos experimentos com L-NMMA.

Embora não tão conhecidos e, muitas vezes, não considerados tão importantes quanto os fatores relaxantes, o endotélio produz pelo menos quatro "famílias" de fatores constritores (*endothelium-derived contracting factors* - EDCFs), que podem ser classificados em: EDCF 1s - fatores dependentes da via ciclo-oxigenase; EDCF 2s - a família das endotelinas que são polipeptídeos vasoconstritores; EDCF 3s - vasoconstritores liberados durante hipóxia; e EDCF 4s - radicais livres do oxigênio independentes da via ciclooxigenase. Enquanto o EDRF estimula a guanilato-ciclase no músculo liso vascular induzindo vasodilatação, observa-se, também a hiperpolarização da musculatura lisa vascular sugerindo-se a existência de um fator hiperpolarizante endotelial (*endothelium-derived hyperpolarizing factor*- EDHF).

Pode-se avaliar a importância destas pesquisas pela informação extra-oficial de que o National Institute of Health (NIH) dos Estados Unidos chega a empregar, em determinados períodos, até 40% de suas verbas para pesquisas sobre a função endotelial.

Um outro dado de impacto reside no fato de que até a descoberta do EDRF/NO, falava-se em mediadores que eram, na maioria das vezes, polipeptídeos vasoativos. Hoje estamos diante de um mediador que é um gás extremamente difusível, parecendo ter um papel universal não só na manutenção do tono vascular, mas também em outros órgãos. Por exemplo, Brutsaert, na Bélgica¹¹ propôs que o endocárdio produz óxido nítrico. Essa verificação poderá estimular pesquisas, visando explicar isquemias subendocárdicas e o porquê de infartos sem coronariopatia? Outros exemplos incluem a produção de óxido nítrico pelo epitélio brônquico e pela mucosa gastrointestinal, ampliando a participação deste gás na fisiologia de outros órgãos e sistemas. Inúmeros trabalhos demonstram comprometimento da função endotelial em liberar o EDRF/NO na hipertensão, diabetes, aterosclerose, fenômeno de Raynaud, vasoespasmó coronariano, vasoespasmó cerebral etc¹². Existem sérias evidências de que o óxido nítrico inibe a aterogênese, função esta não compartilhada com a prostaciclina. Portanto, o estudo do endotélio poderá trazer novos conhecimentos sobre a fisiopatologia das doenças.

Uma outra perspectiva diz respeito ao fato da possibilidade da identificação do óxido nítrico como o EDRF

ser o fim da questão. Isto é bastante improvável pois, seguramente, existem outros EDRFs. Como claro exemplo desta idéia, a poli-L-arginina induz relaxamentos dependentes do endotélio que não são abolidos pelos bloqueadores clássicos do EDRF (hemoglobina, azul de metileno, L-NMMA e L-NOARG)¹³. Um outro aspecto a ser ressaltado é o fato, hoje plenamente estabelecido, de que a disfunção endotelial precede a disfunção celular após isquemia/reperfusão. Os grandes laboratórios já trabalham, sem grande alarde, na busca de drogas “protetoras do endotélio”.

Finalmente, merece citação o Dr. Salvador Moncada (Paul Dudley White International Lecture na Scientific Sessions da American Heart Association, realizada em Anaheim, CA, Novembro 1991) que sugeriu, com base em uma década de estudos, inclusive, sobre a liberação basal de EDRF/NO: “O estado normal do sistema cardiovascular é o de constante e ativa vasodilatação. Se isto é verdade, teremos, então, que rever a fisiologia cardiovascular normal, levando-se em consideração esse tono vasodilatador. Além disso, nos próximos anos teremos que rever alguns dos nossos conceitos de fisiopatologia. Provavelmente teremos que, inclusive, mudar o nome de algumas condições; por exemplo, hipertensão poderá ser melhor descrita como hipovasodilatação.” Esta citação é clássica e define, perfeitamente, o que representou a descoberta do EDRF/NO no cenário científico internacional.

Referências

1. Furchgott RF, Zawadski JV - The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, 1980; 228: 373+6.
2. Cocks T, Angus JA - Bioassay of the release of endothelium-derived relaxing factor (EDRF) from isolated endothelial cells in vitro. In: Bevan JA, Godfrainm T, Maxwell RA, Stoclet JS, Worcel M (eds) *Vascular Neuroeffector Mechanisms*. Amsterdam, Elsevier, 1985; pp 131-6.
3. Furchgott RF - Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activated inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In: Vanhoutte PM (ed) *Mechanisms of Vasodilatation*. New York, Raven Press, vol IV, 1988; pp 401-14.
4. Ignarro LJ, Byrns RE, Wood KS - Biochemical and pharmacological properties of EDRF and its similarity to nitric oxide radical. In: Vanhoutte PM (ed) *Mechanisms of Vasodilatation*. New York, Raven Press, vol IV, 1988; pp 427-35.
5. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S - Nitric oxide accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, 1987; 327:524-6.
6. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S - Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*, 1988; 333: 664-6.
7. Evora PRB, Pearson PJ, Schaff HV - Impaired endothelium-dependent relaxation to sodium fluoride following coronary reperfusion: Evidence for G-protein dysfunction. *Circulation*, 1991; 84 (suppl II): II275.
8. Flavahan NA, Vanhoutte PM - Pertussis toxin inhibits endothelium-dependent relaxations evoked by fluoride. *Eur J Pharmacol*, 1990; 178: 121-4.
9. De Nucci G, Gryglewsh RJ, Warner TD, Vane JR - Receptor-mediated release of endothelium-derived relaxing factor and prostacyclin from bovine aortic endothelial cells is coupled. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988; 85: 2334-8.
10. Insel PA, Ransnäs LA - G Proteins and cardiovascular disease. *Circulation*, 1988; 78: 1511-3.
11. Andries LJ, Brutsaert L - Differences in structure between endocardial and vascular endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1991; 17(suppl 3): 243-6.
12. Flavahan NA, Vanhoutte PM - G-proteins and endothelial responses - *Blood Vessels*, 1990; 27: 218-29.
13. Pearson PJ, Evora PRB, Schaff HV - Endothelium-dependent relaxation to poly-L-arginine: lack of inhibition by blockers of nitric oxide synthesis or action. *Circulation*, 1991; 84(suppl II):II674.