

Eu, Juliana Filipa Carvalho da Rocha, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2009010194, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade curricular de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, de setembro de 2014

(Juliana Filipa Carvalho da Rocha)

Índice

Abreviaturas.....	2
Resumo	3
Abstract	4
1. Introdução.....	5
2. Importância fisiológica do óxido nítrico.....	6
2.1. Concentração apoptótica de óxido nítrico	7
3. Reações biológicas	8
3.1. Biossíntese de óxido nítrico.....	8
3.2. Síntese de óxido nítrico por redução de nitrito.....	9
3.3. S-nitrosilação.....	10
3.4. Alteração do DNA.....	11
3.5. Estabilidade do óxido nítrico.....	11
4. Ação do óxido nítrico em tumores vascularizados.....	12
4.1. Tumores vascularizados	12
4.2. Concentração de óxido nítrico nas células tumorais.....	13
5. Potencial terapêutico do óxido nítrico/nitrito	15
5.1. Potencial antitumoral	16
5.2. Suscetibilidade celular	17
6. Barreiras à terapêutica.....	17
6.1. Toxicidade.....	17
6.2. Administração.....	18
6.2.1. Como controlar a liberação de óxido nítrico pelos dadores.....	19
7. Conclusões	20
Referências Bibliográficas.....	21

Abreviaturas

cGMP – Guanosina Monofosfato Cíclico

eNOS – Sintase do Óxido Nítrico Endotelial

GST – Glutathione-S-Transferase

HPPN – Hipertensão Pulmonar Primária nos Recém-Nascidos

HPV – Papiloma Vírus Humano

iNOS – Sintase do Óxido Nítrico Indutível

MM – Mieloma Múltiplo

NK – (células) Natural Killer

nNOS – Sintase do Óxido Nítrico Neuronal

NO – Óxido Nítrico

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral α

VEGF – Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

Resumo

O óxido nítrico (NO) desempenha um papel fundamental na destruição de células tumorais por um mecanismo de apoptose. Contudo, nem sempre este mecanismo é suficiente para eliminar estas células e evitar que elas se transformem em células imortais. Aparentemente, uma das principais razões para a falha deste sistema deriva da incapacidade em manter uma concentração de NO suficientemente elevada para induzir apoptose. Deste modo, parece ser plausível a hipótese de que a manutenção em estado estacionário de uma concentração elevada de NO nestas células será uma forma eficaz de as eliminar e, portanto, uma possível terapêutica antitumoral. No entanto, considerando que o NO é um radical livre que tem a capacidade de induzir a apoptose também em células saudáveis, é difícil encontrar uma forma de administração desta molécula que não seja prejudicial às funções fisiológicas do organismo. Há várias possibilidades em estudo, como a utilização de nitrito como pró-fármaco e a incorporação do NO em estruturas de transporte macromoleculares. É expectável que num futuro próximo se possa utilizar o NO como agente terapêutico no tratamento do cancro.

Palavras-chave:

Óxido nítrico (NO)

Tumores vascularizados

Nitrito

Antitumoral

Abstract

Nitric oxide (NO) plays a critical role in the elimination of erroneous cells resulting from normal biological processes, by inducing apoptosis. However, this mechanism is not always effective to eliminate these cells and avoid their transformation into immortal cells. Apparently, the main reason why this system fails results from the inability to keep a steady state concentration of NO that is high enough to induce apoptosis. Therefore, it is obvious to consider the elimination of the erroneous cells by maintaining a high concentration of NO and, thus, a possible therapy against vascularized tumors. On the other hand, considering that NO is a free radical that induces apoptosis also in normal cells, it is difficult to find a solution for its deliver without harming the normal physiological functions of the organism. There are many possibilities being tested, such as the use of nitrite as a prodrug and the incorporation of NO in macromolecular scaffolds. It is expected in a near future the use of NO as a therapeutic agent in antitumoral treatments.

Keywords:

Nitric oxide (NO)

Vascularized tumors

Nitrite

Antitumoral

I. Introdução

A descoberta das funções fisiológicas do NO na década de 1980 foi um marco muito importante para a comunidade científica, tendo sido nomeada “Molécula do Ano” em 1992, pela conceituada revista *Science*. O NO é a molécula mais pequena produzida na resposta imune e a que, por ser um gás hidrofóbico, se difunde mais rapidamente pela sua facilidade em permear as membranas biológicas (LARANJINHA, 2008). Encontra-se hoje bem estabelecido que intervém na resposta imune contra microrganismos, parasitas, órgãos transplantados rejeitados e tumores (HELLER, 2010).

A primeira linha de ataque aos neoplasmas são as células NK (*Natural Killer*) do sistema imunitário. Contudo, quando sobrevivem ao primeiro ataque e começam a crescer, a indução da apoptose pelo NO, produzido em excesso pelos macrófagos e pelas próprias células tumorais, torna-se a principal ou até a única forma de limitar a proliferação destas células. A supressão do tumor fica dependente da sensibilidade das células à apoptose induzida por NO e da sua concentração no estado estacionário. A forma induzida da sintase do NO (iNOS), quando sobre-expressa, é capaz de produzir NO rapidamente e em quantidade suficiente para manter a concentração indutora de apoptose. Isto verifica-se apenas quando não ocorre uma difusão rápida de NO para fora das células (*out-flux*). Assim, quando a apoptose é eficaz o tumor regride mas quando não é desenvolve-se significativamente (HELLER, 2010).

O óxido nítrico produzido pelas células é eliminado ou inativado através de reações químicas e por difusão. Os tumores expostos ao ar, nomeadamente os da pele e pulmões, representam cerca de 60% de todos os cancros, sendo que os da pele correspondem a aproximadamente metade do total, ocupando o primeiro lugar, seguidos dos tumores do pulmão com 10% (HELLER, 2010). Nestes tumores em particular, a rápida difusão de NO para o ar devido ao enorme gradiente de concentração aumenta a probabilidade de sobrevivência, uma vez que não se mantém uma concentração suficientemente elevada para a indução de apoptose (HELLER, 2010). Para além das perdas para o meio exterior, também o sangue participa ativamente na remoção de NO das células neoplásicas, sendo a hemoglobina o principal responsável pela sua eliminação. As proteínas presentes no sangue, principalmente a oxihemoglobina, podem ser nitrosiladas por ligação do NO, que vão depois libertar noutros locais do organismo, de modo que o sangue pode ser considerado como um reservatório desta molécula (HUANG *et al.*, 2001; JOSHI *et al.*, 2002). Assim, graças à inativação do NO pela hemoglobina e a difusão para o ar, o tumor tem melhores condições para sobreviver até à sua vascularização.

Após a vascularização, sendo o sangue a principal fonte de remoção do NO a partir dos tumores, a apoptose induzida por NO deixa de ser capaz de limitar a proliferação e há ainda um aumento do aporte de oxigénio e nutrientes. Todos estes fatores levam ao aumento da proliferação e transformam o neoplasma adormecido (inativo) num cancro agressivo.

Apesar das vantagens que a ele se podem associar, o NO apresenta muitas dificuldades como agente terapêutico devido à elevada toxicidade que tem para as células saudáveis e dado o seu curto tempo de vida e, conseqüente, difícil administração. Um dos possíveis meios de administração de uma terapêutica baseada em NO pode recorrer à utilização do nitrito que, por redução, origina NO (HELLER, 2010).

Esta monografia tem como objetivos estabelecer uma relação entre a atividade reguladora do NO e a suscetibilidade de células neoplásicas à sua ação e uma possibilidade de administração desta molécula baseada no nitrito, de modo a realçar a importância de apostar no desenvolvimento de uma terapêutica eficaz para uma das doenças mais complexas e temidas em todo o mundo: o cancro.

2. Importância fisiológica do óxido nítrico

O NO é uma molécula gasosa de pequenas dimensões, hidrofóbica e com elevada capacidade em permear as membranas biológicas. É um mensageiro celular que participa em múltiplas vias de sinalização de modo autócrino e parácrino, atuando na própria célula onde é produzido e nas células vizinhas, respetivamente, e atua também em locais do organismo distantes do local da sua produção (LANCASTER, 1997), sendo transportado por proteínas e péptidos. Estes elementos constituintes do sangue são reversivelmente S-nitrosilados pelo NO e transportam-no para os diferentes locais do organismo. A reversibilidade da reação permite que estas proteínas e péptidos libertem o NO nos destinos necessários e possam ser novamente nitrosilados a fim de o remover dos locais onde se encontra em excesso (HELLER, 2010; LARANJINHA, 2008).

O NO apresenta diversas funções fisiológicas, consoante a concentração em que se encontra no meio: vasodilatação (1-10 nM), neurotransmissão (100-300 nM), indução de apoptose (>1 µM), agregação e adesão de plaquetas, reparação de tecidos danificados e regulação do tónus muscular (BRUCKDORFER, 2005; RICCIO AND SCHOENFISCH, 2012; THOMAS *et al.*, 2008). As múltiplas funções que se apresentam fazem do NO uma molécula fundamental para a manutenção e regulação do organismo.

A ação do NO sobre a musculatura lisa decorre da ativação da guanil ciclase com consequente produção do segundo mensageiro cGMP, que promove o relaxamento muscular (IGNARRO *et al.*, 1987). Esta ação pode provocar diferentes efeitos biológicos como, por exemplo, bronco e vasodilatação (importante na regulação da pressão arterial e da perfusão coronária), ereção do pênis e aumento do peristaltismo.

Como neurotransmissor, o NO atua autócrina e paracrinamente nas células nervosas, devido à sua elevada difusividade (HARA AND SNYDER, 2007; LANCASTER, 1997). Vários estudos demonstraram que o NO está envolvido no processo de aprendizagem e formação de memória (BARTUS *et al.*, 2013; GARTHWAITE, 2008).

Uma outra função de elevada importância está associada à eliminação de organismos estranhos pelo sistema imune. Os macrófagos produzem NO que, pela sua capacidade de gerar radicais livres, induz a morte programada de vários microrganismos (bactérias, vírus e parasitas) e de células anormais (ALLEN *et al.*, 2012). Nas plaquetas, o NO desempenha uma ação inibitória, nomeadamente sobre as funções de adesão, ativação, agregação e recrutamento plaquetar. Ele é libertado pelo endotélio e pelas próprias plaquetas e a inibição é fundamental para evitar a formação de grandes trombos e as consequências a eles associadas. Graças às suas propriedades antibacterianas e efeitos secundários benéficos em várias fases da reparação de tecidos como, por exemplo, modulação da inflamação, angiogénese, proliferação celular, deposição de matriz e remodelação, o NO evita complicações derivadas de infeções bacterianas e promove a cicatrização de tecidos lesados (CARPENTER AND SCHOENFISCH, 2012).

2.1. Concentração apoptótica de óxido nítrico

O NO desencadeia a apoptose de células tumorais limitando a sua proliferação para concentrações superiores a 1 μM , cerca de 100 vezes maior que a concentração vasodilatadora. Contudo, isto não se aplica a todos os tumores, uma vez que depende da sensibilidade das células à apoptose induzida por NO, que é condicionada pelo tipo de célula e pela taxa de eliminação deste. A capacidade de induzir a apoptose é inversamente proporcional à eliminação do NO. Este valor de referência (1 μM) foi determinado através de ensaios com JS-K, um pró-fármaco precursor do óxido nítrico (KITAGAKI *et al.*, 2009).

Obviamente, para inferir acerca da suscetibilidade dos tumores aos fatores acima referidos, é necessária a realização de estudos e ensaios. Segundo HELLER (2010), para determinar a sensibilidade das células de um determinado tumor à apoptose induzida por NO deve obter-se uma cultura dessas mesmas células numa atmosfera controlada, contendo

NO e CO₂. As células são consideradas suscetíveis se sofrerem morte programada e determina-se a concentração de NO na cultura para saber qual a concentração necessária para obter este efeito. A concentração de NO nas culturas celulares pode ser obtida por vários métodos de quantificação como, por exemplo, quimiluminescência ou por via indireta através da quantificação de nitrito pelo método de Griess. Para determinar a taxa de eliminação do NO é necessário ter em conta as variações da concentração desta molécula em períodos de tempo definidos.

Considerando a importância fisiológica desta molécula tão multifacetada na eliminação de células anormais, é clara a necessidade de estudar a possibilidade de utilização do NO como uma terapêutica antitumoral.

3. Reações biológicas

O NO é produzido por diferentes tecidos e células, dos quais são exemplo o endotélio, as plaquetas, os macrófagos e os neurónios (CHEN *et al.*, 1998). Pode atuar no próprio local de produção, como na inibição das plaquetas e na neurotransmissão, ou pode ser libertado e atuar nas células vizinhas ou até em regiões mais distantes do organismo. A sua ação ocorre por ligação ao centro hémico e aos grupos sulfidriolo das proteínas, que tem consequências a nível da estrutura e função das mesmas. A principal via de sinalização envolve a ligação do NO ao Fe (ferro) do grupo heme da guanilato ciclase solúvel, que altera a conformação da proteína e estimula a síntese de guanosina monofosfato cíclico (GMPc), que é um segundo mensageiro que atua no interior da célula (BRYAN *et al.*, 2005).

3.1. Biossíntese de óxido nítrico

As enzimas responsáveis pela produção de óxido nítrico são as sintases de NO (NOS). A enzima funciona como um dímero, tal como se mostra na Fig. 1. Cada monómero apresenta dois domínios: um domínio C-terminal que atua como redutase e um N-terminal que atua como oxigenase (ANDREW AND MAYER, 1999).

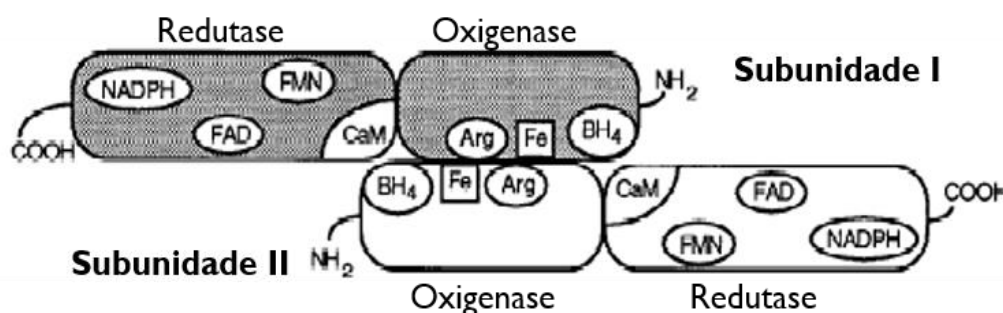
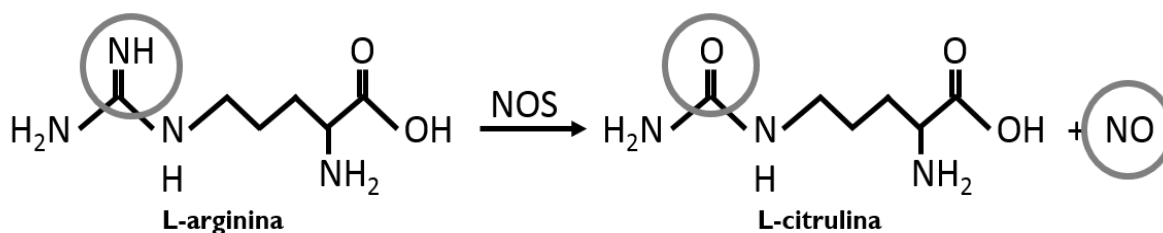


Figura 1 – Representação da estrutura da enzima NOS (adaptado de ANDREW AND MAYER, 1999).

Estas enzimas utilizam a L-arginina e o oxigênio para produzir o radical livre NO (LUNDBERG *et al.*, 2008). A NOS catalisa a oxidação da L-arginina, na presença de O₂ e NADPH, a L-citrulina e NO (1) (ANDREW AND MAYER, 1999).

(1)



Existem três tipos de NOS com elevada importância fisiológica: a NOS neuronal (nNOS), a NOS endotelial (eNOS) e a NOS indutível (iNOS). A nNOS e a eNOS são expressas constitutivamente e são dependentes de cálcio (Ca²⁺), por outro lado, a iNOS é expressa em grande quantidade apenas após indução por citocinas e outros mediadores inflamatórios e é independente do aumento da concentração de Ca²⁺ (ANDREW AND MAYER, 1999). A nNOS é expressa em neurónios do sistema nervoso central e periférico e sintetiza o NO envolvido na modulação da neurotransmissão. A eNOS produz o NO necessário para o normal funcionamento do sistema cardiovascular e é expressa pelas células endoteliais. A iNOS é expressa pelos macrófagos e pela grande maioria das células do sistema vascular, nomeadamente as células endoteliais e musculares lisas e os cardiomiócitos, e produz o NO responsável pela eliminação de agentes patogénicos e células mutadas (ANDREW AND MAYER, 1999; STUART-SMITH, 2002).

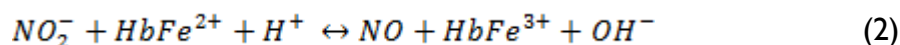
A NOS de maior relevância no caso particular dos tumores é a iNOS, cuja sobre-expressão é estimulada pelo fator de necrose tumoral α (TNF- α) e outras citocinas, produzidos e libertados por células tumorais (HELLER, 2010).

3.2. Síntese de óxido nítrico por redução de nitrito

O NO pode ainda ser produzido por uma via química alternativa e complementar à via enzimática da L-arginina-NOS que apresenta grande relevância, principalmente em estados de hipóxia (Fig. 2), por ser ativada à medida que a concentração de oxigénio diminui. A formação de NO independente da NOS funciona, assim, como uma via alternativa que garante a produção deste quando o aporte de oxigénio está limitado. Esta alternativa baseia-se na redução *in vivo*, nomeadamente no sangue e tecidos, do nitrito (NO₂⁻) a NO. O nitrito pode ser proveniente da dieta, da oxidação do NO produzido pelas enzimas NOS ou do metabolismo do nitrato (NO₃⁻) pelas bactérias presentes na saliva e trato gastrointestinal.

São várias as vias que levam à redução do nitrito a NO, envolvendo várias proteínas, enzimas e moléculas. Podem envolver a hemoglobina, mioglobina e xantina oxidase ou a reação com ascorbato e polifenóis (LUNDBERG *et al.*, 2008).

Segundo LUNDBERG *et al.* (2008), a hemoglobina atua como uma redutase de nitrito alostericamente regulada pelo pH e também pelo oxigénio, uma vez que tem que estar desoxigenada. O nitrito reage com a desoxihemoglobina ferrosa (HbFe²⁺) e com H⁺ e origina NO e metahemoglobina (HbFe³⁺), segundo a seguinte reação (2):



Não se sabe exatamente qual a concentração de O₂ a partir da qual a via dependente de NOS deixa de ser preponderante mas não há dúvidas de que a produção de NO dependente de nitrito ocorre quando a concentração de O₂ diminui (LUNDBERG *et al.*, 2008).

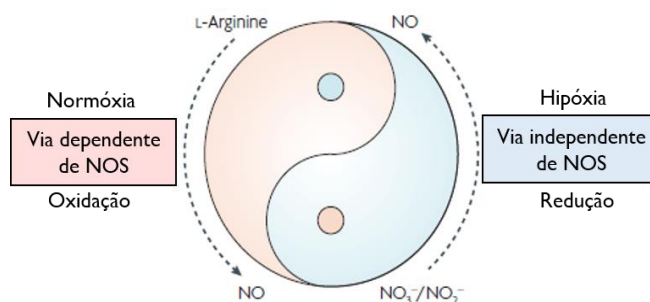
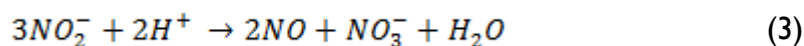


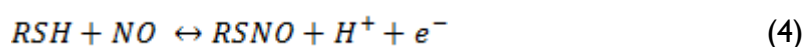
Figura 2 – Representação da via de síntese do NO dependente de oxigénio (adaptado de LUNDBERG *et al.*, 2008).

Heller (2010) defende que o nitrito armazenado nos eritrócitos pode ainda sofrer redução através de uma reação catalisada pela anidrase carbónica (3), que o converte em nitrato e NO:



3.3. S-nitrosilação

O NO resultante das reações acima referidas reage com proteínas intracelulares através de uma reação de S-nitrosilação (4), cujo equilíbrio eletroquímico determina o pH, o potencial oxidação-redução da célula e a dependência da concentração de NO para indução de apoptose.



A S-nitrosilação da caspase-3, uma protease com um resíduo de cisteína que intervém na maturação das citocinas, desencadeia apoptose celular, uma vez que esta reação

ativa a protease. A caspase-3 ativa, posteriormente, caspases iniciadoras que ativam mais caspase-3 e esta cliva proteínas e enzimas essenciais à célula, levando à sua morte. A caspase-3 é, portanto, um executor da morte programada das células (BRUEGGER *et al.*, 2014).

3.4. Alteração do DNA

Os mediadores da inflamação produzidos pelas células do sistema imune têm como objetivo destruir o que não está correto no organismo. Uma das suas armas é a produção de espécies reativas, como o NO e as ROS, que vão danificar o DNA e levar à apoptose celular (LARANJINHA, 2008).

A reação do NO com o superóxido (O_2^-) provoca danos oxidativos devido à formação de peroxinitrito ($ONOO^-$) (5), que é um potente oxidante, e as espécies reativas de nitrogénio, formadas a partir do NO, provocam a desaminação das bases nucleotídicas formando xantinas (DEROJAS-WALKER *et al.*, 1995; THOMAS *et al.*, 2008).



Os investigadores comprovaram que o principal indutor da apoptose é o NO ao inibirem a síntese deste radical e verificando uma diminuição dos danos provocados no DNA.

3.5. Estabilidade do óxido nítrico

O NO tem um tempo de vida curto (5 a 15 segundos) e difunde-se em grande extensão (LANCASTER, 1997). O seu tempo de vida e gradiente de difusão são limitados por reações de eliminação ou inativação que envolvem, principalmente, a hemoglobina. Contudo, o NO pode ser convertido pela ceruloplasmina em nitrito, que é um produto de oxidação mais estável que se acumula nos tecidos e eritrócitos e pode ser novamente convertido em NO (Fig. 3) (LUNDBERG *et al.*, 2008).

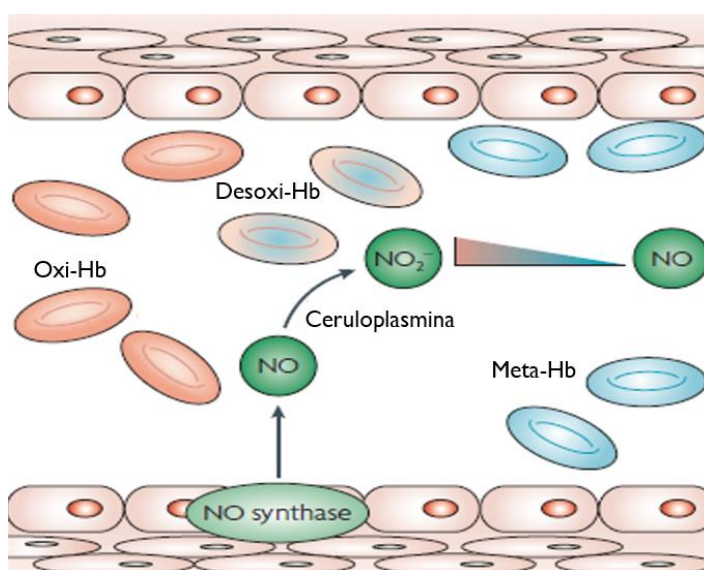


Figura 3 – Representação da oxidação do NO a nitrito pela ceruloplasmina; reação do nitrito com a desoxihemoglobina com formação de NO e metahemoglobina (adaptado de LUNDBERG *et al.*, 2008).

4. Ação do óxido nítrico em tumores vascularizados

O aumento da concentração de NO produz espécies reativas de nitrogênio que, juntamente com as ROS, originam *stress* oxidativo e nitrosativo, que leva à desaminação das bases de DNA, nitrosilação de enzimas (caspase-3), diminuição da função celular, aumento das reações inflamatórias, inibição da respiração mitocondrial e, conseqüentemente, à apoptose celular (CARPENTER AND SCHOENFISCH, 2012).

4.1. Tumores vascularizados

Os tumores são massas celulares que resultam de uma proliferação descontrolada de células tumorais que se tornaram imortais. Estas células surgem devido a mutações significativas no genoma, como danos nas bases nucleotídicas, *cross-linking* e quebras nas cadeias de DNA mal reparadas (LITTLE, 2000), e da ativação de oncogenes (BUTZ AND HOPPE-SEYLER, 1993).

Estas modificações podem ser desencadeadas por vários fatores como agentes químicos, radiação, hormonas, vírus (HPV) e até a dieta. Os agentes químicos, dos quais são exemplo alguns fármacos, e as radiações têm a capacidade de provocar alterações significativas no DNA celular e originar células tumorais (LITTLE, 2000). Os cancros hormonais (mama, endométrio, ovários, testículos, próstata, tiróide e osteossarcoma) apresentam um mecanismo único de carcinogénese, que decorre da acumulação de mutações genéticas pontuais, possibilitada pelo elevado número de divisões celulares induzidas por hormonas endógenas e exógenas (HENDERSON AND FEIGELSON, 2000).

A ação carcinogénica do vírus HPV tem particular importância no útero, onde este provoca alterações no epitélio cervical (BUTZ AND HOPPE-SEYLER, 1993). Os efeitos carcinogénicos dos nitritos e nitratos usados como conservantes alimentares são há muito conhecidos pela sua capacidade de originarem nitrosaminas *in vivo*. Para além destes, existem outros fatores relacionados com a dieta que podem ser carcinogénicos, como por exemplo dietas pobres em determinadas vitaminas e minerais, que juntos desempenham uma importante ação antioxidante (ROGERS *et al.*, 1993).

Numa fase inicial, os tumores proliferam lentamente e estão inativos, tornando-se agressivos após a vascularização. Os tumores vascularizados são tumores suportados por uma grande quantidade de vasos sanguíneos que lhes fornecem todos os nutrientes necessários para a sobrevivência e crescimento. Para além disso, o fluxo sanguíneo que serve os tumores remove muitos metabolitos resultantes das células em crescimento, preservando as células. A vascularização resulta de um processo em que os “vasos sanguíneos existentes

são recrutados, remodelados e cooptados para fornecer um suprimento de sangue aos tecidos tumorais avasculares” (DEPEILLE *et al.*, 2007). Neste processo, designado como angiogénese verifica-se a proliferação das células endoteliais, que produzem enzimas proteolíticas que degradam a matriz extracelular, alteram as suas propriedades adesivas, migram e diferenciam-se em novos vasos sanguíneos. O processo é controlado por fatores parácrinos tumorais angioproliferativos e componentes da matriz extracelular, como o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) (DEPEILLE *et al.*, 2007). O estudo realizado por CONNOLLY *et al.*, (1989) determinou que o VEGF favorece a angiogénese através do aumento de permeabilidade vascular e da indução da mitose das células endoteliais.

Os tumores podem ser benignos ou malignos consoante o seu comportamento biológico. Considera-se a forma como crescem, a organização da sua estrutura, a capacidade invasiva/destrutiva local, a velocidade com que se desenvolvem, a diferenciação das células, o número de mitoses, a antigenicidade e a capacidade de metastizar (PORDEUS *et al.*, 2013).

Os tumores malignos surgem de uma série de mutações somáticas que decorrem da divisão celular (HENDERSON AND FEIGELSON, 2000). Estes tumores crescem rápida e desordenadamente, invadem e destroem os tecidos nos locais onde crescem, apresentam uma estrutura desorganizada, as células têm vários graus de diferenciação, pelo que não apresentam muitas semelhanças com as células que lhes deram origem, e sofrem um elevado número de mitoses que são atípicas, produzem antigénios e metástases (crescimento neoplásico em locais distantes do local onde teve início) (PORDEUS *et al.*, 2013).

Os carcinomas são tumores malignos que afetam células de revestimento da pele e do pulmão e apresentam uma evolução bidimensional inicial na interface do tumor com o ar e um descontrolo rápido, que se pensa estarem associados ao contacto com o ar (HELLER, 2010; PORDEUS *et al.*, 2013). O NO é eliminado em grande extensão a partir das células das camadas superiores da junção derme-epiderme e a partir das células ciliares pulmonares em contacto com o ar. Daqui resulta uma baixa concentração de NO incapaz de induzir apoptose (HELLER, 2010). Como resultado, as células tumorais desenvolvem-se quase sem resistência por parte do organismo.

4.2. Concentração de óxido nítrico nas células tumorais

A concentração de NO nos tumores da pele e pulmões não atinge os níveis indutores de apoptose devido à depleção contínua do excesso de NO. A rápida difusão é um fator limitante da sua atividade nas células quando as reações são mais lentas do que a difusão (LANCASTER, 1997). O *out-flux* (eliminação por efluxo) desta molécula do tumor

para o ar ou para o sangue depende da área de contacto e do gradiente de concentração na barreira tumor-ar/sangue. Segundo HELLER (2010), o gradiente de concentração é diretamente proporcional à diferença de concentração tumor-ar ou tumor-sangue e inversamente proporcional à espessura da barreira entre os dois meios, e estes fatores determinam taxa de efluxo de NO.

Para que ocorra a apoptose induzida por NO é necessário que a concentração deste radical se mantenha a valores superiores a $1 \mu\text{M}$ em estado estacionário. Nestas condições, a concentração é inversamente proporcional à taxa de eliminação ou inativação, a qual depende das taxas de reação e difusão para o exterior. A concentração de NO no sangue é 10^2 - 10^3 vezes inferior a $1 \mu\text{M}$. Como resultado, o NO difunde para a corrente sanguínea a favor do gradiente de concentração, sendo este *out-flux* dependente da área de vascularização do tumor: quanto mais vascularizado, maior o *out-flux* (HELLER, 2010).

No ar, a concentração de NO é de aproximadamente 5 ppb que, pela lei de Henry, corresponde a 10 pM em solução aquosa, ou seja, 10^5 vezes inferior a $1 \mu\text{M}$. O gradiente de concentração é portanto muito elevado, o que implica que o NO se difunda não só para a corrente sanguínea mas também para o ar de modo que, mesmo que haja sobre-expressão de iNOS, “a apoptose não é induzida nas células mutadas por radiações UV (pele) ou por partículas do ar (pulmão)”, o que as torna propensas para o cancro. Assim, compreende-se o porquê de câncros da pele e pulmão serem os mais frequentes e também os de pior prognóstico: o constante contacto com o ar, tanto na pele como no pulmão, aumenta o gradiente de concentração; a evaporação do suor resultante do gradiente de temperatura à superfície da pele e o fluxo respiratório diminuem a espessura da barreira (HELLER, 2010).

Como resultado de todas estas condicionantes, os carcinomas das células basais e escamosas e os melanomas começam a desenvolver-se à superfície da pele (epiderme) e depois invadem as camadas mais profundas da derme, após a vascularização e eliminação de NO pelo fluxo sanguíneo. No caso dos carcinomas das células da mucosa pulmonar, os brônquios são o local onde surgem devido ao rápido fluxo de ar. A conclusão a que se pode chegar considerando estes fatores é que a terapêutica contra tumores vascularizados e avançados poderia ser baseada na redução do *out-flux* de NO através do aumento da sua concentração sanguínea (HELLER, 2010). Segundo este autor, o aumento da concentração de NO_2^- nos glóbulos vermelhos e sua conversão em NO reduzirá o gradiente de concentração na interface tumor-sangue e, conseqüentemente, também o *out-flux* a partir do tumor será reduzido.

5. Potencial terapêutico do óxido nítrico/nitrito

As funções do NO em condições fisiológicas bem como fisiopatológicas são de tal modo importantes e variadas que parece óbvia a sua utilização terapêutica (RICCIO AND SCHOENFISCH, 2012). As terapêuticas atuais baseadas em NO são de dois tipos: compostos dadores ou adutos que libertam NO e fármacos que alteram a sua produção enzimática.

Várias terapêuticas promissoras têm sido baseadas na manipulação da NOS, a fim de alterar as concentrações endógenas de NO. Contudo, não têm tido sucesso devido à falta de especificidade no local de ação, pelo que se aposta na administração de NO exógeno (RICCIO AND SCHOENFISCH, 2012).

O problema da sua instabilidade e curto tempo de vida foi atenuado em algumas terapêuticas através da utilização de dadores mais estáveis de NO. Uma das aplicações terapêuticas mais conhecidas e largamente utilizadas é a administração sublingual de nitratos, como a nitroglicerina e o mononitrato de isossorbido, no alívio rápido da dor associada às crises de angina de peito. A formulação sublingual é a escolhida para as crises agudas porque a dissolução do nitrato na cavidade oral faz com que este seja mais rapidamente convertido em nitrito pela flora comensal da boca e com que a ação vasodilatadora do NO ocorra mais rapidamente (LUNDBERG *et al.*, 2008).

Em infeções bacterianas da pele também se utiliza o NO, aplicado topicamente e diretamente sobre o local a tratar, para eliminação dos microrganismos (LUNDBERG *et al.*, 2008).

No tratamento de situações isquémicas, como enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral e transplante de órgãos, o NO desempenha também um papel importante na medida em que atua como citoprotetor (LUNDBERG *et al.*, 2008). A isquémia seguida de reperfusão leva à produção de grande quantidade de ROS pela mitocôndria. O NO atua através da inibição do complexo I da cadeia transportadora de eletrões mitocondrial por S-nitrosilação, diminuindo a formação de ROS durante a reperfusão e evitando, assim, danos celulares, necrose e apoptose (LUNDBERG *et al.*, 2008). Nestas aplicações terapêuticas, o NO é normalmente administrado através de pró-fármacos, nomeadamente nitratos, por via oral ou transdérmica.

O nitrito como dador de NO também tem sido estudado para outras patologias, como é o caso da hipertensão pulmonar primária nos recém-nascidos (PPHN), uma patologia devida a uma elevada resistência vascular pulmonar com consequente oxigenação sistémica baixa. A inalação de nitrito, após conversão em NO, demonstrou um aumento da

vasodilatação pulmonar em ovelhas, com aumento da oxigenação sistêmica (LUNDBERG et al., 2008).

5.1. Potencial antitumoral

Se as células tumorais em cultura sofrerem apoptose, então é de admitir o tratamento do tumor através da administração oral de doses subtóxicas de NO. KIZILTEPE et al., (2007) estudaram a citotoxicidade do JS-K, um derivado N-diazeniodiolato (REN et al., 2003) que é um dador de NO de baixo peso molecular (RICCIO AND SCHOENFISCH, 2012), em células de mieloma múltiplo (MM). O JS-K é um pró-fármaco precursor de NO, ativado pela glutathione-S-transferase (GST), que induz quebra de cadeias duplas de DNA, ativa as vias de resposta de danos ao DNA e induz apoptose *in vitro* e *in vivo* em células de MM. Este demonstrou citotoxicidade significativa tanto nas linhas celulares de MM resistentes como nas sensíveis à terapêutica convencional (KIZILTEPE et al., 2007). Os investigadores verificaram ainda que a citotoxicidade induzida pelo JS-K foi aumentada quando associado a bortezomib, um anticorpo monoclonal.

Os resultados das terapêuticas com base no NO dependem muito da sua concentração e da duração de contacto com o alvo. Concentrações da ordem dos μM são necessárias para inibir o crescimento de células tumorais enquanto concentrações da ordem dos pM têm efeito angiogénico e promovem a proliferação (Fig. 4). Deste modo, a concentração e o tempo de vida do NO determinam se ele atua como promotor ou supressor (CARPENTER AND SCHOENFISCH, 2012; THOMAS et al., 2008).



Figura 4 – Representação da dualidade de efeitos do NO dependente da concentração (retirado de CARPENTER AND SCHOENFISCH, 2012).

Os dadores de baixo peso molecular apresentam desvantagens, nomeadamente na falta de seletividade e rápida eliminação, pelo que há necessidade de uma alternativa mais eficaz (RICCIO AND SCHOENFISCH, 2012). Assim, para que as terapêuticas sejam eficazes, o NO tem que ser armazenado e libertado apenas nas doses necessárias durante períodos de tempo limitados. Como o tempo de vida do NO é muito curto, este deve ser libertado em zonas específicas, muito próximas do alvo (CARPENTER AND SCHOENFISCH, 2012).

Apesar de o NO ser já utilizado como agente terapêutico em situações específicas, principalmente para problemas cardiovasculares, topicamente para problemas dermatológicos e inalado para problemas pulmonares, os dadores de NO têm vindo a ser desenvolvidos com o objetivo de se conseguir armazenar e libertar o NO de uma forma mais controlada, de modo que esta biomolécula possa ter outras utilizações, nomeadamente no tratamento de tumores vascularizados (CARPENTER AND SCHOENFISCH, 2012).

5.2. Suscetibilidade celular

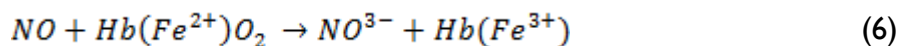
As terapêuticas com NO foram já testadas em várias linhas celulares tumorais com dadores de baixo peso molecular, como por exemplo os nitritos e nitratos. A conclusão a que se chegou foi que a suscetibilidade das células ao NO depende, em primeiro lugar do tipo de célula, da concentração de NO e da oxigenação do local em que este é libertado. Assim, as concentrações tóxicas para as células tumorais não implicam uma toxicidade tão elevada para as células saudáveis como se verifica com outras terapêuticas, como é o caso da quimioterapia. Contudo, estas terapêuticas nunca passaram à fase clínica do desenvolvimento devido à incapacidade de controlar a concentração e a libertação. O que se pretende é a libertação controlada no alvo para maior eficácia e controlo da toxicidade (CARPENTER AND SCHOENFISCH, 2012).

6. Barreiras à terapêutica

6.1. Toxicidade

O nitrito foi considerado biologicamente inerte e conhecido apenas como um resíduo potencialmente carcinogénico na cadeia alimentar. Contudo, a descoberta da existência do ciclo do nitrato-nitrito-NO levou à realização de estudos no âmbito do papel do nitrito e também do nitrato nos processos fisiológicos que se sabe serem regulados pelo NO (LUNDBERG *et al.*, 2008).

As principais preocupações associadas à administração de nitrito estão relacionadas com a formação de metahemoglobina e com a carcinogenicidade (LUNDBERG *et al.*, 2008). A metahemoglobina forma-se quando o ferro transportador de oxigénio (Fe^{2+}) do grupo heme é oxidado a Fe^{3+} , como se pode observar na reação 6, que é incapaz de ligar oxigénio (JOSHI *et al.*, 2002).



Estudos em animais utilizando o nitrito intravenoso demonstraram que o aumento da metahemoglobinemia é pouco significativo mesmo após uma administração prolongada. Foram também realizados estudos epidemiológicos em humanos que não conseguiram apresentar provas da atividade carcinogénica do nitrito, mesmo utilizando doses suficientemente elevadas para provocar metahemoglobinemia. Estes resultados sugerem que o risco de carcinogenicidade com a utilização de doses baixas de nitrito, durante tratamentos curtos, é insignificante (LUNDBERG *et al.*, 2008). Contudo, questiona-se se este risco se manterá insignificante nas doses e duração necessárias para o tratamento de tumores.

A utilização de NO através de dadores não específicos apresenta várias desvantagens em termos de eficácia e efeitos secundários, nomeadamente toxicidade para as células saudáveis, hipotensão e cefaleias.

6.2. Administração

A necessidade de libertar o NO de uma forma controlada levou a uma forte aposta no desenvolvimento de dadores de NO. Existem já várias classes de dadores de baixo peso molecular nas quais se incluem: nitritos, nitratos, N-diazeniodiolatos, complexos metal-NO, entre outros. Estes são usados sobretudo em estudos de influência do NO exógeno em várias patologias, contudo, a impossibilidade de os direcionar para locais específicos, as preocupações sobre a toxicidade, as baixas concentrações de óxido nítrico atingidas e a sua rápida eliminação dificultam o seu desenvolvimento para a clínica (RICCIO AND SCHOENFISCH, 2012).

Neste sentido, a investigação tem-se dirigido para as estruturas macromoleculares (*scaffolds*) libertadoras de NO, como proteínas, partículas orgânicas e inorgânicas, polímeros sintéticos, entre outras, como forma de melhorar o potencial farmacológico desta biomolécula. Segundo RICCIO AND SCHOENFISCH (2012), um veículo macromolecular ideal deverá ser multifuncional e constituído por vários dadores de NO para garantir a entrega de uma dose adequada no local necessário. Com este fim, vários investigadores têm tentado desenvolver sistemas capazes de libertar doses precisas diretamente em determinados tecidos. Os *scaffolds* macromoleculares são particularmente promissores devido à sua capacidade de armazenar e libertar maiores quantidades de NO, de forma mais controlada e eficaz do que os dadores de baixo peso molecular.

Com o desenvolvimento desta tecnologia, podem até ser utilizados os dois tipos de dadores. Podem, por exemplo, encapsular-se dadores de baixo peso molecular (Fig. 5),

como o nitrito, conseguindo-se um maior controlo na libertação devido ao facto de o NO não difundir livremente através da estrutura e necessitar que a água difunda para o interior do *scaffold* para iniciar a libertação da molécula (RICCIO AND SCHOENFISCH, 2012). Esta junção é conseguida também através da incorporação de nitrito em lipossomas e polímeros, entre outros tipos de veículos.

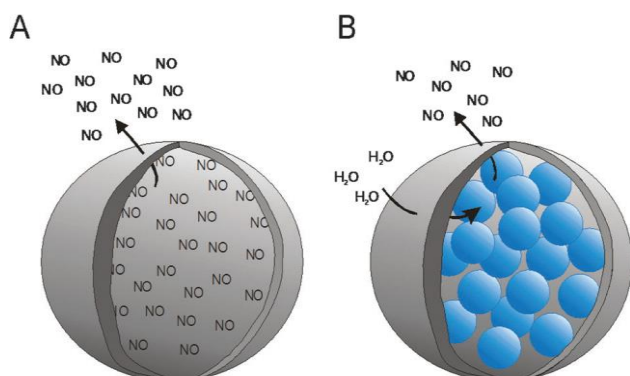


Figura 5 - Representação de (A) NO gasoso e de um (B) dador de NO de baixo peso molecular encapsulados em vesículas macromoleculares (retirado de RICCIO AND SCHOENFISCH, 2012)

6.2.1. Como controlar a libertação de óxido nítrico pelos dadores

O controlo da libertação do NO a partir dos dadores macromoleculares exige a utilização de técnicas bioquímicas e tecnológicas que alterem o comportamento destes dadores.

As alterações poderão consistir em proteger o iniciador da decomposição do dador, por exemplo, através da adição de ligações adicionais, utilizar núcleos magnéticos, adicionar sondas fluorescentes e ligandos específicos para o alvo (por exemplo, anticorpos) ou aplicar um “ativador” externo como, por exemplo, um estímulo luminoso para dadores fotolábeis, que permita controlar onde e quando ocorre a libertação de NO. Estas alterações podem ainda ser associadas à incorporação de dadores de NO em estruturas macromoleculares, como se pode observar na figura 6 (CARPENTER AND SCHOENFISCH, 2012).

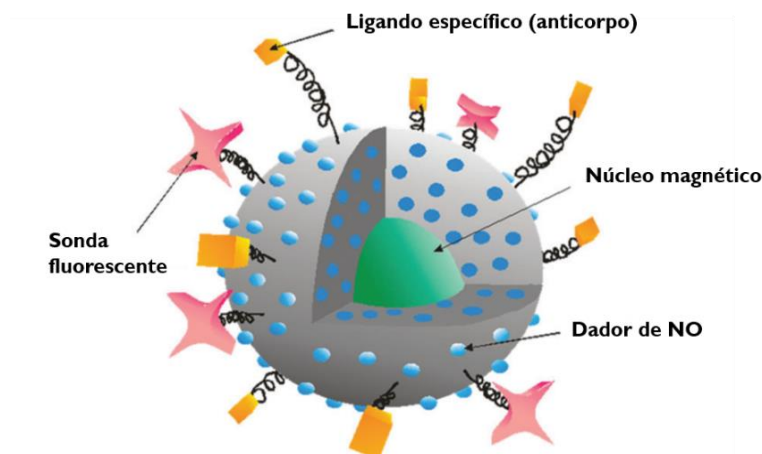


Figura 6 – Representação de um dador macromolecular de NO multifuncional (adaptado de RICCIO AND SCHOENFISCH, 2012).

7. Conclusões

O NO, pelo leque de funções que apresenta em condições fisiológicas e patológicas, tem muitas potencialidades como agente terapêutico. Contudo, a sua reatividade tem dificultado a utilização no desenvolvimento de terapêuticas eficazes, devido aos efeitos tóxicos que comporta e também pelas dificuldades de manipulação e administração, acabando a maioria das terapêuticas desenvolvidas por nunca chegar à fase clínica do desenvolvimento.

O facto de o NO atuar sobre células tumorais e de a suscetibilidade das células saudáveis e tumorais para a apoptose por NO ser diferente representa uma oportunidade terapêutica de elevada importância, considerando que o cancro é uma doença cada vez mais frequente na população e uma preocupação em termos de saúde pública à escala global. O facto de as células apresentarem diferente suscetibilidade ao NO implica vantagens relativamente às terapêuticas mais utilizadas, nomeadamente a radio e quimioterapia, vantagens essas que são de extrema relevância considerando os graves efeitos secundários destas terapêuticas e a redução que provocam na qualidade de vida dos doentes. Assim, esta é uma alternativa terapêutica na qual é necessário apostar até obtenção de resultados favoráveis que permitam que ela chegue à fase clínica dos estudos.

O controlo da libertação, da concentração e da taxa de libertação do NO é fundamental para o desenvolvimento de terapêuticas eficazes que tenham por base esta biomolécula e é nestas variáveis que os estudos têm sido focados. O objetivo é precisamente a obtenção de melhores resultados terapêuticos com menos efeitos secundários, de modo a conseguir maiores taxas de sobrevivência com qualidade de vida.

Para conseguir controlar a administração do NO é necessário desenvolver veículos muito próximos do veículo ideal, o que implica grandes desafios e limitações a nível tecnológico e financeiro. Contudo, mesmo que se consigam desenvolver os veículos ideais para a entrega do NO nos tumores, mantém-se a particularidade das ações opostas sobre as células tumorais, nomeadamente a apoptose e a angiogénese. O NO só poderá ser utilizado como antitumoral em monoterapia quando se conseguir fazer chegar uma concentração suficientemente elevada ao tumor sem que permaneçam concentrações residuais que potenciem o crescimento tumoral.

Entretanto, a associação com outras terapêuticas antitumorais pode ser benéfica, na medida em que é possível uma ação sinérgica entre o NO, como sensibilizador das células, e um segundo antitumoral, que contrarie o efeito angiogénico do NO. Para além de eficácia

aumentada, poderá haverá vantagens também a nível de efeitos secundários visto que a associação permite reduzir as doses necessárias.

No caso particular dos tumores vascularizados e avançados, principalmente da pele e pulmões, verifica-se um elevado aporte de oxigénio devido à vascularização, o qual pode conferir vantagens na terapêutica com NO, considerando, por exemplo, a ação nefasta do NO sobre o DNA associada à reação com o oxigénio. Assim, associando a elevada oxigenação do tumor com a entrega específica de uma elevada concentração de NO, consegue-se obter danos celulares muito mais severos e prejudiciais para o tumor.

O que se espera para o futuro é o tratamento bem-sucedido de tumores, incluindo os mais difíceis e em estados avançados, de modo a prolongar e melhorar a vida dos doentes. Esse sucesso pode depender do NO.

Referências Bibliográficas

ALLEN, R. G.; LAFUSE, W. P.; POWELL, N. D.; WEBSTER MARKETON, J. I.; STINER-JONES, L. M.; SHERIDAN, J. F.; BAILEY, M. T. - Stressor-induced increase in microbicidal activity of splenic macrophages is dependent upon peroxynitrite production. **Infection and immunity**. ISSN 1098-5522. 80:10 (2012) 3429–37.

ANDREW, P. J.; MAYER, B. - Enzymatic function of nitric oxide synthases. **Elsevier Science**. 43 (1999) 521–531.

BARTUS, K.; PIGGOT, B.; GARTHWAITE, J. - Cellular targets of nitric oxide in the hippocampus. **PloS one**. ISSN 1932-6203. 8:2 (2013) e57292.

BRUCKDORFER, R. - The basics about nitric oxide. **Molecular aspects of medicine**. ISSN 0098-2997. 26:1-2 (2005) 3–31.

BRUEGGER, J.; SMITH, B.; SMITH, S. W. - S-nitrosation. EUA: The Scripps Research Institute. [Acedido a 1 de março de 2014]. Disponível na Internet: <http://www.scripps.edu/marletta/research/research4.html>

BRYAN, N. S.; FERNANDEZ, B. O.; BAUER, S. M.; GARCIA-SAURA, M. F.; MILSOM, A. B.; RASSAF, T.; MALONEY, R. E.; BHARTI, A.; RODRIGUEZ, J.; FEELISCH, M. - Nitrite is a

signaling molecule and regulator of gene expression in mammalian tissues. **Nature chemical biology**. . ISSN 1552-4450. 1:5 (2005) 290–7.

BUTZ, K.; HOPPE-SEYLER, F. - Transcriptional control of human papillomavirus (HPV) oncogene expression: composition of the HPV type 18 upstream regulatory region. **Journal of virology**. ISSN 0022-538X. 67:11 (1993) 6476–86.

CARPENTER, A. W.; SCHOENFISCH, M. H. - Nitric oxide release: part II. Therapeutic applications. **Chemical Society reviews**. ISSN 1460-4744. 41:10 (2012) 3742–52.

CHEN, B.; KESHIVE, M.; DEEN, W. M. - Diffusion and reaction of nitric oxide in suspension cell cultures. **Biophysical journal**. ISSN 0006-3495. 75:2 (1998) 745–54.

CONNOLLY, D. T.; HEUVELMAN, D. M.; NELSON, R.; OLANDER, J. V.; EPPLEY, B. L.; DELFINO, J. J.; SIEGEL, N. R.; LEIMGRUBER, R. M.; FEDER, J. - Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. **The Journal of clinical investigation**. ISSN 0021-9738. 84:5 (1989) 1470–8.

DEPEILLE, P. E.; DING, Y.; BROMBERG-WHITE, J. L.; DUESBERY, N. S. - MKK signaling and vascularization. **Oncogene**. ISSN 0950-9232. 26:9 (2007) 1290–6.

DEROJAS-WALKER, T.; TAMIR, S.; JI, H.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. - Nitric oxide induces oxidative damage in addition to deamination in macrophage DNA. **Chemical research in toxicology**. ISSN 0893-228X. 8:3 (1995) 473–7.

GARTHWAITE, J. - Concepts of neural nitric oxide-mediated transmission. **The European journal of neuroscience**. ISSN 1460-9568. 27:11 (2008) 2783–802.

HARA, M. R.; SNYDER, S. H. - Cell signaling and neuronal death. **Annual review of pharmacology and toxicology**. ISSN 0362-1642. 47 (2007) 117–41.

HELLER, A. - Electrochemistry and nitric oxide mass transport in cancer: why ingestion of sodium nitrite could be effective in treating vascularized tumors. **Physical chemistry chemical physics : PCCP**. ISSN 1463-9084. 12:34 (2010) 9972–9975.

HENDERSON, B. E.; FEIGELSON, H. S. - Hormonal carcinogenesis. **Oxford University Press**. 21:3 (2000) 427–433.

HUANG, Z.; LOUDERBACK, J. G.; GOYAL, M.; AZIZI, F.; KING, S. B.; KIM-SHAPIRO, D. B. - Nitric oxide binding to oxygenated hemoglobin under physiological conditions. **Biochimica et biophysica acta**. ISSN 0006-3002. 1568:3 (2001) 252–60.

IGNARRO, L. J.; BUGA, G. M.; WOOD, K. S.; BYRNS, R. E.; CHAUDHURI, G. - Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Medical Sciences**. 84 (1987) 9265–9269.

JOSHI, M. S.; FERGUSON, T. B.; HAN, T. H.; HYDUKE, D. R.; LIAO, J. C.; RASSAF, T.; BRYAN, N.; FEELISCH, M.; LANCASTER, J. R. - Nitric oxide is consumed, rather than conserved, by reaction with oxyhemoglobin under physiological conditions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. ISSN 0027-8424. 99:16 (2002) 10341–6.

KITAGAKI, J.; YANG, Y.; SAAVEDRA, J. E.; COLBURN, N. H.; KEEFER, L. K.; PERANTONI, A. O. - Nitric oxide prodrug JS-K inhibits ubiquitin E1 and kills tumor cells retaining wild-type p53. **Oncogene**. ISSN 1476-5594. 28:4 (2009) 619–24.

KIZILTEPE, T.; HIDESHIMA, T.; ISHITSUKA, K.; OCIO, E. M.; RAJE, N.; CATLEY, L.; LI, C.; TRUDEL, L. J.; YASUI, H.; VALLET, S.; KUTOK, J. L.; CHAUHAN, D.; MITSIADES, C. S.; SAAVEDRA, J. E.; WOGAN, G. N.; KEEFER, L. K.; SHAMI, P. J.; ANDERSON, K. C. - JS-K, a GST-activated nitric oxide generator, induces DNA double-strand breaks, activates DNA damage response pathways, and induces apoptosis in vitro and in vivo in human multiple myeloma cells. **Blood**. ISSN 0006-4971. 110:2 (2007) 709–18.

LANCASTER, J. R. - A Tutorial on the Diffusibility and Reactivity of Free Nitric Oxide. **Academic Press**. 1:1 (1997) 18–30.

LARANJINHA, J. - Oxidative stress: from the 1980's to recent update. **Springer Publ**. 351 (2008).

LITTLE, J. B. - Radiation carcinogenesis. **Oxford University Press**. 21:3 (2000) 397–404.

LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. - The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature reviews. Drug discovery**. ISSN 1474-1784. 7:2 (2008) 156–67.

PORDEUS, M. I.; WERNECK, M. A.; TOMASSINI, E.; PANITZ, L.; FAILLACE, T. - **Oncologia - Manual de bases técnicas** [Em linha]. 16^a ed. Brasília. [Consult. 13 de junho de 2014]. Disponível na Internet: <URL:http://www2.jfrs.jus.br/wp-content/uploads/2013/10/manual_oncologia_16ed.pdf>. ISBN 0416040195.

REN, Z.; KAR, S.; WANG, Z.; WANG, M.; SAAVEDRA, J. E.; CARR, B. I. - JS-K, a novel non-ionic diazeniumdiolate derivative, inhibits Hep 3B hepatoma cell growth and induces c-Jun phosphorylation via multiple MAP kinase pathways. **Journal of cellular physiology**. ISSN 0021-9541. 197:3 (2003) 426–34.

RICCIO, D. A.; SCHOENFISCH, M. H. - Nitric oxide release: part I. Macromolecular scaffolds. **Chemical Society reviews**. ISSN 1460-4744. 41:10 (2012) 3731–41.

ROGERS, A. E.; ZEISEL, S. H.; GROOPMAN, J. - Diet and carcinogenesis. **Oxford University Press**. 14:11 (1993) 2205–2217.

STUART-SMITH, K. - Demystified. Nitric oxide. **Molecular pathology : MP**. ISSN 1366-8714. 55:6 (2002) 360–6.

THOMAS, D. D.; RIDNOUR, L. A.; ISENBERG, J. S.; FLORES-SANTANA, W.; SWITZER, C. H.; DONZELLI, S.; HUSSAIN, P.; VECOLI, C.; PAOLOCCI, N.; AMBS, S.; COLTON, C. A.; HARRIS, C. C.; ROBERTS, D. D.; WINK, D. A. - The chemical biology of nitric oxide: implications in cellular signaling. **Elsevier Science**. ISSN 0891-5849. 45:1 (2008) 18–31.

Imagem da capa:

BENJAMIN, B. – Nitric Oxide and Cancer: Prognosis, Prevention and Therapy. 1st ed. Los Angeles: Springer, 2010. [Consult. 20 de agosto de 2014]. Disponível na Internet:<URL:http://books.google.pt/books?id=jKi3ejl_NaoC&printsec=frontcover&hl=pt-PT#v=onepage&q&f=false>. ISBN 978-1-4419-1431-6e-ISBN 978-1-4419-1432-3.