

Fontes de espécies reativas de nitrogênio

QBQ2509: Bioquímica Redox

QBQ5893: Processos Redox em Bioquímica

Dr. Danilo B. Medinas

Material de estudo para prova

Halliwel: Capítulo 2 e 5

Manuscritos citados



Atmosfera poluída com óxidos de nitrogênio

A descoberta do óxido nítrico em biologia



<https://bvsmms.saude.gov.br/angina/>

Angina de peito: fluxo sanguíneo reduzido no coração, relacionado a atividades físicas.

Efeitos terapêuticos da administração de nitroglicerina, que promove a dilatação de artérias aumentando o fluxo sanguíneo no músculo cardíaco.

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1998



Photo from the Nobel Foundation archive.

Robert F. Furchgott

Prize share: 1/3

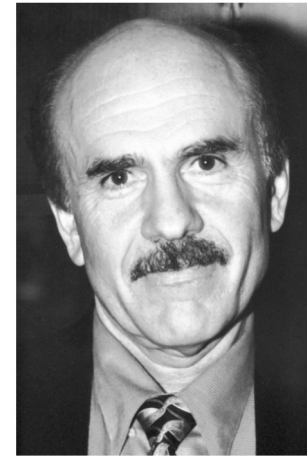


Photo from the Nobel Foundation archive.

Louis J. Ignarro

Prize share: 1/3

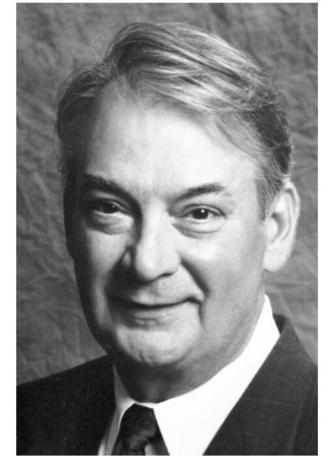


Photo from the Nobel Foundation archive.

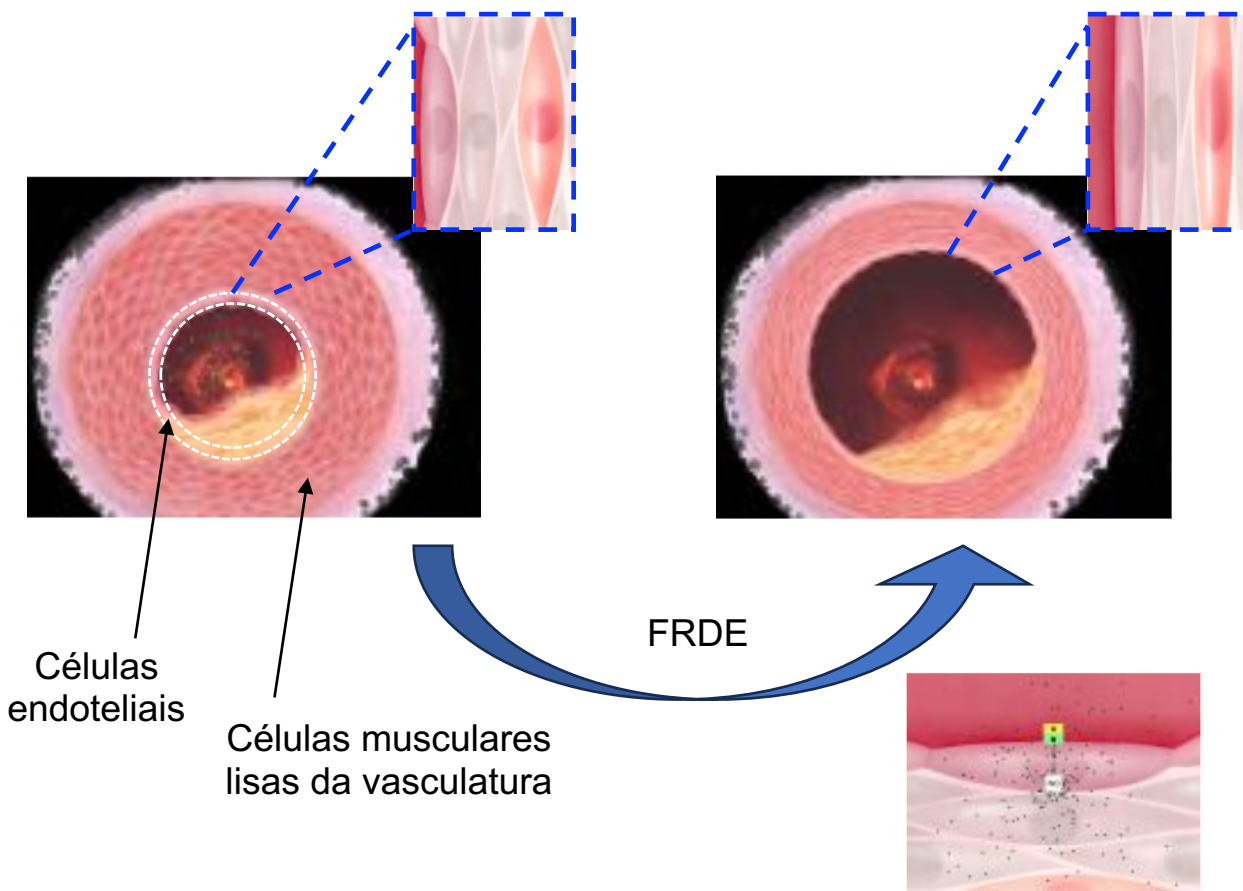
Ferid Murad

Prize share: 1/3

Efeitos nitroglicerina = ação do NO[•] sobre a guanilato ciclase

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1998/press-release/>

A descoberta do óxido nítrico em biologia



NO[•] corresponde ao fator relaxante derivado do endotélio liberado após a estimulação de artérias com acetilcolina.

<https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/1998/press-release/>

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 1998



Photo from the Nobel Foundation archive.

Robert F. Furchgott

Prize share: 1/3

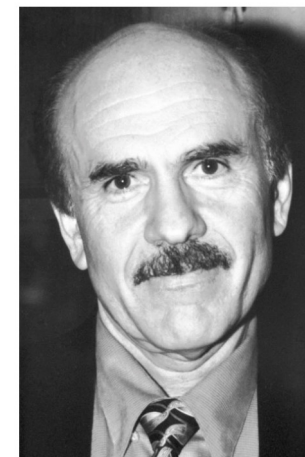


Photo from the Nobel Foundation archive.

Louis J. Ignarro

Prize share: 1/3



Photo from the Nobel Foundation archive.

Ferid Murad

Prize share: 1/3

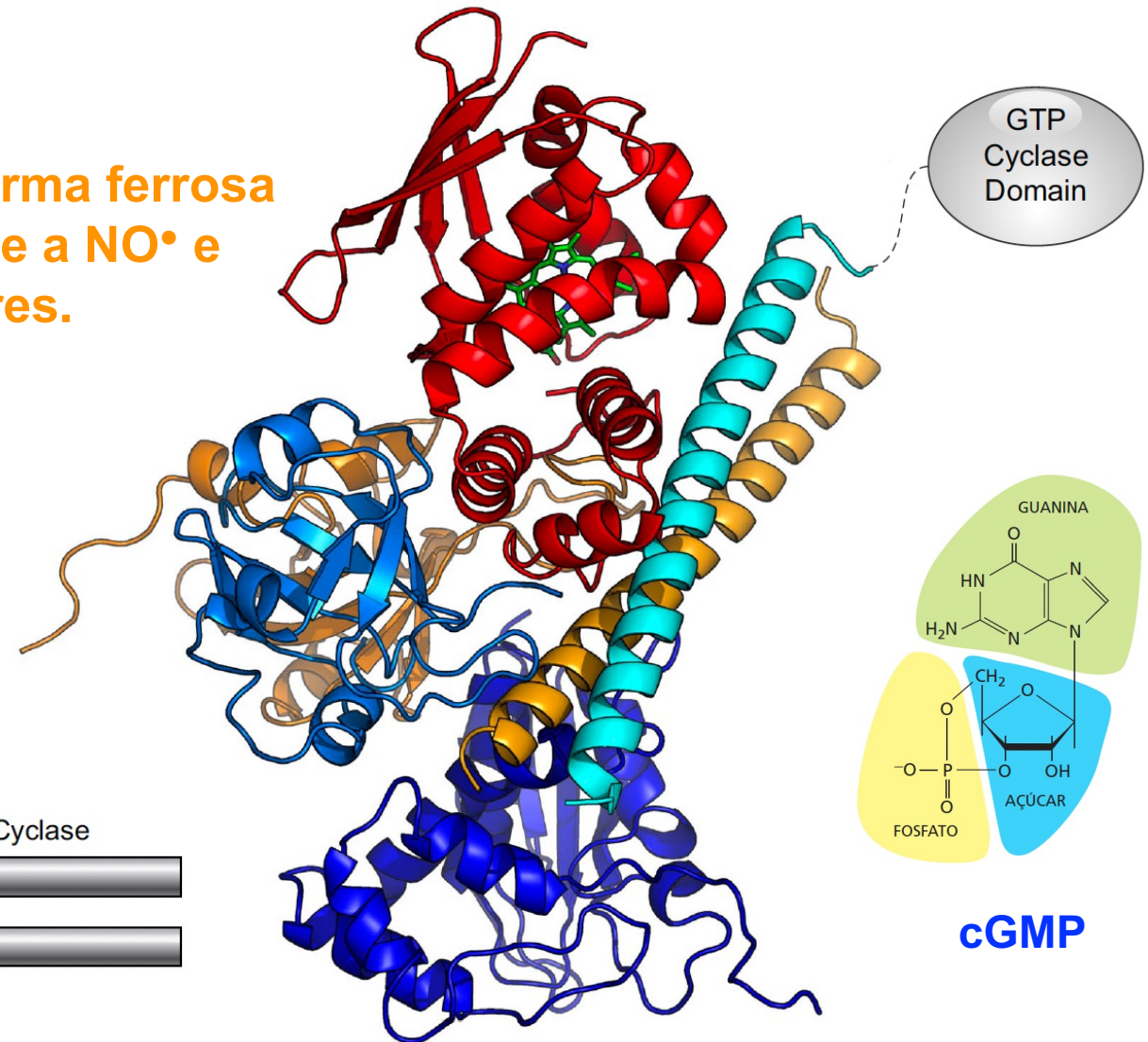
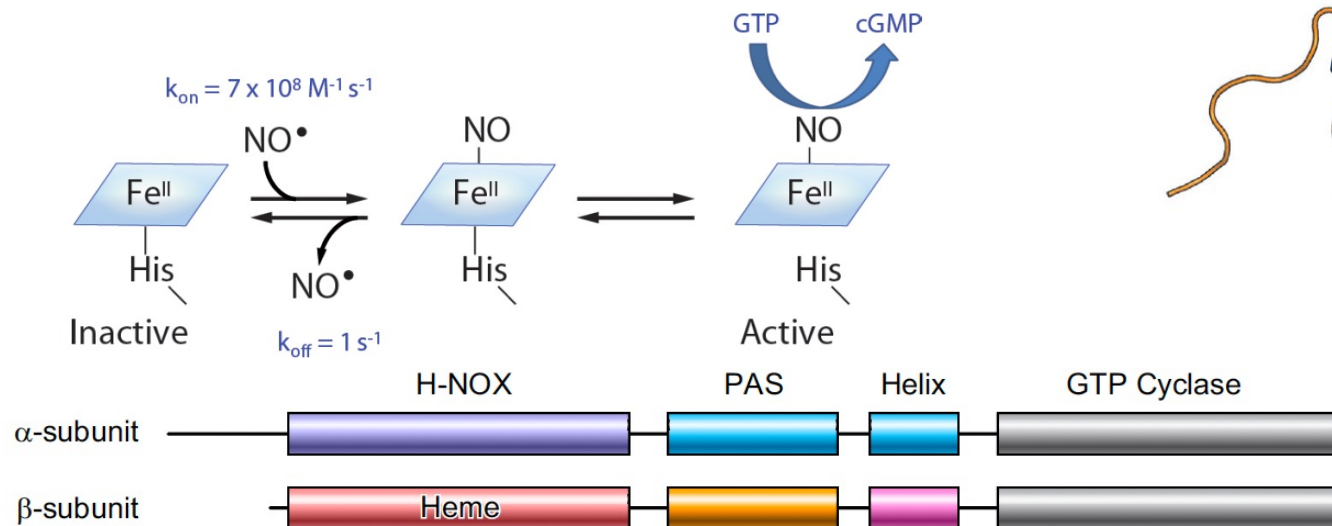
Existência do FRDE FRDE = NO[•]
FRDE = NO[•]

Efeitos nitroglicerina = ação do NO[•] sobre a guanilato ciclase

Descoberta do NO[•] como molécula sinalizadora sem precedentes

Atuação do óxido nítrico na vasculatura

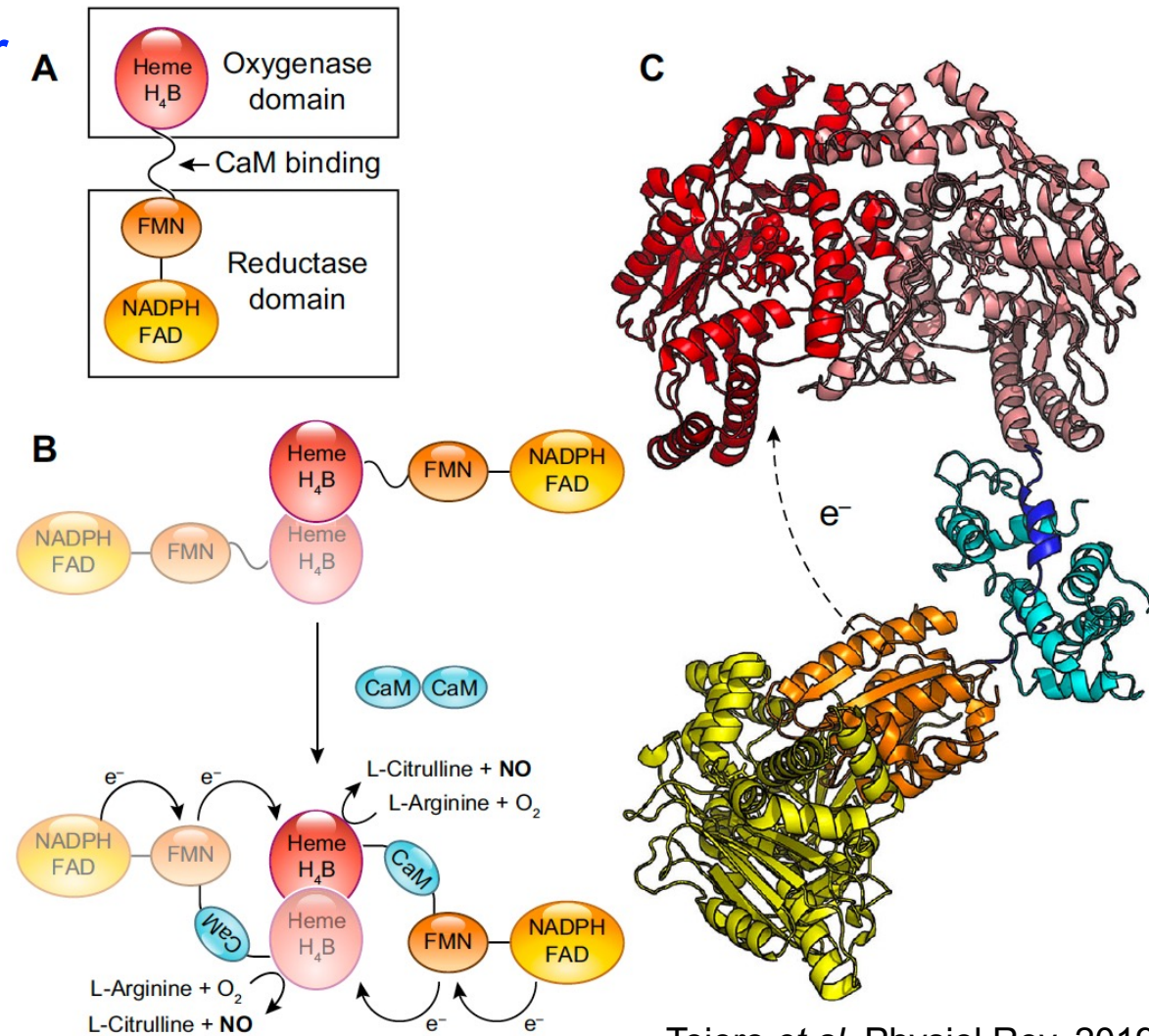
- **Faixa de concentração: pM-nM.**
- **Atua na guanilato ciclase solúvel (sGC). Forma ferrosa ativa e liga NO•. Forma férrica não responde a NO• e está associada a patologias cardiovasculares.**
- **Concentrações de cGMP sobem 100x.**



Como o óxido nítrico é produzido *in vivo*?

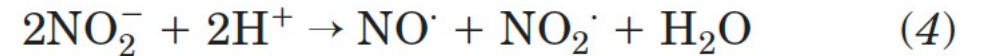
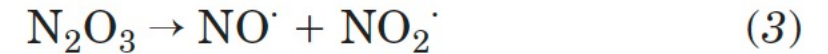
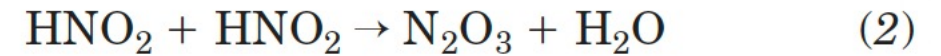
Óxido nítrico sintases

- **NOS**, do inglês *'nitric oxide synthase'*. Família de enzimas que usa O_2 e **NADPH** para converter **L-arginina** em **citrulina** com produção de **NO^\bullet** .
- **NOS1** ou neuronal (NOS1 ou nNOS).
 - Constitutivamente expressa.
- **NOS2** ou induzível (NOS2 ou iNOS).
 - Expressão induzível.
- **NOS3** ou endotelial (NOS3 ou eNOS)
 - Constitutivamente expressa.
- Constituídas por três domínios, oxigenase, redutase, ligador de CaM, e formam dímeros para catalisar a produção de **NO^\bullet** .
- **iNOS** liga CaM mesmo a baixas concentrações de cálcio e opera constitutivamente ativada.

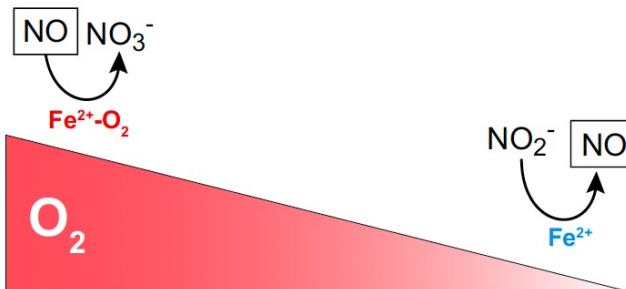
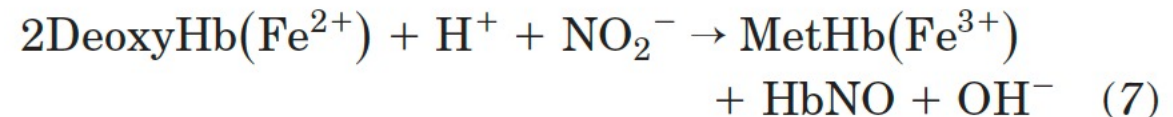
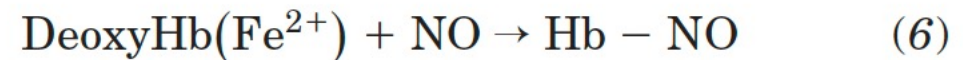
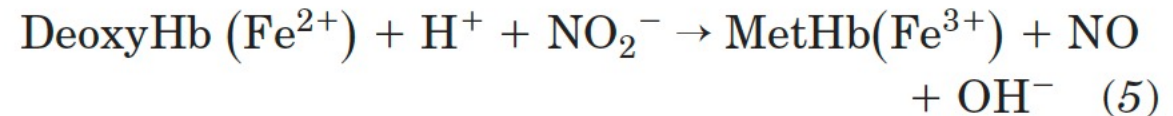


Outras fontes de óxido nítrico? Nitrito da dieta.

- **Reação de desproporcionamento em pH baixo (estômago).**



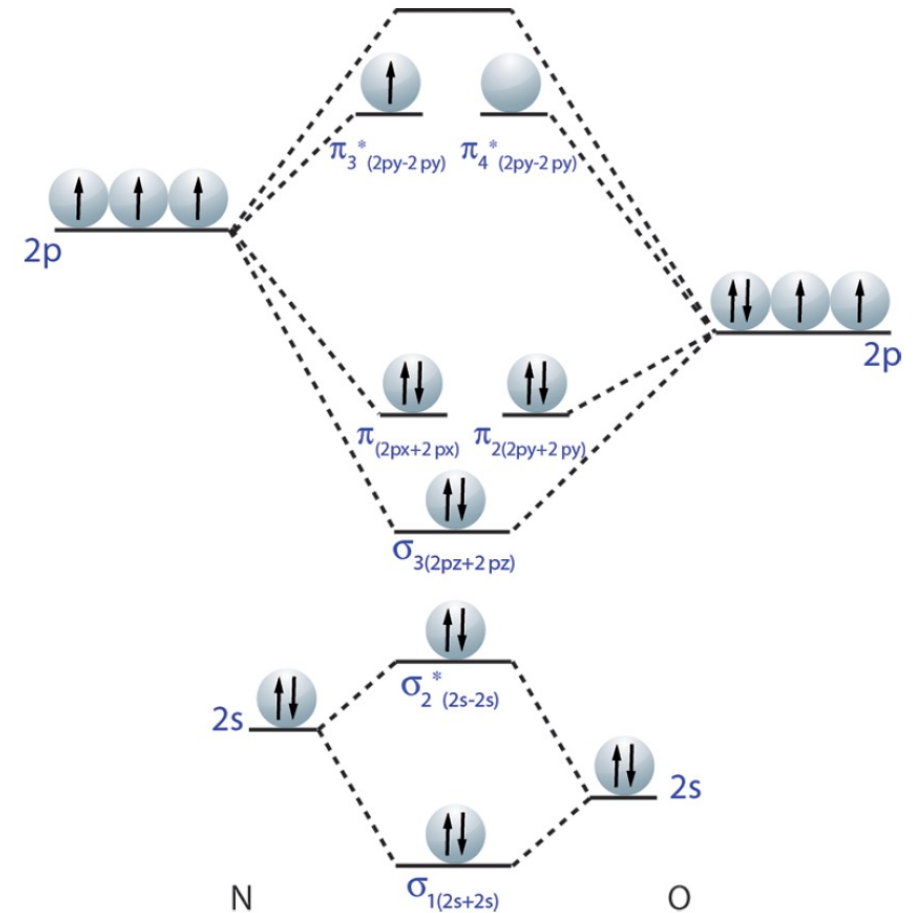
- **Redução por globinas.**



Considerações sobre as propriedades do óxido nítrico

Propriedades do óxido nítrico

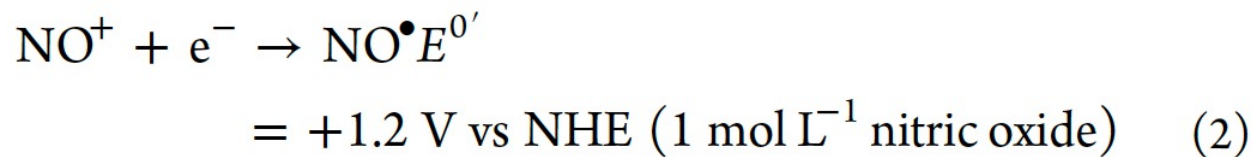
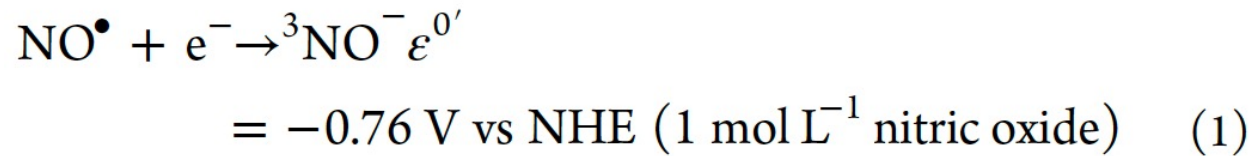
- Propriedades do NO^\bullet que causaram surpresa quando este foi descoberto como mensageiro celular: **Radical livre, diatômico, inorgânico e gasoso, potencialmente reativo mas extremamente simples quimicamente, o que limita os tipos de interações como ligante de proteínas que usualmente são utilizadas por outros agentes sinalizadores.**
- **Relativamente solúvel em água (1,9 mM) para uma espécie não carregada e pouco polar. Aproximadamente 10x mais solúvel em solventes orgânicos, desta maneira pode atravessar membranas por difusão simples.**



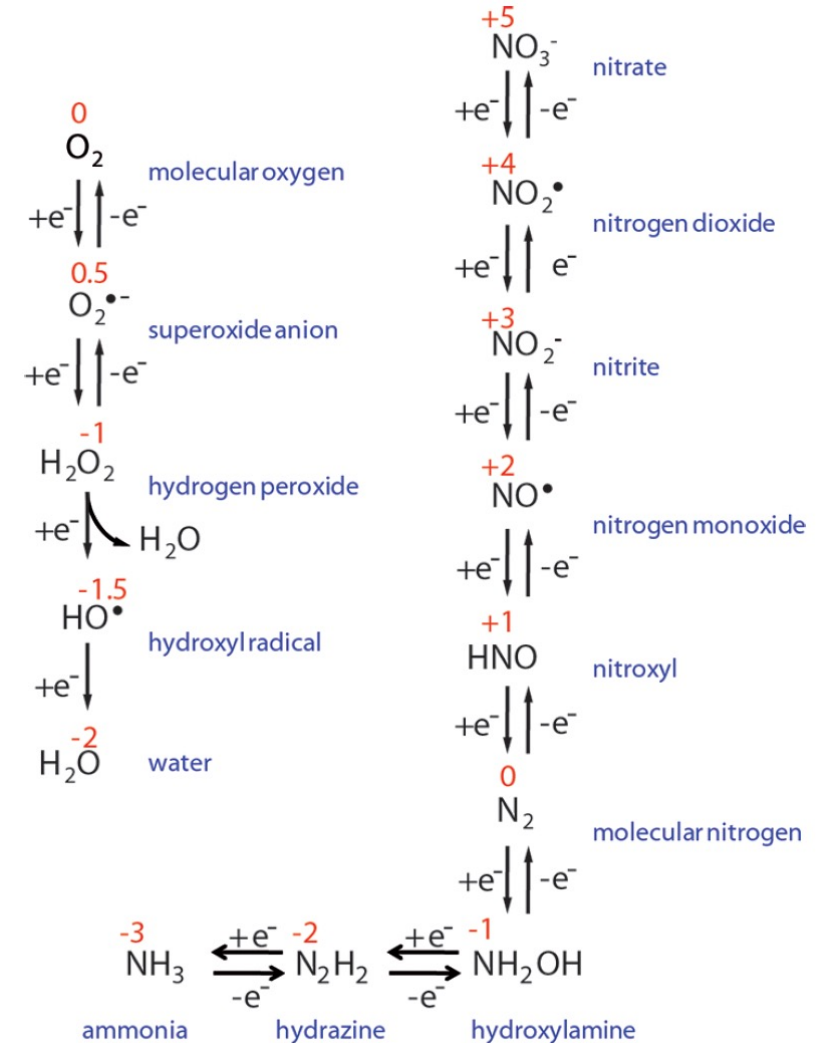
O elétron desemparelhado está centrado no átomo de nitrogênio

Propriedades do óxido nítrico

- Em realidade, o NO^\bullet possui baixa reatividade como oxidante e redutor.

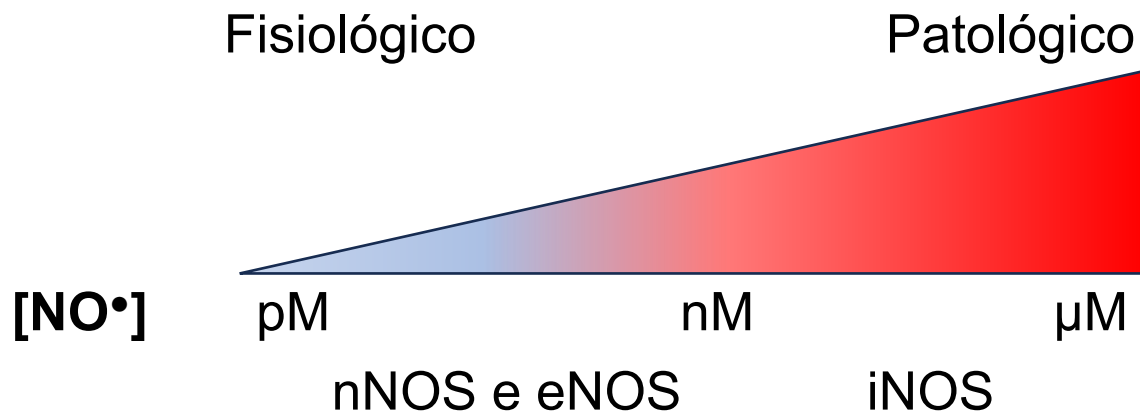


Estados de oxidação do oxigênio e nitrogênio



Alvos biológicos do óxido nítrico

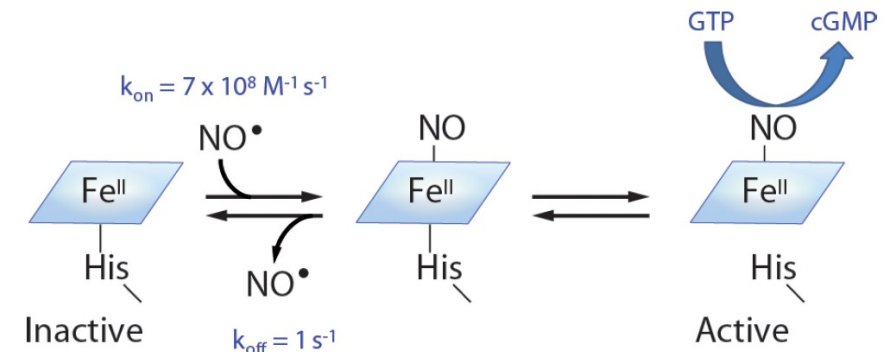
- O NO• se liga principalmente a centros metálicos; reação de nitrosilação.
- Seus alvos são dependentes do local de sua produção e faixa de concentração.



Na vasculatura, a produção de NO• é insensível a [O₂] (~150 µM); Já no cérebro, esta é dependente da [O₂] (~20 µM).

Enzima	K _M O ₂ (µM)
eNOS	2-4
nNOS	300
iNOS	130

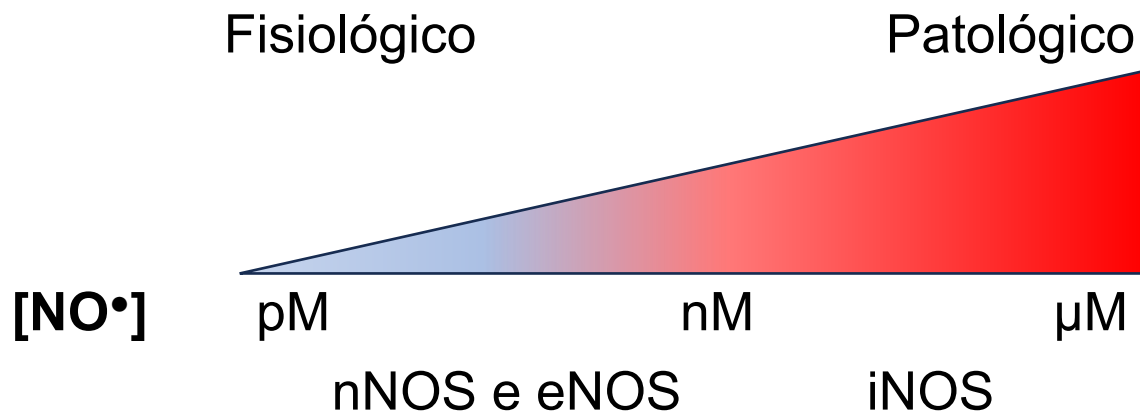
$$\frac{-d[\text{NO}^\bullet]}{dt} = [\text{NO}^\bullet](k_{\text{on}1}[\text{target}_1] + k_{\text{on}2}[\text{target}_2] + k_{\text{on}3}[\text{target}_3] + \dots) \quad (9)$$



Toledo and Augusto, CRT, 2012.

Alvos biológicos do óxido nítrico

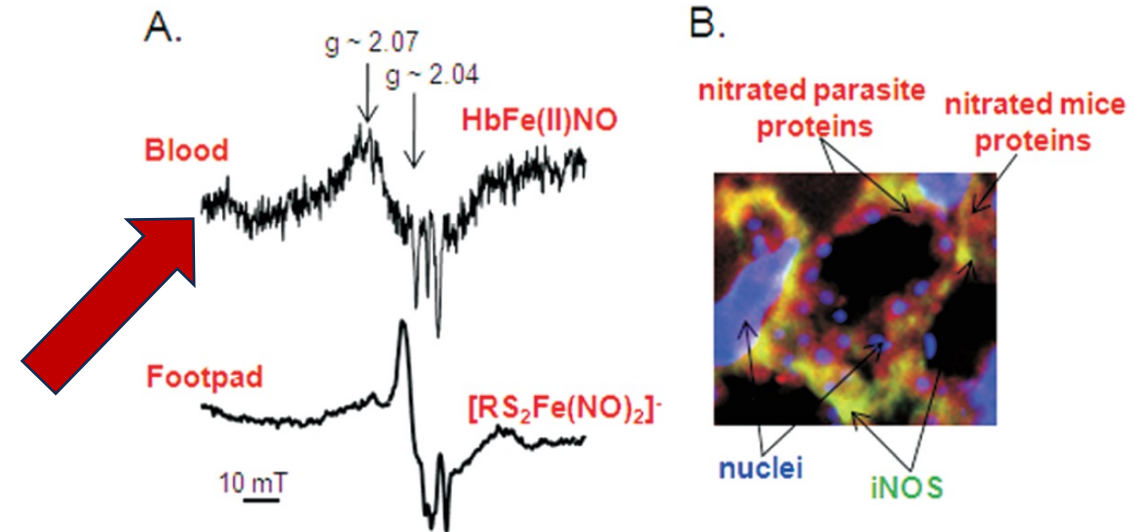
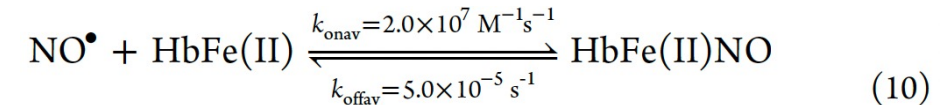
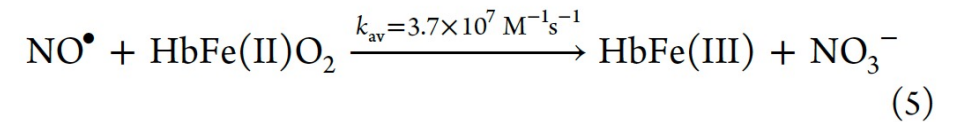
- O NO• se liga principalmente a centros metálicos; reação de nitrosilação.
- Seus alvos são dependentes do local de sua produção e faixa de concentração.



Na vasculatura, a produção de NO• é insensível a [O₂] (~150 µM); Já no cérebro, esta é dependente da [O₂] (~20 µM).

Enzima	K _M O ₂ (µM)
eNOS	2-4
nNOS	300
iNOS	130

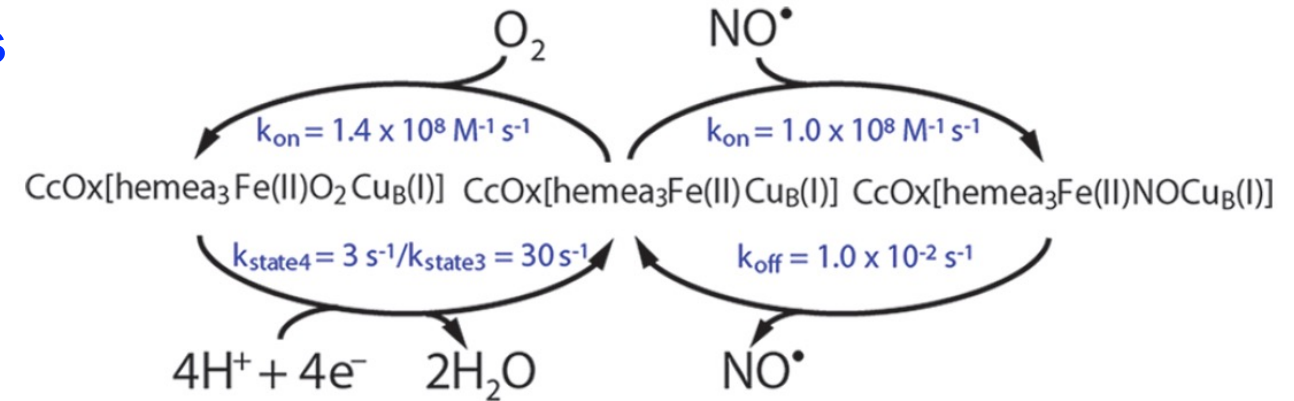
$$\frac{-d[\text{NO}^\bullet]}{dt} = [\text{NO}^\bullet](k_{\text{on}1}[\text{target}_1] + k_{\text{on}2}[\text{target}_2] + k_{\text{on}3}[\text{target}_3] + \dots) \quad (9)$$



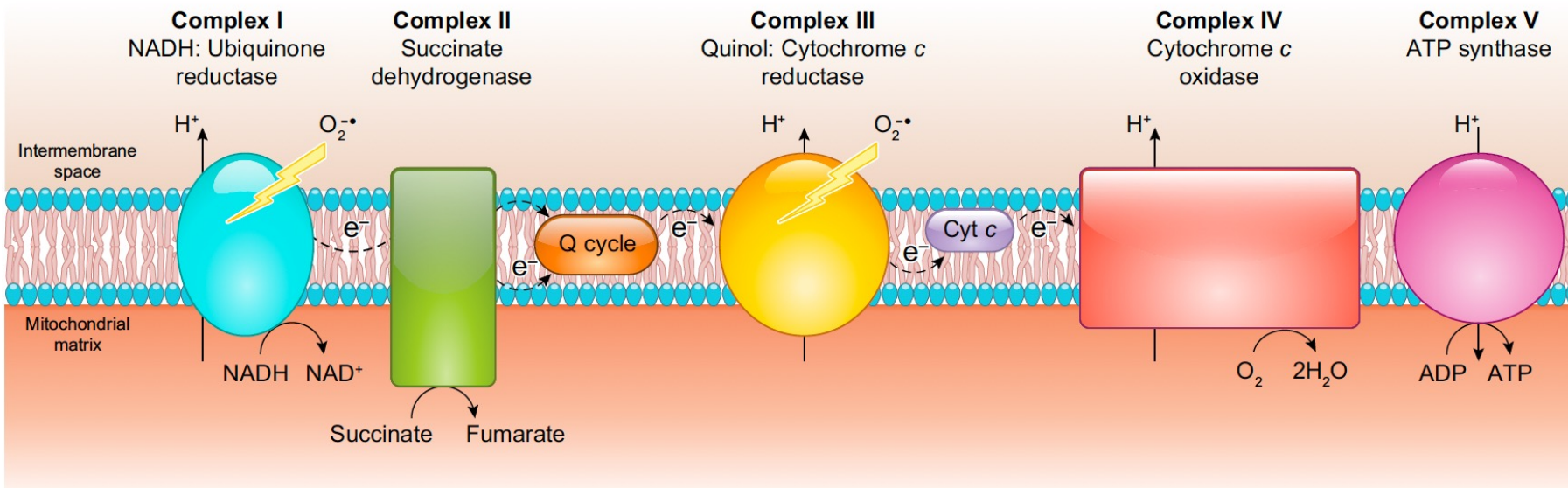
Camundongo infectado com parasita

Alvos biológicos do óxido nítrico

- O NO^\bullet se liga principalmente a centros metálicos; reação de nitrosilação.



Complexo IV da cadeia transportadora de e⁻

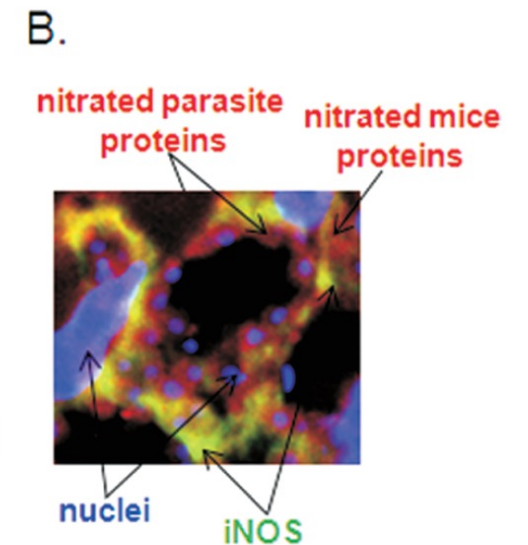
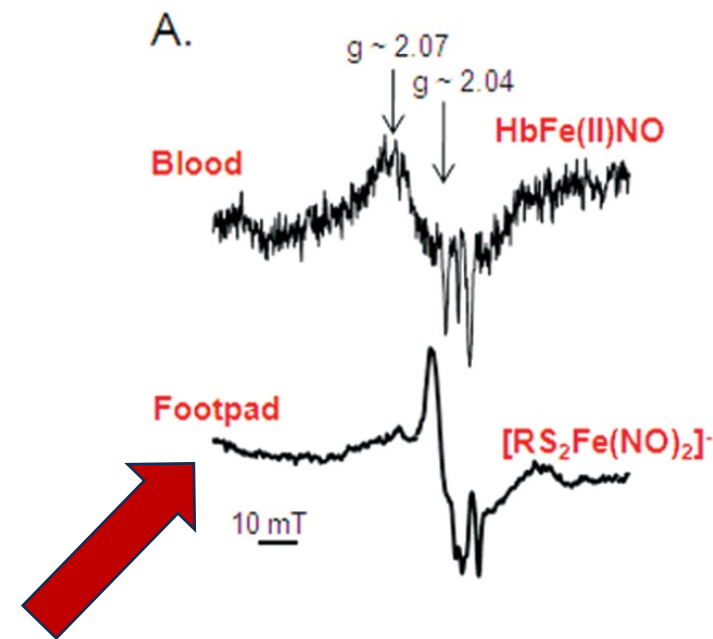
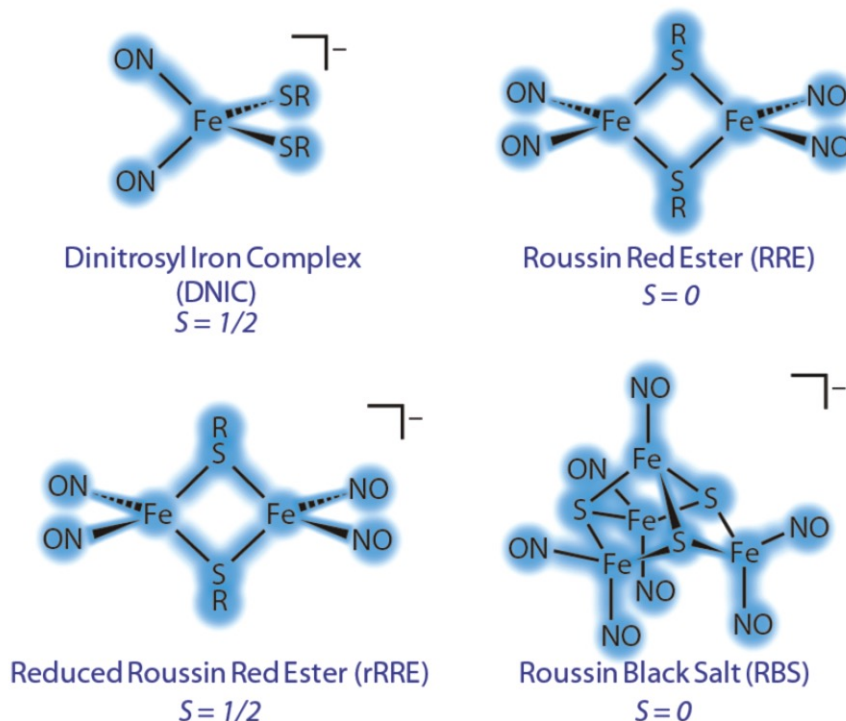


Tejero *et al*, *Physiol Rev*, 2019;
Toledo and Augusto, *CRT*, 2012.

Alvos biológicos do óxido nítrico

- O NO• se liga principalmente a centros metálicos.

Formação de complexos ferro-dinitrosilo, a partir da reação do NO• com e ferro quelatável ou proteínas contendo centros de Fe-S



Alvos biológicos do óxido nítrico

Proc. Natl. Acad. Sci. USA
Vol. 87, pp. 1620–1624, February 1990
Medical Sciences

Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide

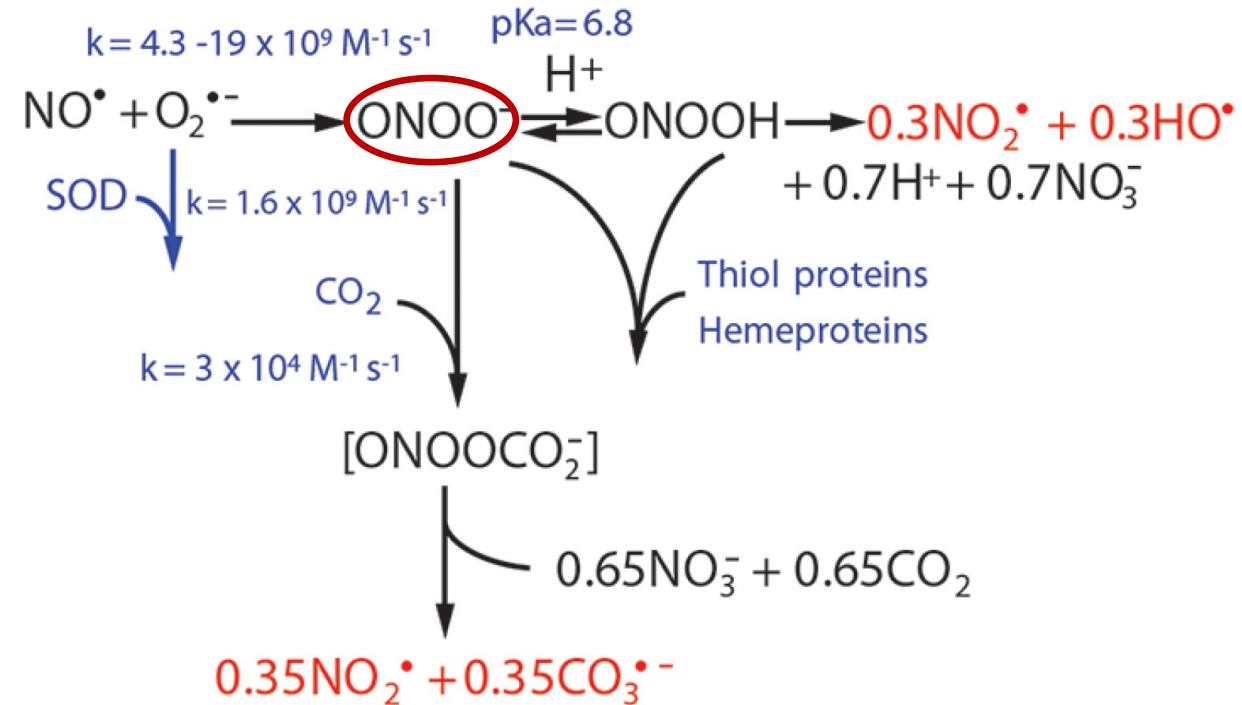
(endothelium-derived relaxing factor/desferrioxamine/ischemia/superoxide dismutase)

JOSEPH S. BECKMAN*†, TANYA W. BECKMAN*, JUN CHEN*, PATRICIA A. MARSHALL*,
AND BRUCE A. FREEMAN*‡

Departments of *Anesthesiology and ‡Biochemistry, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, AL 35233

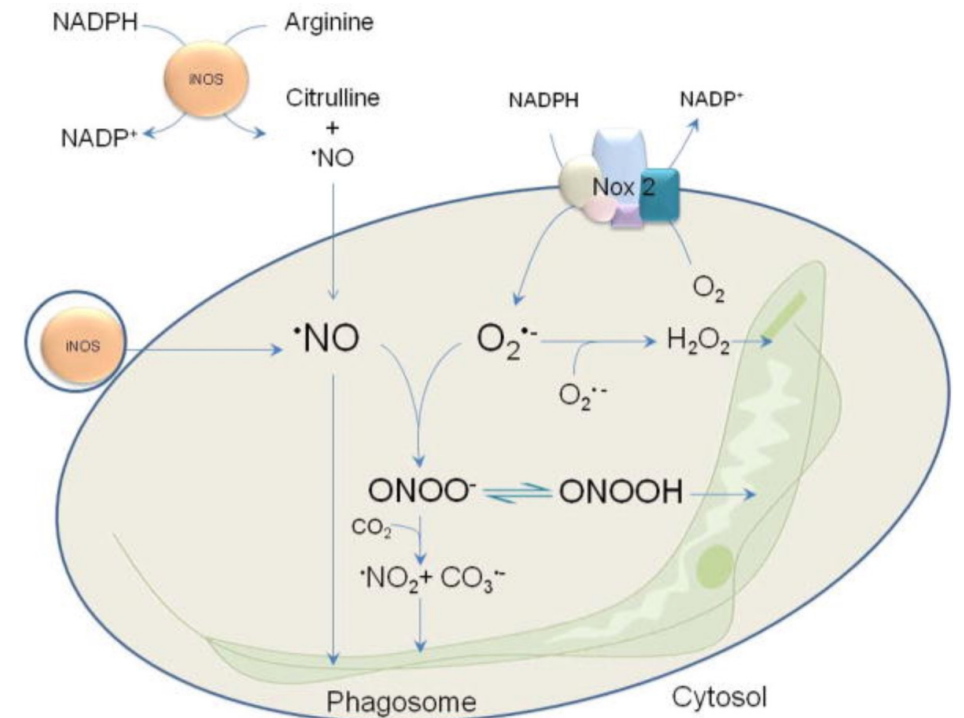
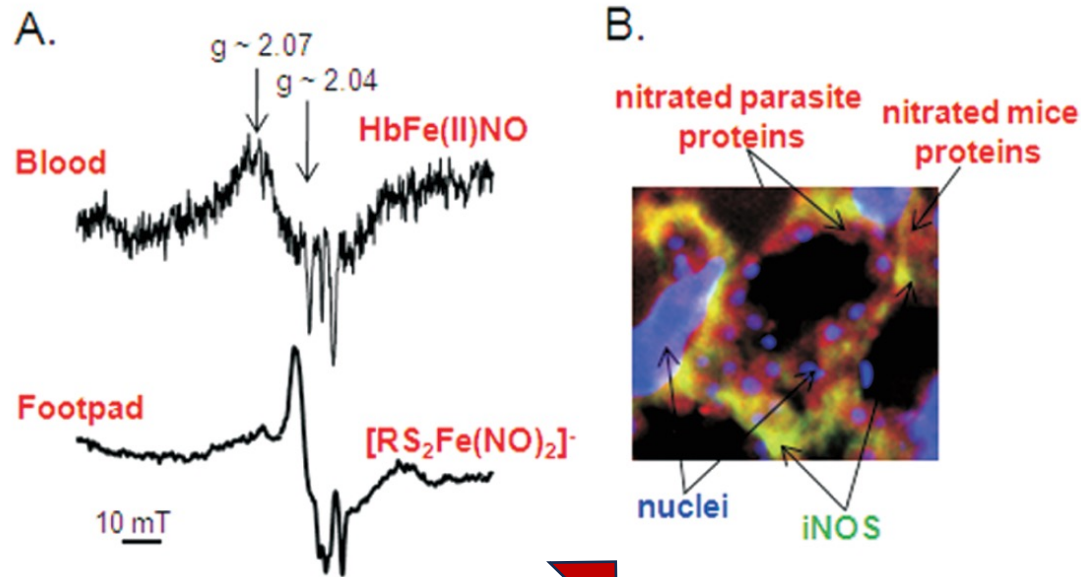
Communicated by Irwin Fridovich, December 4, 1989 (received for review October 4, 1989)

- O NO^\bullet pode reagir com $\text{O}_2^{\bullet-}$ formando o potente oxidante peroxinitrito, ONOO^- .
 - Efeitos protetores da superóxido dismutase contra dano no endotélio vascular.
 - Peroxinitrito decai para radicais bastante reativos: OH^\bullet , $\text{CO}_3^{\bullet-}$ e NO_2^\bullet .



Produção concomitante de óxido nítrico e superóxido em fagócitos

- Indução de NOS2 e ativação de NOX2 no fagossomo gera um fluxo de peroxinitrito contra parasitas.



As NOS podem funcionar desacopladas gerando superóxido

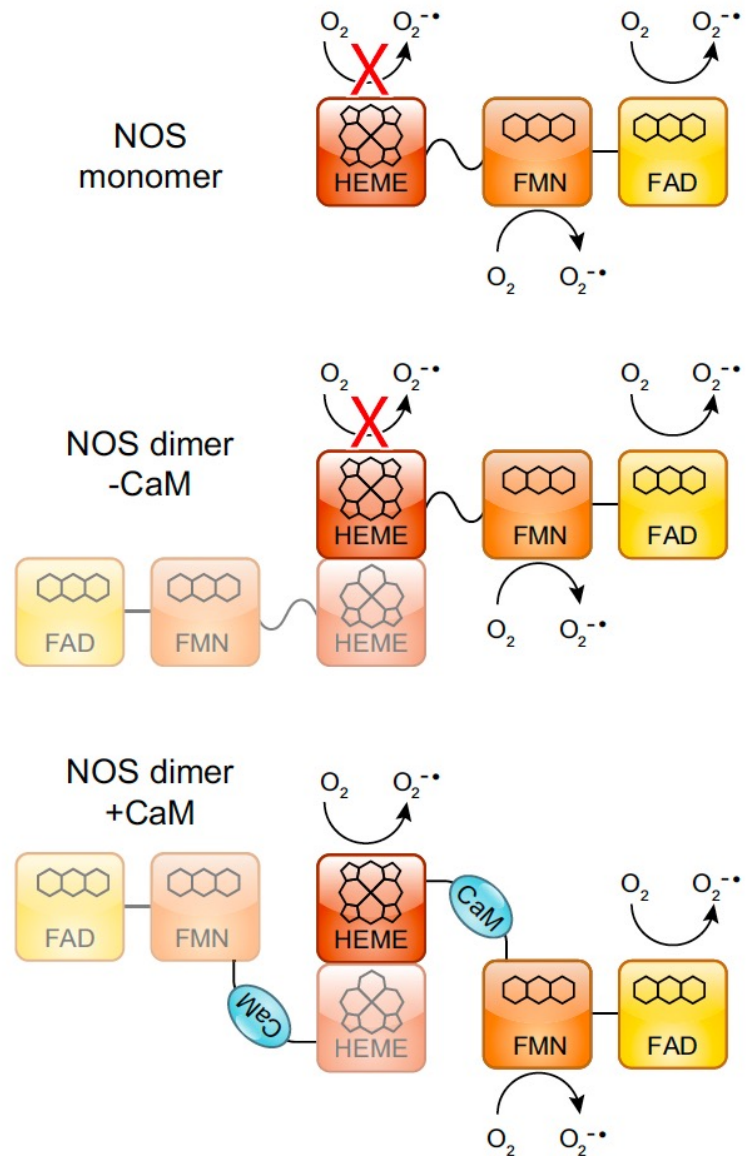
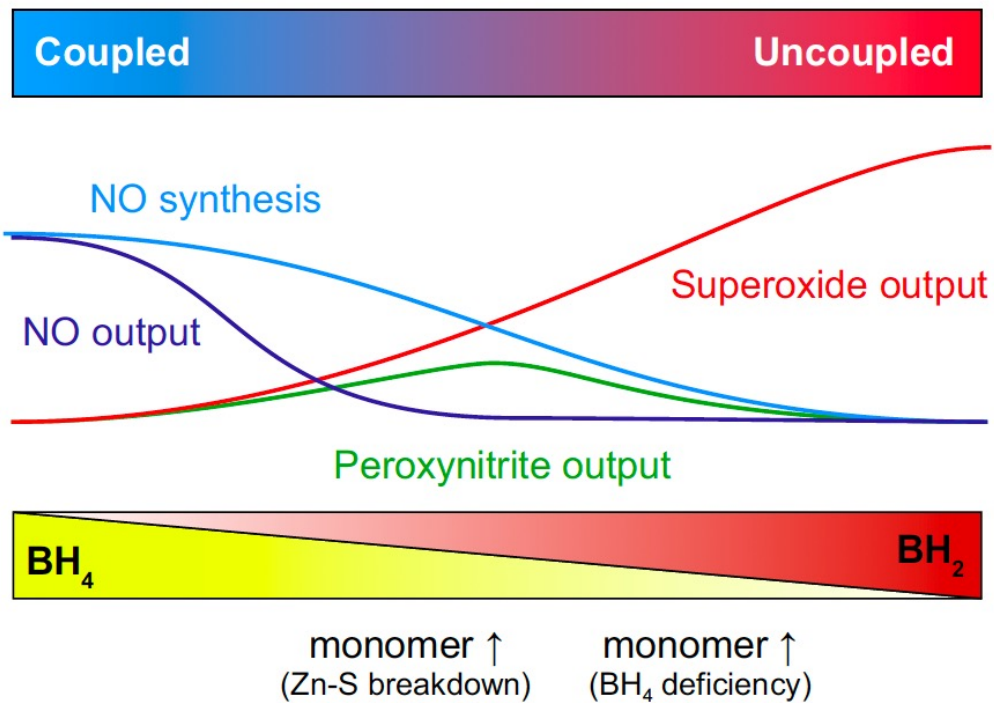
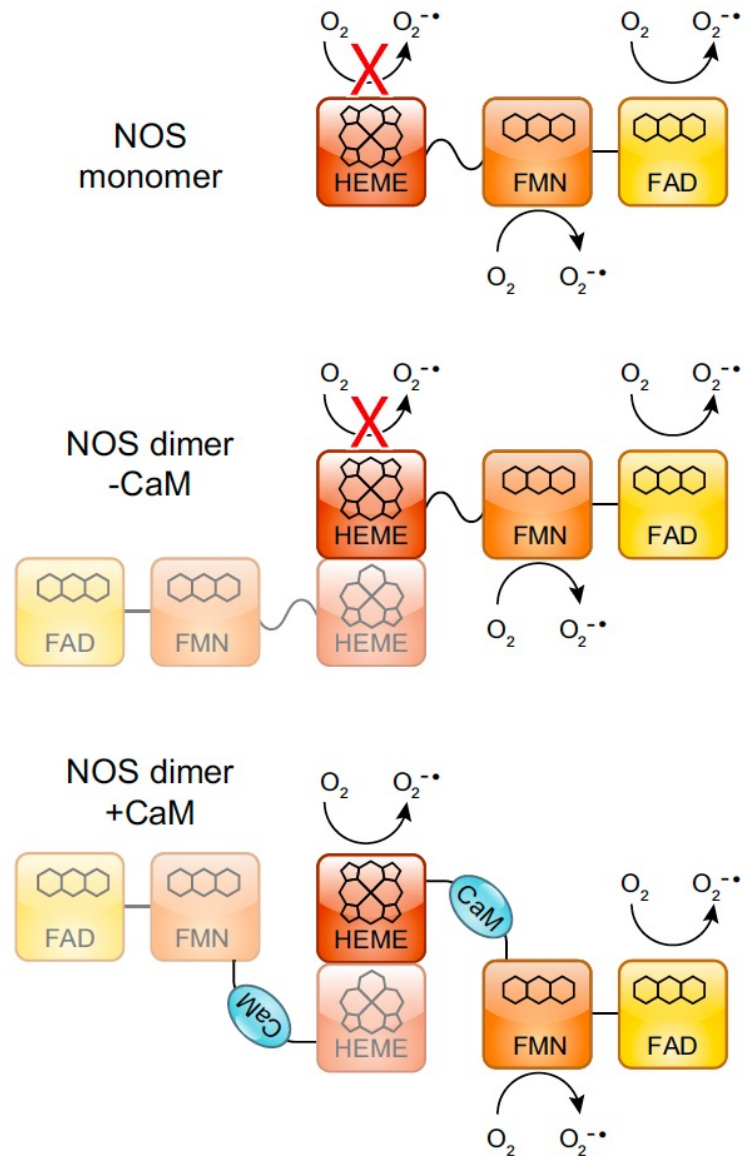


Table 6. Relative effect of different factors on eNOS superoxide and NO production

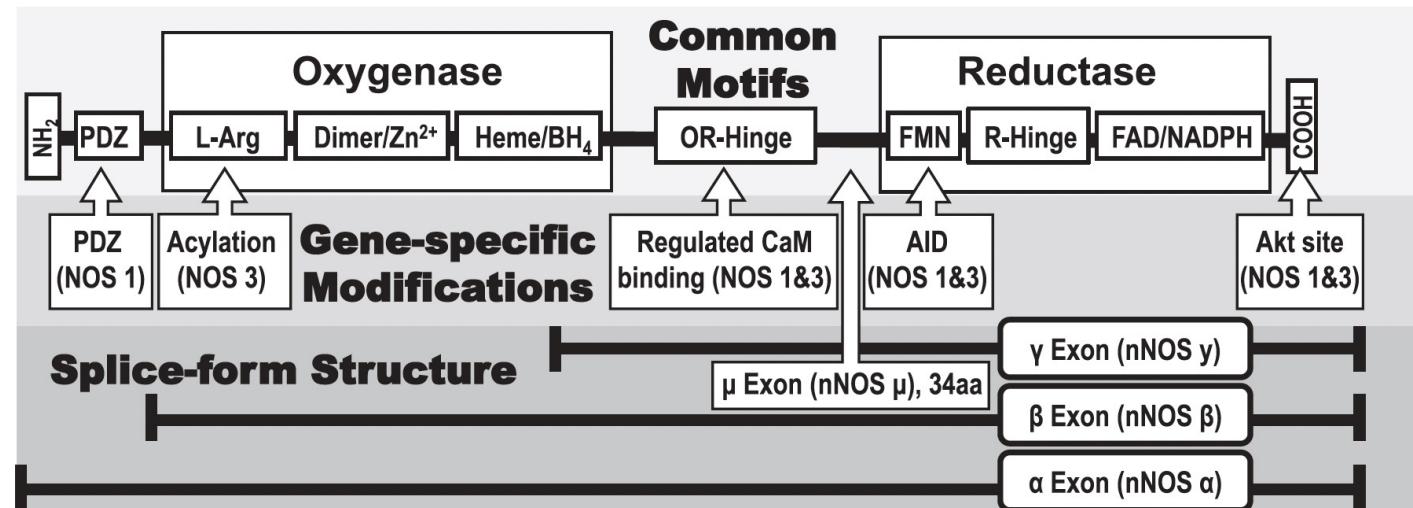
Superoxide Production	Pterin	Substrate	Other	NO Synthesis
+++	None	L-arginine		None
+++	None	ADMA		None
+++	None	None		None
++	BH ₂	L-arginine		None
++	BH ₂	None		None
+	BH ₄	L-arginine	S1177p	+
=	BH ₄	L-arginine		=
=	BH ₄	L-arginine	T495p	-

As NOS podem funcionar desacopladas gerando superóxido



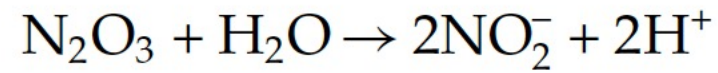
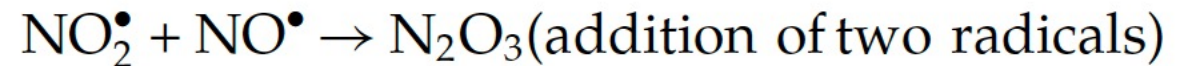
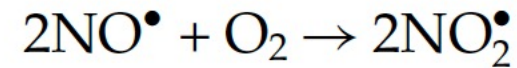
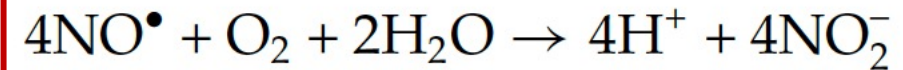
Compartimentalização na ação do óxido nítrico?

- A NOS possuem interações proteína-proteína e modificações pós-traducionais que induzem sua localização em organelas e na membrana plasmática. Ocorrem em diferentes isoformas. Além disso, a disponibilidade de substratos e alvos do NO^\bullet devem ser tomados em consideração (expressão de NOX, geração de $\text{O}_2^{\bullet-}$ e presença de SOD).
 - Ex: perda de NOS1 da membrana de células musculares causa dano isquêmico e infamação, apesar da expressão de outras isoformas. Crítico no exercício e serve como paradigma para estudar outros tecidos.



Outras rotas envolvendo o óxido nítrico e seus produtos?

- **Reação entre NO• e O₂?**



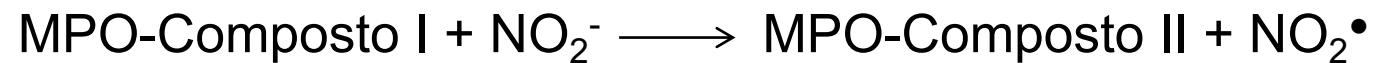
- **NO• atuando na terminação da peroxidação lipídica.**



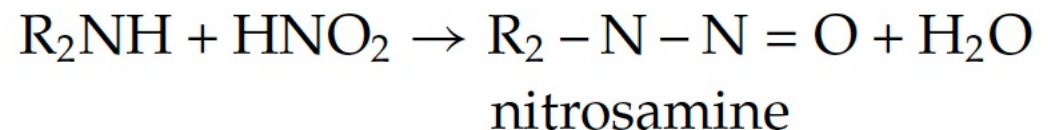
Nitrosolipídios

Outras rotas envolvendo o óxido nítrico e seus produtos?

- Nitrito pode ser oxidado pela mieloperoxidase a NO_2^\bullet em condições inflamatórias.



- Nitrito na dieta pode levar a formação de cancerígenos no estômago.



Questões e Exercícios

- 1. Explique as possíveis rotas de produção de óxido nítrico in vivo, mencionando enzimas e outras proteínas associadas, substratos e distribuição no organismo.**
- 2. Descreva o principal mecanismo de sinalização mediado pelo óxido nítrico.**
- 3. Descreva outros alvos biológicos do óxido nítrico e justifique sua importância relativa em base a concentrações das biomoléculas e velocidades de reação química.**
- 4. Discorra sobre a inter-relação entre espécies oxidantes derivadas do oxigênio e do nitrogênio mostrando reações químicas.**
- 5. Mencione algumas condições em que a formação de peroxinitrito pode ser relevante. Justifique.**
- 6. Qual mecanismo você encontra plausível para a formação de nitroso tióis? Por que?**

Bibliografía

- **Halliwell and Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, 5th Edition, 2015.**
- **Manuscritos citados.**