



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2009/2010

Ana Isabel Pereira de Azevedo
MONÓXIDO DE CARBONO:
DO PAPEL FISIOLÓGICO
AO POTENCIAL TERAPÊUTICO

Abril, 2010

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Ana Isabel Pereira de Azevedo
MONÓXIDO DE CARBONO:
DO PAPEL FISIOLÓGICO
AO POTENCIAL TERAPÊUTICO

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Farmacologia e Terapêutica

**Trabalho efectuado sob a Orientação de:
Prof. Doutor Daniel Moura**

Revista Científica:
Arquivos de Medicina

Abril, 2010

FMUP

Eu, Ana Isabel Pereira de Azevedo, abaixo assinado, nº mecanográfico 040801167, aluna do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter actuado com absoluta integridade na elaboração deste projecto de opção.

Neste sentido, confirmo que NÃO incorri em plágio (acto pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/04/2010

Assinatura: Ana Isabel Pereira de Azevedo

Nome: Ana Isabel Pereira de Azevedo

Endereço electrónico: m04167@med.up.pt

Título da Dissertação/Monografia/Relatório de Estágio:

MONÓXIDO DE CARBONO: DO PAPEL FISIOLÓGICO AO POTENCIAL TERAPÊUTICO

Nome completo do Orientador:

Daniel Filipe de Lima Moura

Nome completo do Co-Orientador:

Ano de conclusão: 2010

Designação da área do projecto de opção:

Farmacologia e Terapêutica

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação/Monografia/Relatório de Estágio (*cutar o que não interessar*) apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 19/04/2010

Assinatura: Ana Isabel Pereira de Azevedo

MONÓXIDO DE CARBONO: DO PAPEL FISIOLÓGICO AO POTENCIAL TERAPÊUTICO

Uso terapêutico do monóxido de carbono

Ana Isabel Pereira de Azevedo

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

Contactos.

Ana Isabel Azevedo

Pcta. S. Gens, n.94, 1º Esquerdo

Custóias 4460-819 Matosinhos

E-mail: m04167@med.up.pt

Telefone: 93 648 77 69

Agradecimentos.

A presente monografia teve a colaboração e supervisão do Prof. Doutor Daniel Moura.

Resumo em Português: 106 palavras.

Resumo em Inglês: 93 palavras.

Texto principal: 4217 palavras.

Não existem conflitos de interesse a relatar.

ÍNDICE

RESUMO.....	4
ABSTRACT	5
INTRODUÇÃO.....	6
PRODUÇÃO ENDÓGENA DO CO.....	6
PAPEL FISIOLÓGICO DO CO.....	7
Sinalização intracelular.....	7
Sistema cardiovascular	7
Sistema nervoso.....	7
Sistema respiratório	8
Sistema reprodutivo.....	8
Sistema gastrointestinal	8
Rim	9
PAPEL PATOFISIOLÓGICO DO CO	9
Sistema nervoso.....	9
Sistema cardiovascular	9
Hipertensão arterial.....	10
Inflamação	10
Sistema respiratório	10
Transplante	11
Carcinogénese.....	11
POTENCIAIS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DO CO.....	11
Expressão da HO-1	11
CO: métodos de administração.....	12
Inalação.....	12
Pró-fármacos.....	14
Moléculas libertadoras de CO (carbon monoxide-releasing molecules).....	14
CONCLUSÃO	17

REFERÊNCIAS	19
TABELA 1	22
TABELA 2	23
FIGURA 1	24
FIGURA 2	25
FIGURA 3	26

RESUMO

O monóxido de carbono é uma molécula com propriedades tóxicas conhecidas há séculos. A identificação da sua produção no organismo humano e participação em diversos processos fisiológicos e patológicos tem aberto perspectivas para a sua futura utilização terapêutica. A inflamação, as doenças cardiovasculares, pulmonares e neurodegenerativas, a carcinogénese e o transplante de órgãos representam algumas áreas onde este gás pode desempenhar um papel benéfico. O desenvolvimento de moléculas libertadoras de monóxido de carbono constitui o passo mais importante para torná-lo um fármaco com aplicabilidade clínica e os resultados com elas obtidos têm sido muito promissores. Esta revisão congrega o conhecimento actual mais relevante sobre o tema.

Título abreviado. Uso terapêutico do monóxido de carbono.

Palavras-chave: monóxido de carbono, moléculas libertadoras de monóxido de carbono, uso terapêutico, heme-oxigenase.

ABSTRACT

Carbon monoxide is a molecule with toxic properties known over centuries. The recognition of its production in the human body, as well as its involvement in different physiological and pathological activities, has offered a new perspective over its future therapeutic application. Inflammation, cardiovascular, pulmonary and brain degenerative diseases, but also cancer and organ transplantation represent possible areas of intervention. The development of carbon monoxide-releasing molecules is the most important step to turn carbon monoxide into a pharmaceutical drug and results have been promising. This review includes the most recent knowledge about this theme.

Running title. Therapeutic use of carbon monoxide.

Key words: carbon monoxide, carbon monoxide-releasing molecules, therapeutic use, heme oxygenase.

INTRODUÇÃO

O papel prejudicial do monóxido de carbono (CO) é conhecido há centenas de anos e a ideia dominante é a de que apenas representa um tóxico, um poluente ou um resíduo (1). Durante mais de um século, foram extensamente estudados os efeitos de elevadas concentrações de CO e foi constatado que a intoxicação pode ser fatal, razão pela qual foi denominado de “*silent killer*” (1,2). Porém, os organismos vivos geram CO como parte das funções celulares normais e a sua produção parece aumentar durante condições patológicas (2). Será o CO um mero tóxico ou simples resíduo da actividade celular?

Ao longo da última década, tem-se assistido a uma transformação do seu conceito, reconhecendo-se a sua importância fisiológica em quase todos os sistemas de órgãos e investigando-se potenciais aplicações terapêuticas (1).

O objectivo desta monografia é a revisão da produção e papel endógeno do CO, suas implicações patológicas nos vários sistemas de órgãos e a apresentação das perspectivas terapêuticas, nomeadamente a possibilidade de utilizar o CO como um fármaco.

PRODUÇÃO ENDÓGENA DE CO

A maioria do CO produzido no organismo humano deriva da reacção catalisada pela enzima oxigenase do heme (HO), nas células reticuloendoteliais do fígado e baço (1). A HO catalisa a conversão do heme em ferro ferroso (Fe^{2+}), biliverdina e CO (2,3) (Figura 1). Estão descritas três isoformas da HO: HO-1, forma induzida; HO-2, forma constitutiva; HO-3, identificada em tecido de rato. A produção endógena independente do heme representa uma fonte menor de CO (1). A HO-1 é uma enzima microsómica abundante no baço, que é talvez o único órgão onde a quantidade desta isoforma é superior à de HO-2. A sua expressão aumenta perante ameaças à homeostasia e sobrevivência celulares (1,3). Exemplos incluem estímulos endógenos como a hipóxia, o *stress* oxidativo, as citocinas, o óxido nítrico (NO) e a hipoglicemia e exógenos como os lipopolissacarídeos e a radiação ultravioleta. A HO-2 está ancorada ao retículo endoplasmático ou à membrana celular e abunda, constitutivamente, no cérebro e nos testículos. Está presente noutros tecidos, em níveis inferiores (1,3). A sua expressão e actividade são estimuladas pelos glicocorticóides suprarrenais, pelos opiáceos e estrogénios (1).

A quantidade total de CO presente no organismo também depende do CO exógeno inalado e da metabolização de xenobióticos no fígado, pelo citocromo P450 (1). A maioria do CO produzido endogenamente difunde-se para o sangue, é transportada pela hemoglobina e é excretada pelos pulmões (1).

PAPEL FISIOLÓGICO DO CO

Sinalização intracelular

O CO activa diversas vias de sinalização intracelulares (Figura 2). A via principal é a que resulta na produção de monofosfato cíclico de guanosina (cGMP), catalisada pela guanililciclase (GC) (4). Tal como o NO, o CO liga-se directamente à GC, mas a activação da enzima pelo CO é 30 a 100 vezes menor do que pelo NO. A relação entre CO e NO depende da expressão de NO no tecido considerado: onde essa expressão é baixa, o CO assume um papel importante, enquanto que se a expressão de NO for elevada, o CO poderá ser antagonista parcial do NO, competindo pela ligação à GC (4).

O CO também activa de canais de potássio dependentes de cálcio e estimula a via da cínase das proteínas activada por mitogénios (MAPK) (4).

Sistema cardiovascular

O CO é um vasodilatador independente do endotélio (1). No coração, a hipóxia subjacente ao enfarte de miocárdio aumenta a expressão de HO-1 e a produção de CO, o qual conduz ao relaxamento vascular, melhora a perfusão cardíaca e contribui para a sua protecção (1).

A HO-2 encontra-se nos cardiomiócitos e nas células musculares lisas dos vasos (1).

No pulmão, o CO tem acções variáveis. Em resposta à hipóxia, os vasos sistémicos relaxam, mas os pulmonares contraem. A ventilação com CO previne a vasoconstrição pulmonar hipóxica em cães e atrasa a hipertensão pulmonar hipóxica em ratos (1).

Nas plaquetas, o CO inibe a libertação de difosfato de adenosina (ADP) e de serotonina, levando à inibição da agregação plaquetária (1). O aumento da HO-1 nos monócitos aumenta a produção de CO, que actua como anti-inflamatório (1).

Sistema nervoso

A HO-2 é responsável pela produção neuronal de CO. O seu aumento reduz a peroxidação lipídica, contribuindo para a protecção neuronal (1). Dada a co-localização neuronal da HO e da síntese de

NO (NOS), acredita-se que, assim como o NO, também o CO influencia a neurotransmissão, actuando como neurotransmissor não-adrenérgico, não-colinérgico (1). Ele interfere com o eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, exercendo papel inibitório na esteroidogénese (1). Nas células gliais, a expressão de HO-1 é induzida pela lise celular ou hemorragia, apontando para a participação no desenvolvimento neuronal e nas doenças neurodegenerativas (1).

O CO participa na adaptação ao estímulo olfactivo, visão, audição, regulação térmica e do ritmo circadiano, aprendizagem, memória e comportamento, nocicepção e actua como sinalizador nos quimiorreceptores carotídeos. Na hipóxia, há diminuição da biossíntese de CO e aumento da sensibilidade dos quimiorreceptores carotídeos (1).

Sistema respiratório

A inalação de CO, pela ligação à hemoglobina, diminuiu a capacidade de transportar oxigénio. Mas o CO previne a lesão pulmonar sob condições de hipóxia, por evitar a deposição de fibrina e inflamação pulmonares (1). O aumento da expressão de HO-1 em células epiteliais pulmonares humanas diminui o crescimento celular e protege as células da apoptose induzida pela hipóxia (1). Como a base do desenvolvimento da fibrose pulmonar assenta na apoptose celular e deposição de colagénio, o envolvimento do CO na fibrose pulmonar parece uma possibilidade real (1).

Sistema reprodutor

Tal como o NO, também o CO participa na erecção peniana e influencia a ejaculação, tendo sido reconhecido o seu papel nas acções mediadas pelos inibidores da fosfodiesterase 5 (5).

O CO participa na esteroidogénese ovárica, parto e lactação, e o nível basal de CO endógeno influencia o processo reprodutivo feminino (6). São conhecidos os efeitos inibitórios do CO na contractilidade uterina em seres humanos e os níveis baixos da expressão da HO ao longo da gestação participam na génese da pré-eclâmpsia (6).

Sistema gastrointestinal

A HO-2 é constitutivamente expressa nos plexos submucoso e mioentérico e a expressão da HO-1 é induzida no músculo liso gastrointestinal perante *stress* ou lesão. O CO actua como um neurotransmissor inibitório não-adrenérgico não-colinérgico no músculo liso circular, favorecendo a neurotransmissão inibitória pelo NO (7).

O aumento da expressão da HO-1 reduziu a lesão de isquemia/reperfusão em fígado de rato, apontando um papel funcional da díade HO/CO (1). A dupla HO/CO actua na circulação portal: o CO reduz o tónus sinusoidal e aumenta a perfusão portal (8).

O CO derivado da HO-2 estimula a libertação de insulina e o principal desencadeante da actividade HO/CO é a hiperglicemia (1).

Rim

Tanto a HO-1 como a HO-2 são expressas nos componentes renais vascular e tubular e desempenham um papel protector na lesão renal (1).

PAPEL PATOFISIOLÓGICO DO CO

Sistema nervoso

O sistema HO/CO foi associado a várias doenças neurodegenerativas. Nas doenças de Alzheimer e de Parkinson, a expressão da HO-1 aumenta (1). Em modelos animais de esclerose lateral amiotrófica (ELA), o aumento da HO-1 teve efeito protector (1). As convulsões febris aumentam a concentração de CO em modelos animais, mas as consequências funcionais permanecem por esclarecer. Especula-se um possível efeito protector nos neurónios lesados com o aumento da HO-1 em hemissecções da espinal medula (1). A HO-2 promove a degradação do heme (oxidante) e gera compostos antioxidantes, potencialmente neuroprotectores. A diminuição da sua actividade pode acarretar dano neuronal mediado por *stress* oxidativo (9).

A expressão prolongada de HO-1 nas células gliais subsequente a enfarte cerebral ou lesão cerebral traumática associou-se a melhoria da recuperação neuronal (10). A sua actividade contribui para a resolução da neuroinflamação (11). O papel do CO neste âmbito ainda é controverso, embora com comprovados efeitos anti-inflamatório e antiapoptótico (9).

Sistema cardiovascular

A HO-1 participa na patogenia de doenças cardiovasculares. O CO tem comprovadas propriedades anti-inflamatórias, vasodilatadoras, antiapoptóticas e angiogénicas, as últimas mediadas pelo aumento do factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) e factor 1 derivado de células do estroma (SDF-1) (1). Estudos documentam um efeito protector do sistema HO/CO na doença cardiovascular. Apesar da ausência de HO-1 ser rara em seres humanos, determinados polimorfismos do seu gene,

influenciando a sua expressão, contribuem para estados patológicos (12,13). A expressão de HO-1 e produção de CO aumentam na cardiomiopatia e na lesão de isquemia/reperfusão do miocárdio e, globalmente, exercem acções de protecção cardiovascular, embora não se possa excluir que poderão representar parte do processo patológico (1,12).

Hipertensão arterial

Os sistemas NOS/NO e HO/CO são interdependentes, têm funções cardiovasculares semelhantes e actuam através da mesma enzima, a GC, que promove diminuição dos níveis intracelulares de cálcio e o relaxamento das células musculares lisas. A disfunção desta via foi implicada como um dos mecanismos da hipertensão (14). A interdependência destes dois sistemas parece alterar-se nos diferentes estágios da hipertensão. Perante níveis reduzidos de NO, o CO estimula a GC, parecendo a expressão de HO-1 ocorrer mais precocemente que a de NOS e o CO desempenhar um papel na regulação da elevação aguda da tensão arterial. Pelo contrário, com níveis elevados de NO, o CO inibe a GC. Assim, CO e NO influenciam-se mútua e dinamicamente, podendo uma via antagonizar, compensar ou prevalecer sobre a outra na regulação da hipertensão (14,15).

Estudos recentes sugerem uma elevação concomitante da adiponectina em associação à HO-1, proteína com propriedades antiaterogénicas e acção sensibilizadora à insulina. A hipoadiponectinemia é um factor preditor do desenvolvimento da hipertensão. A demonstração que níveis elevados de HO-1 se associam a aumento da adiponectina sugere uma relação temporal HO-1/adiponectina (16).

Inflamação

Em concentrações fisiológicas, o CO inibe a produção de citocinas inflamatórias como o factor de necrose tumoral alfa (TNF α) e as interleucinas (IL) 1 e 2, estimula a síntese de IL-10, citocina anti-inflamatória e reduz a expressão de moléculas de adesão (selectinas, integrinas e superfamília das imunoglobulinas) (1,17). Tanto em ratos *knockout* como em crianças com deficiente expressão de HO-1 predomina um fenótipo pró-inflamatório (10). O papel anti-inflamatório do CO e suas propriedades vasodilatadores medeiam os efeitos protectores da HO na aterogénese (1).

Sistema respiratório

A HO-1 tem papel protector contra a inflamação e *stress* oxidativo pulmonares. A sua expressão encontra-se aumentada em várias patologias pulmonares, tendo sido documentados níveis aumentados

de CO exalado em indivíduos com asma, bronquiectasias e fibrose cística, entre muitas outras patologias pulmonares (18).

Transplante

A actividade da HO é indispensável na inibição da rejeição de transplante e o CO é o responsável pelo aumento da viabilidade de alo e xenotransplantes, através da prevenção da lesão de isquemia/reperfusão e dos efeitos citoprotectores sistémicos e no enxerto (1,19,20). O CO induz vasodilatação e diminui a adesão leucocitária, a activação e agregação plaquetárias, inibe citocinas pró-inflamatórias, interfere na actividade da ciclooxigenase (COX), lipooxigenase (LOX) e NOS, reduzindo os níveis de prostanglandinas, leucotrienos e NO, inibe a proliferação das células T e previne a fibrose (1,19,20,21).

Carcinogénese

O sistema HO/CO exerce diferentes efeitos sobre a proliferação celular. O seu papel na carcinogénese é controverso e dependente do tipo de célula (22). Os efeitos proliferativos e antiproliferativos da HO-1 são mediados pelo CO, os primeiros pela diminuição da p21 e os últimos pela activação da p38/MAPK (23).

Embora dependendo do tecido, a HO-1 normalmente está aumentada nas neoplasias em comparação com os tecidos não neoplásicos, actuando como enzima facilitadora da progressão tumoral por conferir protecção às células neoplásicas. Simultaneamente, protege os tecidos saudáveis da acção de carcinogénese, parecendo aumentar a resistência das células aos seus efeitos. O papel na transformação celular neoplásica permanece por definir (23).

POTENCIAIS APLICAÇÕES TERAPÊUTICAS DO CO

Identificado o impacto fisiopatológico do sistema HO/CO, emergem investigações para aplicação terapêutica e das diferentes formas sob as quais esta poderá ser veiculada.

Expressão da HO-1

Foi induzido o aumento da expressão do gene HO-1 através de vectores víricos (adenovírus, retrovírus) ou não víricos, em ratos. A injeção directa em miocárdio de ratos reduziu a área de enfarte e lesão de isquemia/reperfusão, podendo representar uma estratégia preventiva em doentes em risco de acidentes coronários isquémicos (1). Porém, a segurança dos vectores utilizados terá de ser garantida

em relação à patogenicidade e potencial imunogénico, evitando reacções imunes e inflamatórias no hospedeiro. Uma transferência de HO-1 através de promotores específicos de tecido poderá originar um efeito citoprotector mais específico (1).

A hemina (derivado do heme) aumenta a expressão de HO-1 e diminuiu a tensão arterial em animais hipertensos (1). O heme-L-lisinato e heme-L-arginato podem ser utilizados para aumentar a geração de CO. Como os indutores da HO-1 são pró-oxidantes, a via, duração de administração e dose devem ser cuidadosamente avaliadas (1). A manipulação genética é complexa e geralmente envolve métodos invasivos para localizar a expressão génica. Assim, o aumento da expressão de HO-1 como modalidade para disponibilizar CO tem utilidade limitada, sendo pouco provável a aplicação em seres humanos (1,24).

A expressão de HO-1 pode ser fonte de lesão celular, pela toxicidade do ferro e acumulação de bilirrubina e CO, o qual estimula a formação de radicais livres. A diminuição da sua expressão foi conseguida com estímulos como a hipóxia, interferão (INF) γ e desferroxamina (1). A actividade da HO pode ser inibida por bloqueadores específicos, como as metaloporfirinas que inibem, cronicamente, a actividade da HO, em ratos (1).

CO: métodos de administração

Inalação

A avaliação da produção endógena de CO é conseguida, de forma não invasiva, quantificando o CO no ar exalado, que poderá ser um marcador de progressão da doença, de resposta à terapêutica e indicador de prognóstico. A literatura aponta patologias hematológicas que cursam com hemólise como alvos desta avaliação, mas também a asma, na qual os níveis de CO exalados se correlacionam com a gravidade da inflamação subjacente, a rinite alérgica sazonal, a displasia broncopulmonar e a fibrose cística podem ser avaliadas (25). Existem níveis elevados de CO exalado em pacientes gravemente doentes, como adultos e recém-nascidos sépticos, e no lúmen intestinal durante a fase activa da colite ulcerosa (25). Sendo o CO e a bilirrubina produzidos em quantidades equimolares, o CO exalado poderá permitir monitorizar, indirectamente, a hiperbilirrubinemia dos recém-nascidos (26).

A inalação de CO tem sido proposta como terapêutica. A inalação de 1000 ppm de CO, por ratos, reduziu significativamente as áreas de enfarte após oclusão coronária, suprimiu a migração de macrófagos e a expressão miocárdica de TNF α , na ausência de efeitos laterais visíveis (1).

A maioria das investigações aponta para que a inalação de CO, em doses que não ultrapassem a capacidade de transporte de oxigênio (carboxi-hemoglobina (HbCO) < 20%), desencadeie proteção tecidual contra várias respostas de lesão orgânica (25). Na patologia pulmonar, o CO inalado reduz a inflamação na asma, protege contra a rejeição de transplante e a lesão pulmonar induzida por oxidantes (25). No coração, os efeitos da inalação do CO, comprovados em modelos animais, ainda são escassos em seres humanos. Contudo, a recuperação de pacientes transplantados com órgãos provenientes de vítimas de intoxicação por CO, propõe a futura utilidade deste gás em soluções de preservação de órgãos para transplante (25). O efeito potencialmente mais útil do CO é o anti-inflamatório, já que a inflamação acompanha várias patologias crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e cancro (25).

A ação do CO em seres humanos ainda precisa de ser mais bem estabelecida. Enquanto a inalação de 250 ppm teve efeitos anti-inflamatórios em ratos, a inalação de 500 ppm em seres humanos voluntários saudáveis não reduziu a resposta inflamatória induzida por endotoxemia experimental (27). Resch e colaboradores demonstraram que CO inalado por voluntários saudáveis induziu um aumento do fluxo sanguíneo coroideu e retiniano (28). Bathoorn e colaboradores levaram a cabo um estudo onde pacientes com doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) inalaram CO, tendo constatado que a inalação de doses baixas (100-125 ppm), em pacientes com DPOC estável, foi bem tolerada e segura nos níveis de HbCO atingidos, sem efeitos hemodinâmicos relevantes, reduzindo os eosinófilos no esputo e melhorando a resposta brônquica à metacolina (29). Estão em curso investigações para avaliar a inalação de CO na prevenção da rejeição de transplantes de órgãos sólidos. Resultados preliminares sugerem que o CO possa ter lugar como terapêutica em Unidades de Cuidados Intensivos, antes do fim da década (1,30).

Apesar dos possíveis efeitos terapêuticos, a toxicidade do CO não é ignorada e a questão central parece ser se existe um limiar de segurança e eficácia terapêutica tecidual que possam ser atingidos sem serem administradas doses potencialmente tóxicas. Apesar da inalação ser de fácil acesso, a

administração sistêmica e dificuldade de manipular e fornecer este gás às células de forma segura ainda coloca reservas à utilização desta via (24,25).

Pró-fármacos

O diclorometano (DCM) pode ser oxidado pelo citocromo P450 e gerar CO e dióxido de carbono (CO₂) *in vivo*. Estudos documentaram a eficácia deste agente na prevenção da agregação da hemoglobina S (Milosz and Settle, 1975, citado por 1), bem como no prolongamento da sobrevivência de aloenxerto hepático, diminuindo a apoptose e preservando a arquitetura e função hepáticas (1).

Moléculas libertadoras de CO (CORM, carbon monoxide-releasing molecules)

A conversão do CO num fármaco é materializada com o desenvolvimento das CORM. Baseados na capacidade do CO se associar a metais de transição em solventes orgânicos para formar complexos carbonil estáveis, Motterlini e colaboradores desenvolveram moléculas capazes de libertar CO em fluidos biológicos. Uma ampla variedade de transportadores de CO contendo manganês (CORM-1), ruténio (CORM-2 e 3), boro (CORM-A1) e ferro (CORM-F3) estão actualmente em estudo para aplicação terapêutica na prevenção da disfunção vascular, inflamação, isquemia tecidual e rejeição de órgãos transplantados (1,3,25,31).

As primeiras CORM, CORM-1 (Mn₂CO₁₀) e CORM-2 (dímero [Ru(CO)₃Cl₂]), lipossolúveis, usavam dimetilsulfóxido (DMSO) como solvente e veículo para experiências biológicas e revelaram efeitos vasodilatadores e hipotensores *in vivo* (1,25,31). A CORM-3 ([Ru(CO)₃Cl-glicinato]), hidrossolúvel e menos tóxica, liberta rapidamente CO em contacto com fluidos biológicos ou componentes celulares (25,31). A CORM-A1 [Na₂H₃BCO₂], com um grupo carboxílico em vez do metal de transição, é convertida em CO por hidrólise, libertando-o lentamente e conduzindo a uma vasodilatação gradual e diminuição da pressão arterial. A CORM-F3 [C₉H₅BrFeO₅] liberta o CO lentamente e é solúvel em solventes orgânicos (3,25,31) (Tabela 1).

As CORM demonstraram múltiplos efeitos biológicos em modelos patológicos experimentais (Tabela 2). Chatterjee apontou propriedades quimioprotectoras das CORM, que influenciam a carcinogénese no cólon induzida pela inflamação, através da modulação de factores nucleares que participam na transcrição de genes implicados no desenvolvimento da inflamação e cancro intestinais (32).

Resultados semelhantes foram obtidos num estudo que avaliou a capacidade da CORM-2 controlar a

resposta inflamatória induzida por citocinas numa linha de células epiteliais intestinais humanas (Caco-2). Os autores confirmaram que a CORM-2 regula um conjunto de genes relevantes na inflamação intestinal e na progressão do cancro (33). Estudos recentes documentaram que a CORM-2 reduz a expressão de várias metaloproteínas de matriz. Estas enzimas estão implicadas na lesão de isquemia/reperfusão, inflamação, doença cardiovascular e cancro (33). A redução da expressão das metaloproteínas pela CORM-2 na osteoartrose degenerativa, em seres humanos, foi comprovada por Megías e colaboradores, que lhe propuseram propriedades protectoras da cartilagem (34).

As CORM mais recentemente sintetizadas são moléculas totalmente hidrossolúveis, capazes de libertar CO quando dissolvidas em soluções biológicas (CORM-3 e CORM-A1). Perante estas propriedades, constituem as moléculas de maior interesse terapêutico, particularmente na modulação da inflamação e da perfusão coronária, porque libertam o CO de forma controlada (35).

A CORM-A1, através da libertação lenta de CO, não afectando a contractilidade cardíaca, origina uma significativa vasodilatação coronária. Para ambos os efeitos estão envolvidas a via do cGMP e trocas iónicas de sódio e hidrogénio (36). A CORM-3 representa um excelente protótipo de um transportador hidrossolúvel de CO, que pode ser utilizado para o estudo das suas características farmacológicas (37).

Musameh e colaboradores avaliaram os efeitos das CORM hidrossolúveis na perfusão coronária de corações isolados de ratos. Constataram que a CORM-3 exerce uma acção inotrópica positiva directa (36). Foresti e colaboradores confirmaram que a CORM-3 induz relaxamento dependente da concentração em vasos previamente contraídos com fenilefrina, efeitos directamente mediados pela activação de canais de potássio e geração de cGMP intracelular, pelo CO. A molécula CORM-3 inactiva, que não liberta CO, não afectou o tónus vascular (37).

O papel da CORM-3 na inflamação também tem sido alvo de estudos de investigação recentes.

Para o desencadear da inflamação é essencial a interacção entre as células endoteliais e os leucócitos, através da expressão de moléculas de adesão e quimiocinas que, quando expressas, possibilitam a migração leucocitária. Daí que a investigação de mecanismos que reduzam a expressão das moléculas de adesão seja uma área fundamental no combate à inflamação (35).

A CORM-3 demonstrou actividade moduladora da inflamação numa variedade de modelos *in vivo* e *in vitro* (35). Song e colaboradores avaliaram a capacidade da CORM-3 inibir a expressão de moléculas

de adesão em células endoteliais da veia do cordão umbilical humano. Os resultados foram animadores: a CORM-3 inibiu a indução mediada por TNF α e IL-1 β , da molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e E-selectina, em todas as linhas celulares testadas, mesmo na presença contínua de TNF α (Figura 3). Esse efeito foi exclusivamente devido à molécula de CO, já que uma solução de CORM-3 desprovida de CO foi ineficaz. Foi excluída a participação do NO através da utilização de um dador de NO, o qual não influenciou a expressão das moléculas de adesão; a inibição da GC excluiu a participação da via do cGMP (35). A CORM-3 demonstrou induzir a expressão da HO-1, pelo que poderia ser a enzima, em vez do CO, a responsável pela redução da expressão das moléculas de adesão. Contudo, ficou demonstrado que a CORM-3 reduz a expressão de VCAM-1 independentemente da expressão da HO-1 (35). Neste estudo utilizaram-se concentrações suprafisiológicas de CO (superiores a 0,5 mmol/L) e documentou-se eficácia da CORM-3 na redução da expressão das moléculas de adesão, aspecto que não foi conseguido em estudos prévios que utilizaram doses inferiores (Urquhart et al 2007, Soares et al 2004, citados por 35). Este aspecto sugere que, em condições fisiológicas, o CO gerado pode não ser suficiente para inibir a expressão das moléculas de adesão (35).

Bani-Hani e colaboradores demonstraram que a CORM-3 reduz, de forma significativa, a resposta inflamatória das células da microglia a lipopolissacarídeos e IFN- γ , na ausência de citotoxicidade. Estes resultados abrem perspectivas para futuros estudos das propriedades anti-inflamatórias da CORM-3 e sua possível aplicação em doenças neuronais inflamatórias (38).

As CORM apresentam vantagens relativamente à inalação de CO, já que a libertação de CO e a concentração tecidual podem ser controladas. Estes transportadores permitem um *bypass* ao pulmão, evitando a redução do suprimento de oxigénio aos tecidos. Porém, a libertação de CO por estes compostos ainda é feita indiscriminadamente, com risco de gerar altos níveis de CO sistémico. Futuras investigações poderão desenvolver CORM com alvos específicos ou associá-las ao revestimento de *stents*, ultrapassando as limitações actuais. Estes estudos apontam importância das CORM, não só na investigação biomédica, como em futuras aplicações clínicas, em diferentes patologias (24, 25).

CONCLUSÃO

Ao longo da última década, têm sido desenvolvidos vários estudos que contribuem para realçar um papel do CO para além das suas propriedades tóxicas e potencialmente fatais. O reconhecimento do papel central do sistema HO/CO na fisiologia humana e a identificação da sua participação na etiologia de patologias tão prevalentes como as doenças cardiovasculares, inflamação e até a carcinogénese e o transplante de órgãos, veio acrescentar interesse na possível modulação desta via como potencial arma terapêutica. Os resultados iniciais em modelos animais têm sido encorajadores, em particular documentando melhoria de lesões de isquemia/reperfusão, da perfusão coronária, da inflamação e na prevenção da fibrose e hipertensão pulmonares, após inalação de CO. Estudos de aplicação de CO em tecidos humanos ou a sua inalação por seres humanos voluntários saudáveis também já foram desenvolvidos, com resultados promissores. Novas formas de utilização do CO têm sido desenvolvidas, induzindo ou reprimindo a expressão da enzima HO ou através da administração de CO com pró-fármacos ou moléculas libertadoras, que poderiam ultrapassar os riscos da sua inalação.

Apesar destas tentativas, a comprovada toxicidade e letalidade do CO não é negligenciada pelos investigadores, que reconhecem este aspecto como o maior limitador da aplicabilidade clínica do gás. Por outro lado, se alguns dos efeitos benéficos que resultam da maior expressão da HO são mediados pelo CO, não se pode negar a importância dos outros metabolitos gerados pela acção desta enzima, nomeadamente a biliverdina e bilirrubina. A acção do sistema HO deve ser integrada num conjunto mais amplo de reacções e mediadores fisiológicos em vez de limitada à acção do CO, o que talvez permita explicar que nem sempre os resultados obtidos em tecidos ou órgãos sejam sobreponíveis no organismo humano. Este novo ponto de vista que os recentes estudos lançaram sobre o CO vem abrir novas perspectivas sobre o seu papel na patologia humana e potencial aplicação farmacológica. Confirma-o como citoprotector e anti-inflamatório endógeno caracterizando-o, à semelhança do NO, como neurotransmissor, vasodilatador e, contrariamente a ele, antioxidante. Apresenta-o como possível marcador de inflamação das vias aéreas, com utilidade na monitorização da actividade de doenças como asma e resposta à terapêutica. Coloca-o numa posição privilegiada como potencial agente terapêutico no âmbito da patologia cardiovascular (hipertensão arterial, enfarte de miocárdio),

na prevenção da rejeição de órgãos transplantados, na inflamação e no tratamento do cancro, representando uma área de recente e intensa actividade de investigação.

Estes trabalhos representam o empenho dos investigadores na identificação de acções terapêuticas a partir de uma molécula antiga e tóxica, recriando conceitos e permitindo que o CO possa ser um fármaco usado na prática clínica, na forma das recentes CORM.

REFERÊNCIAS

- (1) Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev* 2005; 57:585-630.
- (2) Otterbein LE. The evolution of carbon monoxide into medicine. *Respir Care* 2009; 54:925-932.
- (3) Motterlini R, Mann BE, Foresti R. Therapeutic applications of carbon-monoxide-releasing molecules. *Expert Opin Investig Drugs* 2005; 14:1305-1318.
- (4) Ryter SW, Alam J, Choi AMK. Heme oxygenase-1/carbon monoxide: from basic science to therapeutic applications. *Physiol Rev* 2006; 86:583-650.
- (5) Aziz MTA, Mostafa T, Atta H, et al. Putative role of carbon monoxide signaling pathway in penile erectile function. *J Sex Med* 2009; 6:49-60.
- (6) Bainbridge SA, Smith GN. HO in pregnancy. *Free Radic Biol Med* 2005; 38:979-988.
- (7) Gibbons SJ, Farrugia G. The role of carbon monoxide in the gastrointestinal tract. *J Physiol* 2004; 556.2:325-336.
- (8) Volti GL, Sacerdoti D, Giacomo CD, et al. Natural heme-oxygenase-1 inducers in hepatobiliary function. *World J Gastroenterol* 2008; 14:6122-6132.
- (9) Doré S. Decreased activity of the antioxidant heme oxygenase enzyme: implications in ischemia and in Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med* 2002; 32:1276-1282.
- (10) Deshane J, Wright M, Agarwal A. Heme oxygenase-1 expression in disease states. *Acta Biochim Pol* 2005; 52:273-284.
- (11) Syapin PJ. Regulation of haeme oxygenase-1 for treatment of neuroinflammation and brain disorders. *Br J Pharmacol* 2008; 155:623-640.
- (12) Idriss NK, Blann AD, Lip GYH. Hemoxygenase-1 in cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 2008; 52:971-978.
- (13) Dulak J, Deshane J, Jozkowicz A, et al. Heme-oxygenase-1 and carbon monoxide in vascular pathobiology: focus on angiogenesis. *Circulation* 2008; 117:231-241.
- (14) Lee CY, Yen MH. Nitric oxide and carbon monoxide, collaborative and competitive regulators of hypertension. *Chang Gung Med J* 2009; 32:12-21.

- (15) Morita T. Heme oxygenase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005; 25:1786-1795.
- (16) Cao J, Inoue K, Li X, et al. Physiological significance of heme oxygenase in hypertension. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 41:1025-1033.
- (17) Brusko TM, Wasserfall CH, Agarwal A, et al. An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2005; 174:5181-5186.
- (18) Fredenburgh LE, Perrella MA, Mitsialis SA. The role of heme oxygenase-1 in pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36:158-165.
- (19) Nakao A, Choi AMK, Murase N. Protective effect of carbon monoxide in transplantation. *J Cell Mol Med* 2006; 10.
- (20) Katori M, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Heme oxygenase-1 system in organ transplantation. *Transplantation* 2002; 74:905-912.
- (21) Soares MP, Brouard S, Smith RN, et al. Heme oxygenase-1, a protective gene that prevents the rejection of transplanted organs. *Immunol Rev* 2001; 184:275-285.
- (22) Wegiel B, Chin BY, Otterbein LE. Inhale to survive, cycle or die? Carbon monoxide and cellular proliferation. *Cell Cycle* 2008; 7:10:1379-1384.
- (23) Jozkowicz A, Was H, Dulak J. Heme-oxygenase-1 in tumors: is it a false friend? *Antioxid Redox Signal* 2007; 9:2099-2118.
- (24) Tzeng E. Carbon Monoxide: Vascular Therapeutic for the Future. *Vascular* 2009; 17 Suppl 1:55-62.
- (25) Foresti R, Bani-Hani MG, Motterlini R. Use of carbon monoxide as a therapeutic agent: promises and challenges. *Intensive Care Med* 2008; 34:649-658.
- (26) Morse D, Choi AMK. Heme-oxygenase-1: from bench to bedside. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:660-670.
- (27) Mayr FB, Spiel A, Leitner J, et al. Effects of carbon monoxide inhalation during experimental endotoxemia in humans. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 171:354-360.

- (28) Resch H, Zawinka C, Weigert G, et al. Inhaled carbon monoxide increases retinal and choroidal blood flow in healthy humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005; 46:4275-4280.
- (29) Bathoorn E, Slebos DJ, Postma DS, et al. Anti-inflammatory effects of inhaled carbon monoxide in patients with COPD: a pilot study. *Eur Respir J* 2007; 30:1131-1137.
- (30) Robinson BRH, Athota KP, Branson RD. Inhalation therapies for the ICU. *Curr Opin Crit Care* 2009; 15:1-9.
- (31) Motterlini R. Carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs): vasodilatory, anti-ischaemic and anti-inflammatory activities. *Biochem Soc Trans* 2007; 35.
- (32) Chatterjee PK. Physiological activities of carbon monoxide-releasing molecules: Ça ira. *Br J Pharmacol* 2007; 150:961-962.
- (33) Megías J, Busserolles J, Alcaraz MJ. The carbon monoxide-releasing molecule CORM-2 inhibits the inflammatory response induced by cytokines in Caco-2 cells. *Br J Pharmacol* 2007; 150:977-986.
- (34) Megías J, Guillén MI, Bru A, et al. The carbon monoxide-releasing molecule tricarbonyldichlororuthenium (II) dimer protects human osteoarthritic chondrocytes and cartilage from the catabolic actions of interleukin-1 β . *J Pharmacol Exp Ther* 2008; 325: 56-61.
- (35) Song H, Bergstrasser C, Rafat N, et al. The carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) inhibits expression of vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin independently of haem oxygenase-1 expression. *Br J Pharmacol* 2009; 157:769-780.
- (36) Musameh MD, Fuller BJ, Mann BE et al. Positive inotropic effects of carbon monoxide-releasing molecules (CO-RMs) in the isolated perfused rat heart. *Br J Pharmacol* 2006; 149:1104-1112.
- (37) Foresti R, Hammad J, Clark JE, et al. Vasoactive properties of CORM-3, a novel water-soluble carbon monoxide-releasing molecule. *Br J Pharmacol* 2004; 142:453-460.
- (38) Bani-Hani MG, Greenstein D, Mann BE, et al. A carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3) attenuates lipopolysaccharide- and interferon- γ -induced inflammation in microglia. *Pharmacol Rep* 2006; 58:132-144.

Tabela 1 Propriedades farmacocinéticas das diferentes *CORM

Composto	Libertação de †CO		Solubilidade
	‡t _{1/2}	Mecanismo	
CORM-1	Rápida (<1min)	Dependente da luz	Etanol e §DMSO
CORM-2	Rápida (≈ 1min)	Induzida por substituição de ligando	Etanol e DMSO
CORM-3	Rápida (≈ 1min, a pH = 7,4, 37°C)	Induzida por substituição de ligando	Hidrossolúvel
CORM-A1	Lenta (≈ 21min, a pH = 7,4, 37°C)	Estritamente dependente do pH	Hidrossolúvel
CORM-F3	Lenta (≈ 55min)	Induzida por oxidação	Etanol e DMSO

*CORM: moléculas libertadoras de monóxido de carbono. †CO: monóxido de carbono. ‡t_{1/2}: tempo de semi-vida. §DMSO: dimetilsulfóxido. (3,25)

Tabela 2 Acções farmacológicas das diferentes *CORM

CORM-1	CORM-2	CORM-3	CORM-A1
Vasodilatador	Vasodilatador	Vasodilatador	Vasodilatador
Protector renal	Protector renal	Protector renal e	Protector renal
	Anti-inflamatório	cardíaco	Anti-isquémico
	Anticarcinogénico	Anti-inflamatório	Antiapoptótico
	Angiogénico	Anti-isquémico	
	Antiapoptótico	Inibidor da agregação	
	Inibidor da proliferação	plaquetária	
	celular		

*CORM: moléculas libertadoras de monóxido de carbono. (25)

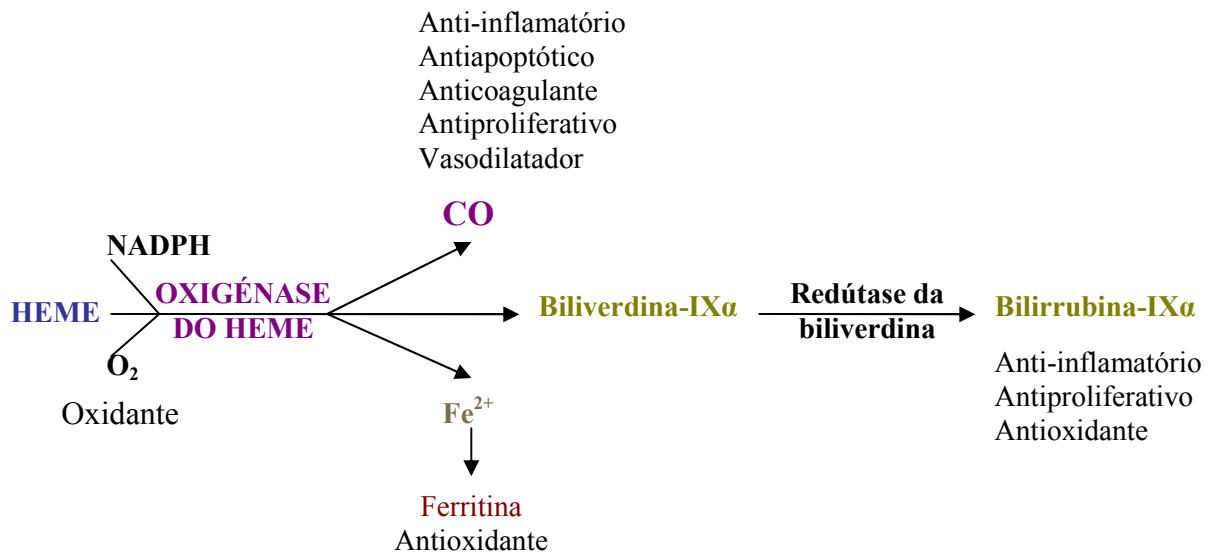


Figura 1. Sistema da oxigenase do heme (HO). Esta enzima converte o heme em três produtos: monóxido de carbono (CO), ferro (Fe²⁺) e biliverdina, subseqüentemente convertida em bilirrubina pela redutase da biliverdina. Estes produtos, em particular o CO, medeiam as propriedades anti-inflamatórias, antiapoptóticas, anticoagulantes, antiproliferativas e vasodilatadoras da HO (18).

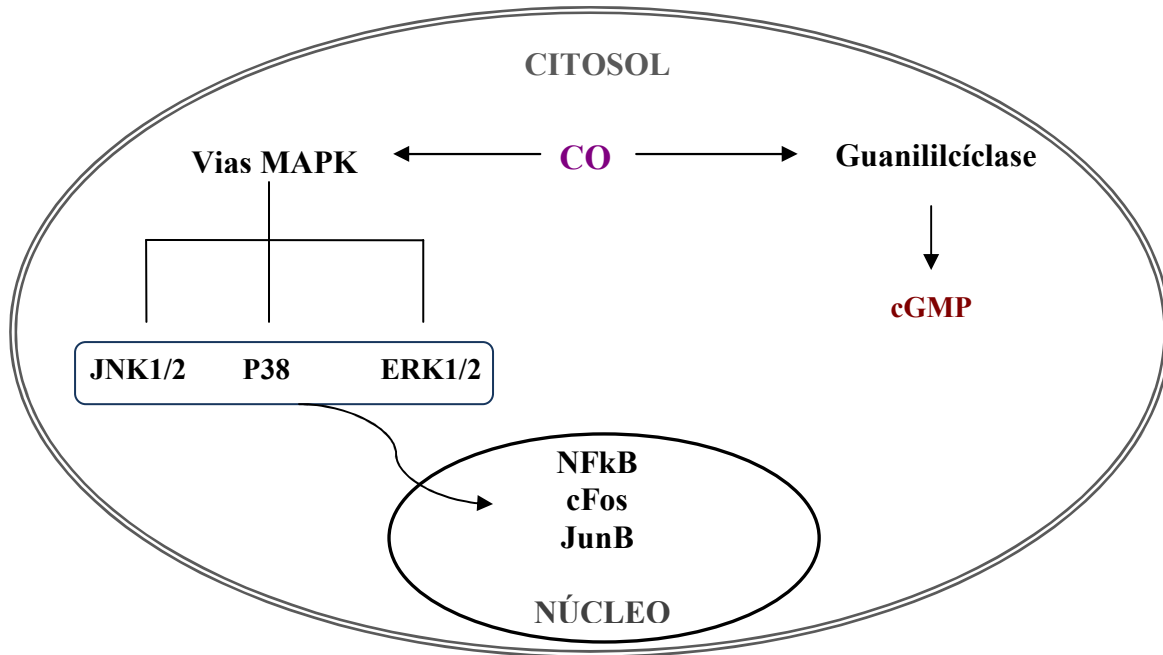


Figura 2. Monóxido de carbono (CO) e respectivas vias de sinalização intracelulares (4,26). O CO activa a guanililciclase, gerando cGMP intracelular. O CO também modula a actividade da MAPK, incluindo as vias da JNK, p38, e ERK.

CO: monóxido de carbono. MAPK: cínase de proteínas activada por mitogéneo. JNK: cínase N-terminal c-jun. ERK: cínase regulada por sinal extracelular. NF-kB: factor nuclear-kB. cGMP: monofosfato cíclico de guanosina.

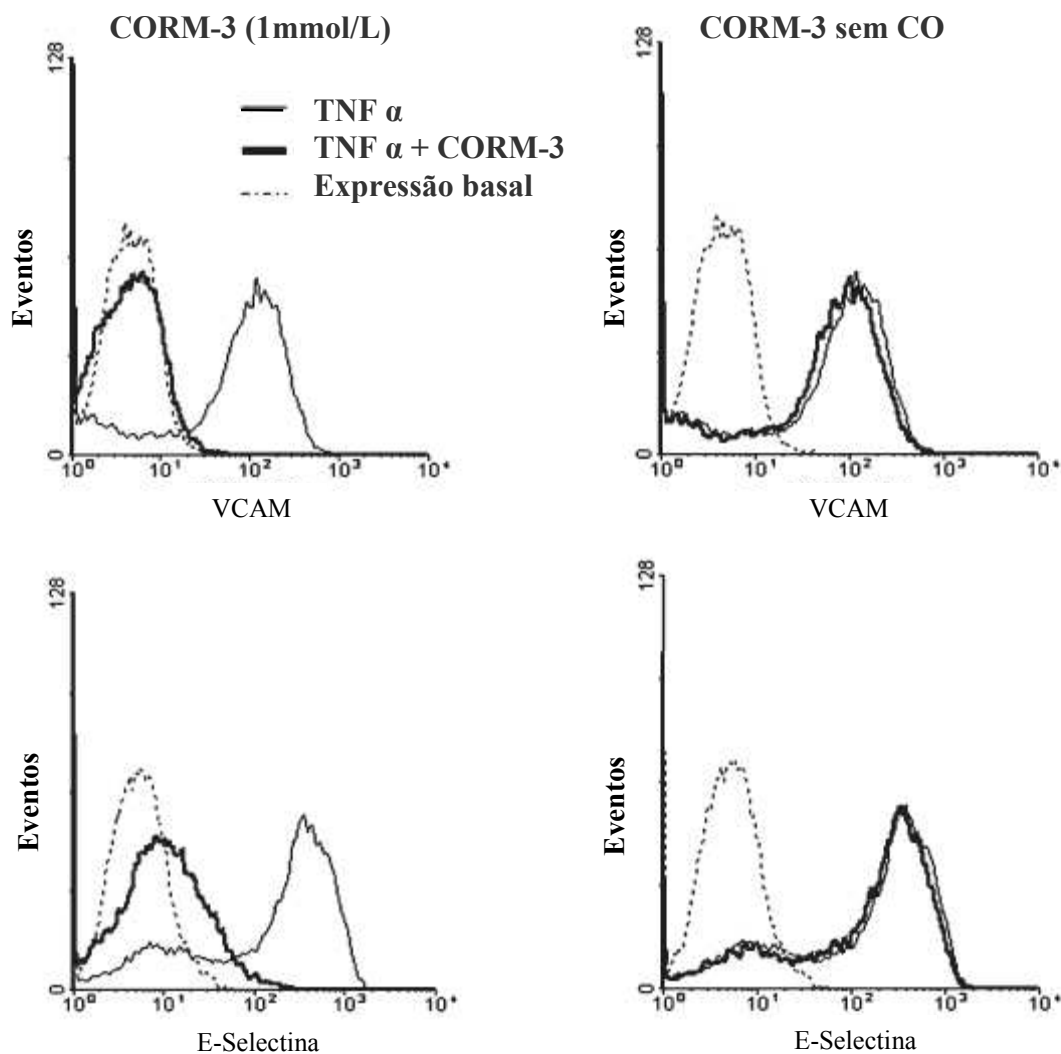


Figura 3. Efeitos da molécula libertadora de monóxido de carbono-3 (CORM-3) na modulação da expressão de moléculas de adesão induzida pelo factor de necrose tumoral alfa (TNF α).

A expressão da molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) e da E-selectina foi inibida nas células expostas à CORM-3 (painel da esquerda). A adição de uma solução de CORM-3 sem monóxido de carbono, na mesma concentração, não afectou a expressão das duas moléculas de adesão (painel da direita).

Adaptado de referência 35, com autorização do autor.