

INIBIDORES SELETIVOS DE PROSTAGLANDINA ENDOPERÓXIDO SINTASE-2 (PGHS-2): NOVA ESTRATÉGIA PARA O TRATAMENTO DA INFLAMAÇÃO[#]

Adriana dos Santos Lages e Nelilma Correia Romeiro

Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro - Cidade Universitária - Ilha do Fundão - Rio de Janeiro - RJ

Carlos Alberto Manssour Fraga e Eliezer Jesus Barreiro*

Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio de Janeiro - CP 68006 - 21944-910 - Rio de Janeiro - RJ

Recebido em 14/11/97; aceito em 13/3/98

SELECTIVE INHIBITORS OF PROSTAGLANDIN ENDOPEROXIDE SYNTHASE-2 (PGHS-2): NEW TARGET TO THE TREATMENT FOR INFLAMMATORY DISEASES. Prostaglandins (PG's), produced from arachidonic acid metabolism, are potent mediators of inflammation. Nonsteroidal anti-inflammatory (NSAIDs) exert their effects by inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase (PGHS) enzyme, which catalyses the first committed step in arachidonic acid metabolism. Two isoforms of PGHS are known: PGHS-1, constitutively expressed in most tissues, and is responsible for physiological production of PG's. The second isoform, PGHS-2, is induced by cytokines, mitogens and endotoxins in inflammatory cells, and appears to be responsible for the elevated production of PG's during inflammation. With the recent discovery of the inducible PGHS (PGHS-2), the medicinal chemist now possesses a novel target for designing therapeutic agents that could provide suitable anti-inflammatory activity without the ulcerogenic and renal side effects associated with currently available NSAIDs, all of which inhibit both PGHS-1 and PGHS-2.

Keywords: selective PGHS-2 inhibitors; nonsteroidal anti-inflammatory drugs; inflammation.

INTRODUÇÃO

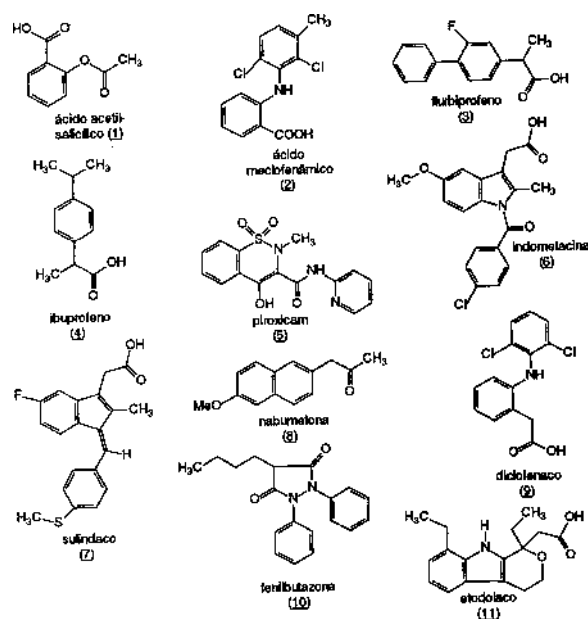
O tratamento das doenças inflamatórias ganhou recentemente um novo alento pela descoberta de uma segunda isoforma da prostaglandina-endoperoxido sintase (PGHS), PGHS-2, descrita em 1992 por Holtzman e colaboradores¹. Os resultados subsequentes dos estudos sobre sua função fisiológica indicaram que esta enzima, responsável pela bioformação de prostaglandinas (PG's) a partir do ácido araquidônico (AA)², é a forma induzida por estímulos inflamatórios em células que promovem a inflamação tais como fibroblastos, macrófagos, monócitos e células sinoviais³.

A principal limitação dos fármacos antiinflamatórios não esteróides (NSAI's) clássicos reside na incidência de efeitos gastro-irritantes⁴ e, menos frequentemente, nefro-tóxicos⁵, resultantes do mecanismo de ação desta classe de agentes terapêuticos que atuam inibindo a biossíntese de PG's ao nível da enzima PGHS⁶. O reconhecimento das diferenças morfo-fisiológicas entre as duas isoformas de PGHS, sendo a forma constitutiva (PGHS-1) relacionada aos efeitos secundários dos NSAI-clássicos e a segunda isoforma, mais recentemente descoberta (PGHS-2), a induzida, permitiu prever-se a possibilidade de se desenvolverem inibidores seletivos desta última, como estratégia para se obter efeito antiinflamatório desprovido de efeitos colaterais indesejáveis⁷.

A indução da PGHS-2 por agentes pró-inflamatórios conhecidos (e.g. interleucina-1⁸⁻¹⁰; lipopolissacarídio¹¹⁻¹³; fator de necrose tumoral- α ^{8,10,14}; éteres de forbol^{14,15,16}; fator de transformação de crescimento β ¹⁸; soro^{8,17}; endotelina-1¹⁸; fator de ativação plaquetária¹⁹) explica a elevada concentração desta isoforma nos tecidos inflamados e, conseqüentemente, a maior concentração de PG's nos sítios inflamatórios. Por outro lado, a PGHS-1 é a isoforma da PGHS que, sob condições fisiológicas,

produz PG's necessárias à modulação das funções gastrintestinais, renais e a homeostase vascular²⁰.

Os NSAI's clássicos disponíveis no mercado (Quadro 1)²¹ reduzem a biossíntese de PG's fisiológicas e fisiopatológicas através da inibição indiscriminada da PGHS-1 e PGHS-2²². É possível que a inibição da PGHS-2 seja responsável pelo efeito antiinflamatório apresentado pelos NSAI's e que a inibição da PGHS-1 seja responsável pelos efeitos secundários indesejados destes agentes²³. Entretanto, esta divisão simplista não contempla todos os dados experimentais disponíveis para os agentes NSAI. O ácido 6-metoxi-naftilacético (6-MNA), metabólito



Quadro 1. NSAI'S-clássicos²¹.

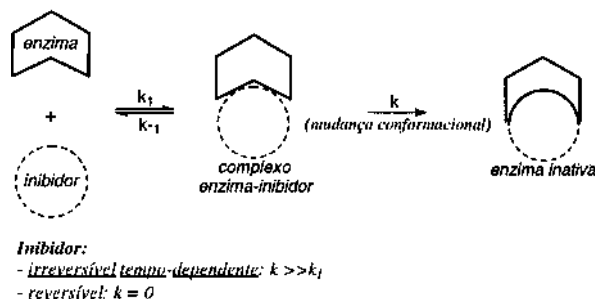
[#]Este trabalho representa a contribuição número 27 do LASSBio.

*e-mail: eliezer@pharma.ufrj.br

ativo da nabumetona (8), possui baixos efeitos gastro-irritantes sem ser um agente seletivo para PGHS-2²⁰, com valores de IC₅₀ de 64 mM e 93 mM para PGHS-1 e PGHS-2, respectivamente²⁴. Recentemente, Frolich²⁵ propôs uma nova classificação para os agentes NSAI, baseando-se na ação seletiva entre PGHS-1 e PGHS-2. Esta classificação, ainda polêmica, não considerou todos os agentes NSAI's, mas representa importante contribuição no sentido de classificar estes agentes em função da seletividade que apresentam frente a cada uma das isoformas de PGHS. Entretanto, considerando-se que a eficiência da inibição seletiva observada frente PGHS-2 varia de acordo com o modelo farmacológico estudado, esta classificação continua provisória.

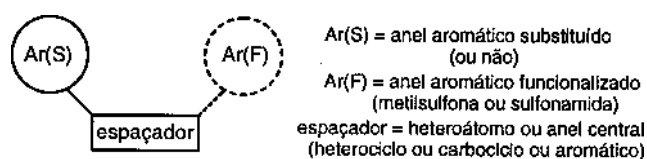
INIBIDORES SELETIVOS DE PGHS-2

O planejamento de inibidores seletivos de PGHS-2²⁶ passou a representar para o químico medicinal nova e atraente estratégia terapêutica, mais efetiva e segura, de combate aos quadros inflamatórios, especialmente crônicos, como artrite reumatóide²⁷. Sabe-se que o efeito inibitório mais potente dos NSAI's sobre a PGHS é obtido através de inibição irreversível tempo-dependente, a qual, provavelmente, envolve a formação de ligação inicial rápida e reversível do inibidor à enzima, seguida por mudança conformacional mais lenta e essencialmente irreversível do complexo enzima-inibidor (Esquema 1)²⁸. O mecanismo de inibição dos inibidores seletivos de PGHS-2, descritos na literatura²⁹, tem sido relatado como sendo irreversível e tempo-dependente, enquanto sua ação sob a PGHS-1 se caracteriza pela reversibilidade²⁹. Este componente tempo-dependente é, aparentemente, a base para a seletividade desta nova geração de NSAI's^{23,29}.



Esquema 1. (Adaptado de Copeland e colaboradores³⁴)

A maioria dos NSAI's-clássicos possui uma função ácido carboxílico, que interage ionicamente com o grupo guanidina do resíduo Arg¹²⁰ de ambas isoformas de PGHS humana (hPGHS)^{3,29,30}. Entretanto, nos inibidores seletivos de PGHS-2, este importante grupo farmacofórico dos NSAI clássicos, com uma única exceção que será citada posteriormente, está substituído por uma função metilsulfona ou sulfonamida. Outra característica estrutural importante nos compostos seletivos é a presença de dois anéis aromáticos, substituídos ou não, intercalados por um heteroátomo (*e.g.* O, S, NH) ou por um anel central (heterocíclico, carbocíclico ou aromático) (Esquema 2).



Esquema 2

Gans e colaboradores, em 1990³¹, antes da confirmação da hipótese da existência da isoforma induzida da PGHS, descreveram o composto DuP 697 (12) (Tabela 1), o qual apresentou potência antiinflamatória comparável ao piroxicam (5) e à indometacina (6), porém sem os efeitos secundários comuns ao emprego terapêutico de NSAI's clássicos. Este composto (12), mesmo na dose de 400 mg/kg, não induziu lesão gástrica em animais de laboratório quando administrado por via oral (*p.o.*)³¹.

Procurando compreender, posteriormente, as características estruturais de (12) que controlam sua seletividade, realizou-se estudo de SAR ("structure-activity relationship") com diversos análogos (Tabela 1). O isômero de posição entre os grupos SO₂Me e F de (12) foi ligeiramente menos ativo (12 vs 13a; Tabela 1). O análogo desbromado (13b), apesar de menos potente do que (12) para PGHS-2, foi mais seletivo por ter sido inativo para PGHS-1. O grupo metilsulfona em (12 e 13b) mostrou-se crítico para a atividade e seletividade nesta série³². Os derivados metil-sulfeto (13h) e metil-sulfóxido (13i) foram inativos contra PGHS-2³². Por outro lado, o homólogo etilsulfônico (13d) perdeu substancialmente a atividade³². Contudo, a sulfonamida (13e) foi mais potente do que seu análogo metilsulfona (13b), mas menos seletiva para PGHS-2. O derivado (13g) isômero apresentando o grupo SeO₂Me no lugar da metilsulfona, mostrou-se equipotente, porém também menos seletivo do que (13b)³². A substituição do grupo metilsulfona por outros grupamentos -CONH₂, -COMe, -CO₂H, -CO₂Me e -CH₂OH, forneceu compostos (13j a 13o) que foram inativos para PGHS-2. Entre estes, (13j, 13l, 13n e 13o) foram de 2-86 vezes mais seletivos para PGHS-1³².

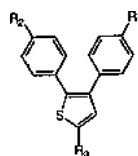
Outro composto que possui propriedades antiinflamatórias, analgésicas e antipiréticas tão potentes quanto as apresentadas pelos NSAI's é o derivado NS-398 (14)³³. Com uma simples administração de 1000 mg/kg ou administração oral durante três meses, as lesões renais e gastrintestinais observadas foram muito baixas³³. Copeland e colaboradores³⁴ observaram posteriormente que este derivado apresenta velocidade de inativação de PGHS-2 ligeiramente maior do que a do DuP 697 (12), a qual é compensada pelo fato de este último possuir afinidade para PGHS-2 ligeiramente maior³⁴. O NS-398 (14), entretanto, apresenta baixa biodisponibilidade oral e toxicidade devido à presença do grupamento nitro³⁵ que, *in vivo*, fornece metabólitos hepatotóxicos.

O derivado SC-58125 (15) apresentou efetiva atividade antiinflamatória em vários modelos de inflamação crônica, tais como edema de pata de rato induzido por carregemina e artrite adjuvante³⁶. Mesmo em doses superiores àquela antiinflamatória, este composto não inibiu a biossíntese de PGE₂ no estômago, nem causou ulceração gástrica³⁷. Em condições experimentais similares, o AAS (1) causa 55% de incidência de úlcera estomacal³⁷. A ED₅₀ de (15) para toxicidade gastrintestinal é superior a 600 mg/kg, enquanto que a ED₅₀ da indometacina (6) é muito menor (8 mg/kg), mostrando o baixo perfil tóxico de (15) quando comparado a agentes NSAI's amplamente utilizados na terapêutica clássica³⁶.

Vários trabalhos foram realizados a fim de se verificar o tipo de inibição que os compostos Dup 697 (12), NS-398 (14) e SC-58125 (15) exercem sobre ambas as isoformas de PGHS^{23,28,34,38,39}. Tais estudos permitiram identificar que estes derivados são inibidores irreversíveis tempo-dependente para a isoforma 2, enquanto que reversíveis para a isoforma 1, atuando de forma competitiva, ou seja, ligando-se ao sítio ativo da enzima^{23,28,34,38,39}.

Gierse e colaboradores²³ observaram que a mutação do resíduo Val₅₀₉ encontrado no sítio ativo da hPGHS-2 (correspondente ao resíduo Ile₅₂₃ da hPGHS-1, vide infra) por um resíduo Ile nesta posição, fazia com que estes inibidores apresentassem um IC₅₀ para a forma PGHS-2 mutante similar àquele observado

Tabela 1. DuP 697 (12) e seus análogos (13a a 13o)³².



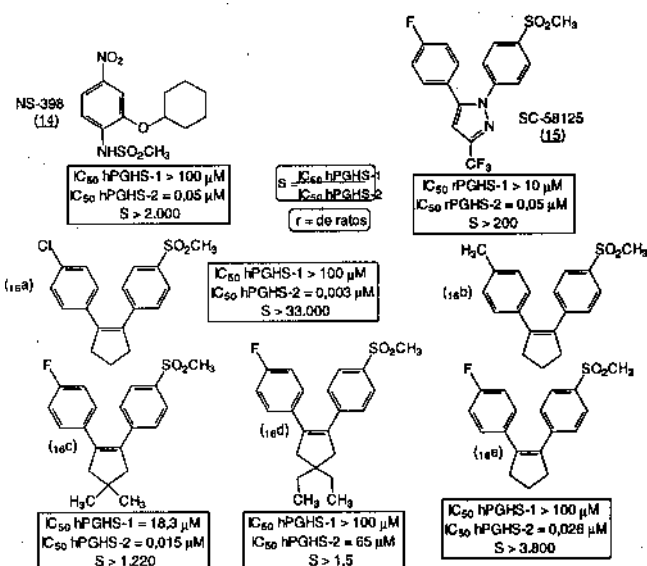
Composto	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a		
				hPGHS-1	hPGHS-2	S ^b
DuP 697 (12)	SO ₂ Me	F	Br	0,60	0,005	120
13a	F	SO ₂ Me	Br	1,1	0,02	55
13b	SO ₂ Me	F	H	>100	0,25	>400
13c	F	SO ₂ Me	H	>50	4,3	>12
13d	SO ₂ Et	F	H	>50	>30	-
13e	SO ₂ NH ₂	F	H	1,3	0,03	43
13f	SO ₂ NHMe	F	H	>50	7,2	>6,9
13g	SeO ₂ Me	F	H	32	0,55	58
13h	SMe	F	H	0,34	>30	<0,01
13i	SOMe	F	H	15	>30	<0,50
13j	CONH ₂	F	H	3,2	>30	<0,11
13l	COMe	F	H	0,75	>30	<0,02
13m	CO ₂ H	F	H	>50	>30	-
13n	CO ₂ Me	F	H	17	>30	<0,57
13o	CH ₂ OH	F	H	0,35	>30	<0,01

^aIC₅₀ = concentração do fármaco que causa 50% de inibição enzimática; ^bS (índice de seletividade) = IC₅₀ (PGHS-1) / IC₅₀ (PGHS-2).

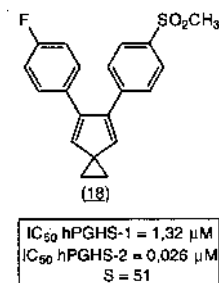
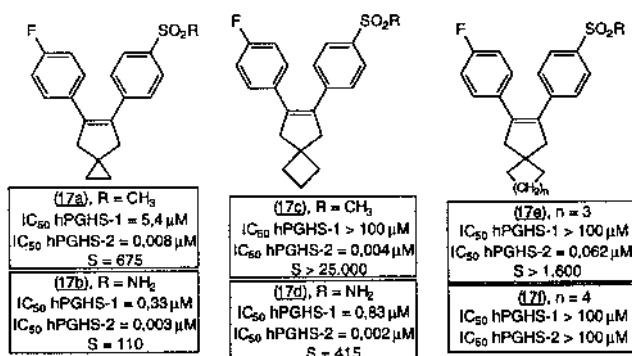
com a hPGHS-1²³. Estes dados sugerem que o mecanismo da seletividade observada com estes derivados está intimamente associado com a presença de um grupo metileno adicional, ou seja, as enzimas que apresentam este grupamento (hPGHS-2 mutante Ile₅₀₉ e hPGHS-1 Ile₅₂₃ x hPGHS-2 Val₅₀₉) não possuem a etapa de inibição tempo-dependente²³.

Reitz e colaboradores⁷, utilizando como substâncias-protótipo os compostos DuP 697 (12) e SC-58125 (15), planejaram novos derivados híbridos que, após sintetizados, foram avaliados segundo sua atividade inibitória das enzimas PGHS-1 e PGHS-2 humanas (hPGHS). Dentre estes, os compostos (16a) e (16b) apresentaram o maior índice de seletividade⁷. Este estudo permitiu identificar que a contribuição dos anéis heterocíclicos presentes nos compostos DuP 697 (12) e SC-58125 (15) correspondia apenas à manutenção da geometria *cis* entre os anéis aromáticos substituídos, critério estrutural aparentemente necessário à seletividade. Por outro lado, os anéis heterocíclicos centrais, por si só, não pareciam ter importância significativa para inibição seletiva da PGHS-2, podendo ser substituídos pelo anel ciclopentênico. Além disso, substituição geminal em C-4 do anel ciclopentênico (16c e 16d) diminuiu a seletividade para PGHS-2 devido a um aumento da atividade inibitória sobre a PGHS-1 e/ou diminuição da potência sobre a PGHS-2, sugerindo que o domínio enzimático de ligação nesta região é estericamente sensível. A substituição do átomo de cloro de (16a) por um átomo de flúor, clássica troca bioisostérica, resultou na perda de atividade para PGHS-2 em aproximadamente 10 vezes (16a vs 16e), mas forneceu um derivado mais ativo *in vivo*⁷.

Os autores observaram ainda que os derivados não substituídos em C-4 do anel ciclopentênico possuíam baixa biodisponibilidade *p.o.* e um *t*_{1/2} relativamente curto, devido, provavelmente, ao rápido metabolismo oxidativo que o grupo metilenoalílico deste anel pode sofrer *in vivo*⁴⁰. Conseqüentemente, a introdução de substituintes em C-4 poderia exercer impedimento estérico suficiente para evitar a oxidação enzimática⁴⁰. Desta forma, foi desenvolvida uma nova série de análogos 4-espiro-1,2-diarilciclopenteno-metilsulfonas e sulfonamídicos (e.g. 17a



a 17f)⁴¹. Nesta série observou-se que os derivados sulfonamídicos eram os mais potentes, porém menos seletivos para PGHS-2 (17a e 17c vs 17b e 17d). A homologação do anel 4-espiro-ciclopentânico para ciclobutânicos produziu aumento dramático na seletividade (17a e 17b vs 17c e 17d)⁴¹. Entretanto, homologia superior reduziu significativamente a atividade do derivado ciclopentânico frente a PGHS-2 (17c vs 17e)⁴¹. O derivado com o anel cicloexila (17f) foi essencialmente inativo, indicando mais uma vez que o domínio enzimático de ligação do inibidor é estericamente sensível⁴¹. O derivado (17a) foi nesta série aquele que apresentou melhor atividade *in vivo* e, mesmo na dose de 200 mg/kg, não induziu lesão gástrica quando administrado intragastricamente⁴¹. Em contraste, o derivado sulfonamídico correspondente (17b) induziu lesões gástricas nos 10 ensaios realizados, revelando sua baixa seletividade⁴¹.



Face a estes resultados, foi postulado pelos autores,⁴⁰ que a introdução da sub-unidade espirociclopropila no anel ciclopentênico ocasiona restrição conformacional responsável pelo aumento da atividade para PGHS-1 (16e vs 17a). Para confirmar esta hipótese foi sintetizado o análogo espirociclopropila ciclopentadiênico (18)⁴⁰, que possui maior tensão angular e menor flexibilidade. De fato foi observada menor seletividade, em virtude de aumento na atividade em PGHS-1⁴⁰. De modo contrário, quando o tamanho do espiro-ciclo é aumentado por homologia, causa redução na tensão do anel central ciclopentênico e introduz um grau de liberdade conformacional que produz um composto mais seletivo (17a vs 17c)⁴⁰.

Utilizando como compostos-protótipo os derivados (17a e 17b), Huang e colaboradores⁴⁰ realizaram novo estudo de SAR, variando desta feita o resíduo 4'-flúor destes compostos. Nos compostos 4'-monossustituídos observou-se relação direta entre o efeito retirador de elétrons dos substituintes e a seletividade frente a PGHS⁴⁰. Quanto maior este efeito, maior a seletividade observada devido à menor atividade PGHS-1 (19a a 19i; Tabela 2)⁴⁰. Os derivados sulfonamídicos apresentaram menor seletividade do que aqueles metilsulfônicos correspondentes. Contudo, estes por sua vez, apresentaram propriedades farmacológicas superiores nos ensaios realizados *in vivo*⁴⁰.

Na série de derivados dissustituídos em um dos resíduos fenila, Huang e colaboradores⁴⁰ observaram que os derivados 3'-halo-4'-metoxifenila (19j a 19p; Tabela 2) foram seletivos para PGHS-2⁴⁰. Este efeito inesperado pode ser atribuído ao equilíbrio entre os efeitos retirador e doador de elétrons dos substituintes presentes⁴⁰. Dentre os análogos sulfonamídicos (19l, 19n e 19p), o que apresentou maior seletividade foi o composto 3'-cloro-4'-metoxifenila (19n), indicando que a seletividade para PGHS-2 não pode ser apenas atribuída ao efeito eletrônico dos substituintes⁴⁰.

Outros derivados indênicos análogos de (16e) foram descritos⁴². Nesta nova série os compostos metilsulfônicos (20a) e sulfonamídicos (20b) foram os mais ativos, sendo que o derivado com a função sulfonamida produziu, mais uma vez, um composto mais potente para PGHS-2, porém menos seletivo⁴².

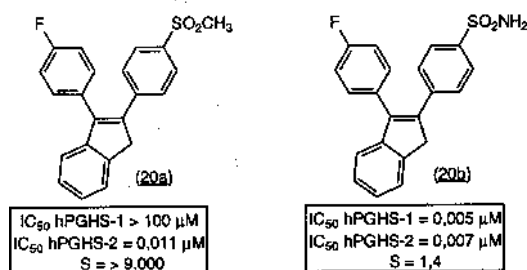
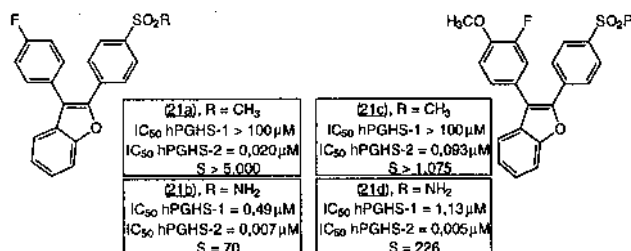


Tabela 2. Efeito dos substituintes retiradores de elétrons dos derivados (19a a 19p) sobre a atividade inibitória seletiva de PGHS-1 e -2⁴⁰.

Composto	X	R	IC ₅₀ (μ M) ^a		S ^b
			hPGHS-1	hPGHS-2	
19a	4'-Cl	CH ₃	3,1	0,001	3.100
19b	4'-Cl	NH ₂	0,14	0,001	140
19c	4'-CH ₃	CH ₃	4,04	0,0015	2.693
19d	4'-OCH ₃	CH ₃	0,57	0,005	114
19e	4'-OCH ₃	NH ₂	0,005	0,001	5
19f	4'-OCF ₃	CH ₃	>100	0,135	>741
19g	4'-OCF ₃	NH ₂	1,8	0,130	14
19h	4'-CF ₃	CH ₃	>100	0,002	50.000
19i	4'-CF ₃	NH ₂	0,5	0,001	500
19j	3'-F,4'-OCH ₃	CH ₃	>100	0,010	>10.000
19l	3'-F,4'-OCH ₃	NH ₂	0,48	0,002	240
19m	3'-Cl,4'-OCH ₃	CH ₃	>100	0,017	>5.800
19n	3'-Cl,4'-OCH ₃	NH ₂	2,8	0,002	1.400
19o	3'-Br,4'-OCH ₃	CH ₃	>100	0,013	>7.700
19p	3'-Br,4'-OCH ₃	NH ₂	0,4	0,002	200

^aIC₅₀ = concentração do fármaco que causa 50% de inibição enzimática; ^bS (índice de seletividade) = IC₅₀ (PGHS-1) / IC₅₀ (PGHS-2).

Sendo a posição alílica um sítio suscetível à metabolização oxidativa pelas enzimas hepáticas⁴³, nos derivados (20a) e (20b) a natureza benzil-alílica do metileno indênico representa alvo fácil para a oxidação metabólica, comprometendo a biodisponibilidade destes derivados. Desta forma, os autores⁴² aplicaram a estratégia do bioisosterismo⁴⁴ para introduzir novas modificações moleculares nestes compostos e obtiveram os derivados benzofuranícos (21a a 21d)⁴². Estes se mostraram menos potentes do que os protótipos (20a e 20b vs 21a a 21b), o mesmo ocorrendo quando o núcleo 4-fluorfenila foi substituído pelo 3-fluór-4-metoxifenila⁴².

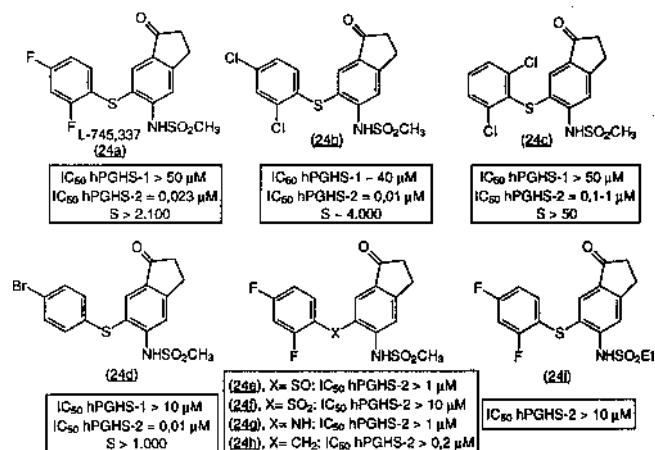
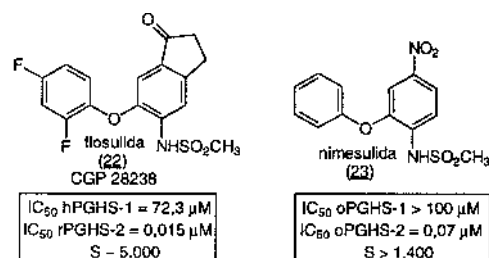


A flosulida (22) (CGP 28238) foi descrita como um composto antiinflamatório altamente potente, com reduzidos efeitos gastrintestinais indesejáveis^{45,46}. Posteriormente, o estudo do mecanismo de inibição deste derivado sobre a PGHS-2 evidenciou que, inicialmente, se observa uma ligação reversível de baixa afinidade que evolui para ligação de alta afinidade, tempo-dependente⁴⁷. Foi proposto, que esta ligação de alta afinidade era, provavelmente, devida à formação de intermediário tipo base de Schiff entre a carbonila indanônica de (22) e um resíduo amínico no sítio de ligação enzimático, ocasionando uma mudança conformacional na enzima⁴⁷. O hidrogênio ácido da sulfonamida também foi considerado essencial para a atividade inibitória seletiva, visto que sua substituição por grupamento metila aboliu a atividade³⁵.

A nimesulida (23)⁴⁸ já era conhecida como agente antiinflamatório de baixos efeitos gastro-irritantes antes da descoberta da PGHS-2. Sua atividade foi inicialmente atribuída ao efeito “sequestrador de radicais-livres” (“radical scavenger”) que possui^{49,50}. Por apresentar relações bioisostéricas com os derivados NS-398 (14) e flosulida (22), descritos como inibidores seletivos de PGHS-2, esta substância foi recentemente re-avaliada quanto a ação inibitória seletiva. Os resultados destes estudos recentes indicaram que a nimesulida (23) é inibidor seletivo tempo-dependente da PGHS-2⁵¹.

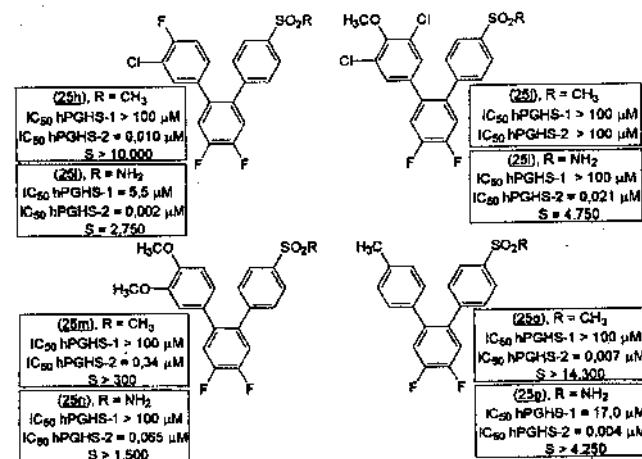
O L-745,337 (24a) foi eleito, após extensivo estudo de SAR³⁵, como o melhor composto de uma série de tioéteres análogos da flosulida (22)^{35,52}. Este composto mostrou-se superior ao protótipo quanto às propriedades farmacocinéticas e índice de ulcerogenicidade em modelos em animais^{35,52}. Os análogos dissustituídos 2',4'-di-substituídos foram os mais potentes *in vitro* e *in vivo* (24a, 24b vs 24c). O derivado 4'-bromofenila (24d) apresentou boa potência *in vitro*³⁵. Posterior modificação bioisotérica clássica⁴⁴ do espaçador presente entre os anéis indanônico e aromático revelou que somente os átomos de oxigênio e enxofre são bem tolerados nesta série (flosulida e 24a vs 24e, 24f, 24g, e 24h), indicando, ainda, que o grupo metilsulfonamida é farmacoforicamente importante para a atividade observada, uma vez que a substituição do grupamento metila por etila ocasiona perda na atividade inibitória sobre PGHS-2 (24a vs 24i)³⁵.

Buscando um grupo espaçador que apresentasse maior estabilidade *in vivo* em relação ao ciclopentênico, Li e colaboradores⁵³ desenvolveram novos compostos utilizando como ligante vários anéis aromáticos (e.g. 25a-25g; Tabela 3)⁵³. Nestes estudos os autores observaram que a interação destes compostos



com a PGHS-2 é sensível às propriedades estéricas e eletrônicas das posições adjacentes aos grupos 1,2-diarila, sendo o anel 4,5-difluorobenzeno o que confere melhor perfil de inibidor seletivo potente (derivado 25b)⁵³. Apesar de (25a) e (25d) apresentarem boa atividade *in vitro*, estes compostos foram praticamente inativos nos ensaios *in vivo*⁵³.

Uma vez eleito o melhor grupo espaçador nesta série, os autores buscaram, em seguida, desenvolver novos compostos oralmente ativos, variando desta feita o anel 4-fluorofenila (derivados 25h a 25p)⁵³. Mais uma vez, os derivados sulfonamídicos foram mais potentes do que os metilsulfônicos (25h, 25j, 25m e 25o vs 25i, 25l, 25n e 25p), não só nos ensaios *in vitro* com também *in vivo*⁵³. O derivado sulfonamídico (25i) foi aquele que apresentou o melhor perfil antiinflamatório nos ensaios *in vivo*⁵³.



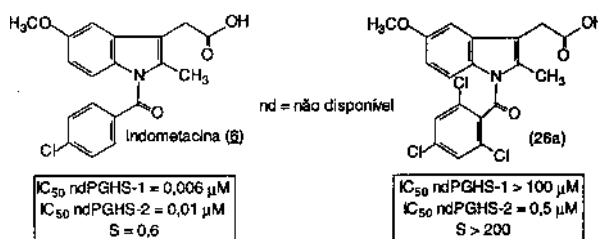
Sabendo que o sítio ativo da PGHS-2 pode ser menos estericamente sensível do que aquele da PGHS-1⁵⁴ (vide infra), Black e colaboradores⁵⁶ desenvolveram nova estratégia para o

Tabela 3. Derivados 3'-halo-4'-metoxifenil (**25a** a **25g**)⁵³.

Composto	ANEL	IC ₅₀ (μM) ^a			S ^b
		hPGHS-1	hPGHS-2		
25a		>100	0,26	>384	
25b		>100	0,014	>7.100	
25c		>100	0,24	>416	
25d		>100	0,083	>1.200	
25e		>100	>100	-	
25f		>100	>100	-	
25g		>100	>100	-	

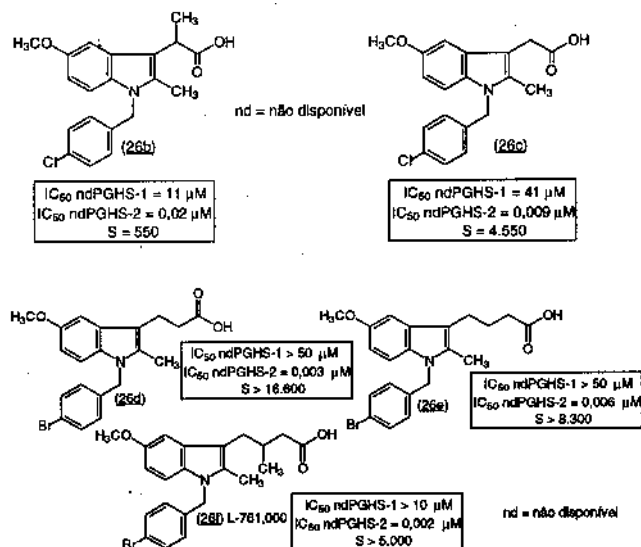
^aIC₅₀ = concentração do fármaco que causa 50% de inibição enzimática; ^bS (índice de seletividade) = IC₅₀ (PGHS-1) / IC₅₀ (PGHS-2).

planejamento de inibidores seletivos de PGHS-2. Esta nova estratégia consistiu no aumento do volume molecular do núcleo da indometacina (**6**), agente NSAÍ clássico não seletivo para PGHS-2, produzindo o composto seletivo (**26a**), capaz de interagir com o sítio ativo da PGHS-2, mas não com o da PGHS-1⁵⁶. A principal modificação realizada em (**6**) foi a substituição do grupo *N*-(4-clorobenzoila) da indometacina (**6**) pelo núcleo 2',4',6'-triclorobenzoila (**26a**)⁵⁶. Esta modificação molecular com dois átomos de cloro vizinhos à ligação benzoílica introduziu restrição conformacional ao nível do substituinte 2',4',6'-triclorobenzoila, forçando este núcleo a adotar conformação perpendicular ao anel indólico, resultando em maior volume estérico para este derivado em relação à indometacina (**6**) utilizada como protótipo neste exemplo⁵⁶. O composto (**26a**) apresentou razoável atividade PGHS-2 sem atividade sobre a PGHS-1⁵⁶.



Em etapa subsequente de modificação molecular, visando melhorar a potência do derivado (**26a**), uma nova série de novos

análogos foi sintetizada⁵⁶. Entretanto, o aumento suplementar do volume do substituinte *orto*-benzoila resultou na diminuição da atividade PGHS-2, com perda de seletividade⁵⁶. A modificação molecular seguinte, proposta pelos atores, consistiu em investigar análogos indólicos da coleção de amostras dos laboratórios Merck, resultando na identificação do derivado ácido *N*-benzil-indolilpropionico (**26b**), o qual apresentou melhor seletividade e potência do que (**26a**)⁵⁶. Entretanto, (**26b**) foi apenas moderadamente ativo *in vivo*, provavelmente devido à presença do grupo *N*-benzila, que se constitui em sítio metabolicamente vulnerável⁴³. A maior atividade PGHS-2 observada em (**26b**) foi racionalizada como resultante de fatores conformacionais atribuídos à presença do grupo benzila, que ao se projetar abaixo do plano do anel indólico introduz um maior volume estérico à molécula do que aquele de (**26a**)⁵⁶. O melhor substituinte eleito para o grupo benzila foi o 4'-bromo e a remoção da metila no resíduo ácido carboxílico produziu aumento na seletividade conduzindo ao composto (**26c**)⁵⁶.



Modificação da extensão da cadeia ácido carboxílico em (**26c**) originou os derivados ácido *n*-propanóico (**26d**) e *n*-butanóico (**26e**), que se mostraram inibidores potentes de PGHS-2, com elevada seletividade⁵⁶. O derivado homólogo ácido *n*-pentanóico correspondente mostrou-se inativo para ambas as enzimas⁵⁶. Apesar de (**26d**) ser mais potente do que (**26e**) nos ensaios *in vitro*, este composto apresentou fraco perfil terapêutico *in vivo*, devido, provavelmente, à sua rápida eliminação por metabolismo de β-oxidação⁴³ da cadeia ácida⁵⁶. O mesmo pode ocorrer com o derivado (**26e**), o qual pode ser considerado como pró-fármaco de (**26c**)⁶³.

Introduzindo um grupo alquila na cadeia ácido carboxílico de (**26d**), afim de bloquear por impedimento estérico esta rota metabólica, foram obtidos vários novos derivados ácidos *n*-propionícos e *n*-butanóicos⁵⁶. Entre estes, o composto (**26f**) (L-761,000) foi o que apresentou melhor perfil antiinflamatório *in vitro* e *in vivo*, sendo ativo por via oral e com alto nível de tolerância gastrointestinal⁵⁶. As atividades *in vitro* do enantiômero-(*R*) (L-761,066) e do enantiômero-(*S*) (L-761,065) são comparáveis ao racemato (L-761,000)⁵⁷. Porém, (L-761,066) foi mais potente possuindo ED₅₀ de 0,4 mg/kg no teste de edema de pata de rato (ED₅₀ > 3 mg/kg para L-761,065)⁵⁷. A diferença de atividade *in vivo* tem origem, provavelmente, no melhor perfil farmacocinético (em ratos) de L-761,066, C_{max} de 24,3 μM (14,4 μM para L-761,065) e *clearance* de 2,8 mL/kg/min (21 mL/kg/min para L-761,065)⁵⁷. Estes resultados indicaram que a estratégia de modular a atividade de NSAÍ's-clássicos através de

modificações moleculares adequadas representa estratégia de sucesso com a obtenção de novos inibidores seletivos de PGHS-2⁵⁶.

A modificação do anel tiofênico de Dup 697 (12) pelo sistema bicíclico imidazo[2.1-*b*]tiazola levou a uma nova classe de compostos⁵⁸. Nesta nova série, o derivado (27) (L-766,112) foi o que apresentou o melhor perfil antiinflamatório devido à sua alta potência e seletividade frente a PGHS-2⁵⁸. Entretanto, com o estudo do metabolismo de (27) observou-se que o maior metabólito formado era uma espécie S-óxido, a qual é aceptor de Michael potente, que pode ligar-se a proteínas, ocasionando efeitos tóxicos graves⁵⁹. Desta forma, buscou-se novo análogo de (27) que mantivesse a desejada seletividade com idêntica potência, mas com distinto perfil metabólico. A substituição do sistema imidazo[2.1-*b*]tiazola pelo sistema tiazolo[3,2-*b*]triazola forneceu compostos (28a a 28q; Tabela 4) altamente potentes frente a PGHS-2⁶⁰. Adicionalmente, derivados com R₁ igual a H, metila ou vinila apresentaram boa seletividade, que é perdida quando R₁ é trifluorometila, etila e isopropila. A redução da seletividade também foi observada quando R₂ é 3',5'-difluor ou 3'-metoxi⁶⁰. O derivado (28a) (L-768,277) apresentou a menor IC₅₀ para hPGHS-2 e excelente atividade *in vivo* (ED₅₀ de 1,7 mg/kg no teste de edema de pata de rato). Este derivado apresentou também boas propriedades farmacocinéticas e metabólicas⁶⁰.

DIFERENÇAS ESTRUTURAIS E DE LIGAÇÃO COM AGENTES NSAID'S NO SÍTIO CICLOXIGENASE DE PGHS-1 E PGHS-2.

Assim como inicialmente identificado na estrutura da PGHS-1 ovina⁶² (Figura 1), o monômero da PGHS-2 humana⁶³ é constituído por três domínios: o domínio do fator de crescimento epidérmico (EGF), localizado na região N-terminal, o domínio de ligação à membrana (MBD) e o domínio catalítico na região C-terminal. Este último, o maior deles, contém os sítios peroxidase e cicloxigenase. O sítio ativo cicloxigenase, tanto na PGHS-1 como na PGHS-2, está localizado em um canal

hidrofóbico longo e estreito que se estende em direção ao centro do principal domínio globular enzimático⁶⁶⁻⁶⁸.

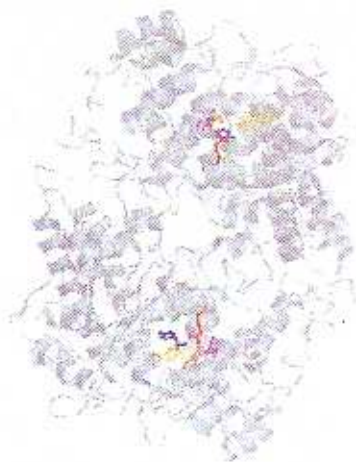
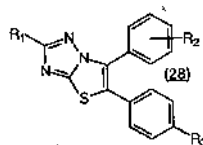
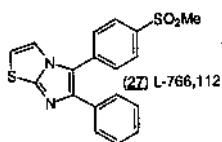


Figura 1. Estrutura da PGHS-1 ovina⁶² obtida do Protein Databank (PDB), com destaque para os aminoácidos mais importantes na interação com inibidores: Arg₁₂₀ (vermelho), Tyr₃₅₅ (amarelo), Tyr₃₈₅ (azul), Ile₅₂₃ (laranja), Glu₅₂₄ (rosa) e Ser₅₃₀ (verde).

A sobreposição dos núcleos dos domínios catalíticos da PGHS-1 ovina e da PGHS-2 humana mostra média da raiz quadrada (rms) de 0,4 Å, indicando que eles são praticamente idênticos. Alguns resíduos no domínio catalítico, considerados importantes para a atividade enzimática na PGHS-1, tal como Tyr₃₈₅ no sítio cicloxigenase e a Gln₂₀₃ no sítio peroxidase, são bem conservados na PGHS-2. O MBD é aquele que possui menor conservação (cerca de 33%), embora haja boa correlação em relação às suas estruturas secundárias e terciárias, uma vez que foi observada experimentalmente uma rms de 0,7 Å na sobreposição de todos os átomos do esqueleto protéico⁶².

Tabela 4. L-766,112 (27)⁵⁸ e seus análogos (28a a 28q)⁶⁰.



Composto	R ₁	R ₂	R ₃	IC ₅₀ (μM) ^a		S ^c
				pPGHS-1 ^b	pPGHS-2 ^b	
(27)	-	-	-	>50	0,016	>3.125
28a	H	H	SO ₂ Me	43	0,010	4.300
28b	Me	H	SO ₂ Me	>50	0,020	>2.500
28c	Et	H	SO ₂ Me	2,4	0,15	160
28d	CF ₃	H	SO ₂ Me	1,1	0,003	370
28e	vinil	H	SO ₂ Me	9,6	0,006	1.600
28f	i-Pr	H	SO ₂ Me	0,60	0,011	55
28g	H	3-F	SO ₂ Me	>50	0,022	>2.300
28h	H	4-F	SO ₂ Me	15	0,036	420
28i	H	3,4-diF	SO ₂ Me	30	0,048	630
28j	H	3,5-diF	SO ₂ Me	>50	0,080	>630
28l	H	3-OMe	SO ₂ Me	>50	0,26	>190
28m	Me	3-F	SO ₂ Me	>50	0,15	>330
28n	CF ₃	3-F	SO ₂ Me	8,50	0,013	650
28o	CF ₃	3-Me	SO ₂ Me	0,61	0,003	200
28p	H	4-SO ₂ Me	H	>50	0,032	>1.600
28q	CF ₃	4-SO ₂ Me	H	9	>50	<08

^a IC₅₀ = concentração do fármaco que causa 50% de inibição enzimática; ^b p = cobaia; ^c S (índice de seletividade) = IC₅₀ (PGHS-1) / IC₅₀ (PGHS-2).

Estudos baseados em cristalografia de raios-X, publicados recentemente, demonstram a importância dos resíduos Arg₁₂₀ e Tyr₃₅₅ na ligação de NSAIDs clássicos ao sítio ativo cicloxigenase da PGHS-1^{29-30, 64-65}.

A maioria dos NSAIDs já estudados bloqueia o acesso do araquidonato ao sítio ativo por ligar-se à região superior deste, próximo ao resíduo Tyr₃₈₅, preenchendo todo o canal. Foi proposto que o araquidonato penetra no canal cicloxigenase em conformação dobrada que permite que o seu grupo carboxilato interaja com a Arg₁₂₀³⁰. A maioria dos NSAIDs, *e.g.* o flurbiprofeno (3) e a indometacina (6), possuindo um grupo carboxilato livre, interage por ligação iônica com um dos nitrogênios guanidínicos presentes na Arg₁₂₀ em analogia ao proposto para o araquidonato, resultando na inibição competitiva. Adicionalmente, foi observada interação por ligação de hidrogênio entre um dos oxigênios do grupamento carboxilato do flurbiprofeno (3) e a hidroxila fenólica presente no resíduo Tyr₃₅₅³⁰ (Figura 2), que contribui para que a cavidade inferior do sítio cicloxigenase (delimitado por Arg₁₂₀ e Tyr₃₅₅) adote, preferencialmente, conformação fechada^{26,63}. Além disso, demonstrou-se por meio da mutagênese da Tyr₃₅₅ para Phe₃₅₅ que este resíduo é importante para a seletividade da enzima PGHS-1 na ligação seletiva dos (S)-eutômeros da classe dos profenos, *e.g.* flurbiprofeno (3)^{30,62}.



Figura 2. Resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação do flurbiprofeno (3) ao sítio cicloxigenase da PGHS-1/PGHS-2^{30,64}.

A análise do complexo da PGHS-2 de camundongos com (3), efetuada a partir de técnicas de substituição molecular utilizando dados de cristalografia de raios X da PGHS-1⁶⁸, mostrou que este agente NSAI interage com os resíduos de aminoácidos no sítio cicloxigenase de maneira idêntica à observada para a PGHS-1, devido à grande conservação estrutural mencionada⁶⁴.

Estudos realizados com o complexo do ácido 5-bromo-acetil-salicílico (29) e a PGHS-1 demonstraram que o grupo acetila é transferido à Ser₅₃₀ bloqueando o acesso do araquidonato ao sítio cicloxigenase²⁶. A PGHS-2 também sofre acetilação no resíduo de Ser₅₁₆, mas, provavelmente, devido à maior largura do canal cicloxigenase nesta isoforma, a sua ação oxidativa é parcialmente mantida, formando outro produto que foi identificado como o ácido 15-hidroxi-5-*cis*-8-*cis*-11-*cis*-13-*trans*-eicosatetraenóico, 15(*R*)-HETE^{66,67}. Estes dados indicam a maior capacidade oxidativa da PGHS-2^{63,68}.

De uma maneira geral, cabe ressaltar que a estrutura da PGHS-1 complexada com inibidores de diferentes classes tem significativa similaridade conformacional e estabilidade em ambientes de temperatura e pH extremos⁶². A partir desta observação, Meade e colaboradores⁵⁵ propuseram que a ligação dos inibidores à PGHS-1 produz mudanças conformacionais capazes de introduzirem rigidez na estrutura protéica. Esses dados levaram alguns autores a supor que, ou as alterações

conformacionais sofridas pela enzima são realmente muito semelhantes para as várias classes de inibidores, ou as mudanças são conformacionalmente sutis e de difícil observação pelas técnicas atualmente disponíveis^{26,63}.

As observações feitas a partir das interações dos inibidores não-seletivos com o sítio cicloxigenase não permitiu esclarecer a seletividade que certos compostos apresentam para a PGHS-2. Análise cuidadosa das vizinhanças estruturais ao sítio cicloxigenase da PGHS-2 revelou que os únicos resíduos de aminoácidos distintos da PGHS-1 são a Ile₅₂₃ e a His₅₁₃, que estão na PGHS-2 substituídos por Val₅₂₃ e Arg₅₁₃^{*}.

Estudos de mutagênese e modelagem molecular da PGHS-2 demonstraram a importância desses resíduos na seletividade de alguns inibidores, capazes de modificarem, principalmente, a formação do complexo mais estável característico do mecanismo de ação dependente do tempo^{68,69}. Adicionalmente, verificou-se a existência de uma segunda cavidade hidrofóbica, além do canal cicloxigenase na PGHS-2, que contribui para o aumento da sua extensão⁶³. Na PGHS-2 a Val₅₂₃ está localizada exatamente na entrada dessa cavidade. O canal cicloxigenase central da PGHS-2 (sítio de ligação dos NSAI's) também é mais largo. Na PGHS-1, devido ao maior volume da Ile₅₂₃, essa cavidade está mais restrita estericamente o que, provavelmente, impede o acesso de certos inibidores^{63,64}. Essas diferenças estruturais e estéricas parecem ser as prováveis razões da seletividade, observada em alguns inibidores. Por exemplo, estudos da interação do derivado pirazólico SC-558 (30), inibidor seletivo da PGHS-2 (S = 1903) pertencente à classe dos 1,2-difenileterocíclicos, evidenciaram que o grupamento 4'-sulfonamida atinge o canal cicloxigenase do sítio ativo explorando a cavidade maior PGHS-2 (Figura 3)⁶⁴.

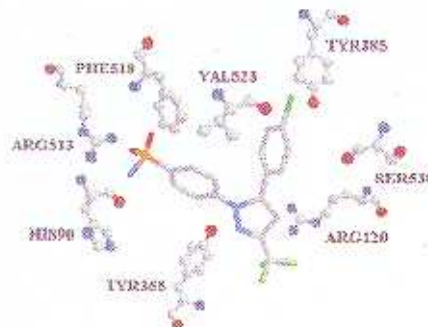
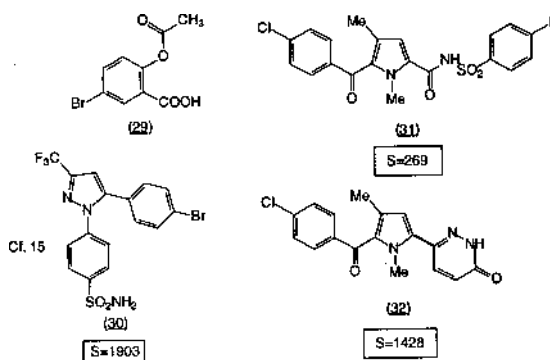


Figura 3. Resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação do SC558 (30) ao sítio cicloxigenase da PGHS-2⁶³.

Observou-se, ainda, que os átomos de oxigênio deste grupamento interagem por meio de ligação de hidrogênio com os resíduos His₉₀ e Arg₅₁₃, enquanto que o átomo de nitrogênio sulfonamídico forma ligação de hidrogênio com o oxigênio carbonílico da Phe₅₁₈. A comparação entre a ligação de (30) e aquela do flurbiprofeno (3) à PGHS-2 permitiu evidenciar que os resíduos aromáticos 4'-bromofenila e pirazola de (30) se sobrepõem, respectivamente, ao anel fenila distal e ao anel fluorofenila de (3). O substituinte CF₃ do SC-558 (30) e o carboxilato do flurbiprofeno (3) se ligam à mesma cavidade^{30,64}.

Em estudo sobre a interação da PGHS-2 com dois inibidores potentes e seletivos, a saber, o derivado pirrólico análogo à tolmetina RS104897 (31) e o derivado piridazinônico RS57067 (32)⁶² foi observado o modo de ligação de (31) ao sítio ativo da PGHS-2 e comparado com aquele relativo à interação do

* Para maior clareza, a numeração dos resíduos de aminoácidos foi feita baseada na estrutura cristalográfica da PGHS-1 ovina⁶².



flurbiprofeno (3) com a PGHS-1. Foi possível evidenciar que estes compostos ocupam basicamente o mesmo ambiente no sítio ativo^{30,62}. O resíduo 4-clorobenzoila de (31) parece interagir com a Tyr₃₈₅ em analogia à interação feita por um dos anéis aromáticos de (3) e o átomo de oxigênio carbonílico do grupamento benzoila distante 3,2 Å da hidroxila da Ser₅₃₀, interage através de ligações de hidrogênio⁶⁵. A Arg₁₂₀ e a Tyr₃₅₅ também interagem, respectivamente, com o nitrogênio e o oxigênio do grupo acil-sulfonamida de (31) de maneira análoga à do carboxilato presente na maioria dos NSAIDs clássicos^{29-30,65}. Um dado interessante a destacar, resultado destes estudos, diz respeito à conformação fechada resultante da interação de (31) com a enzima, semelhante àquela mencionada para os complexos de NSAIDs com a PGHS-1^{26,63}. O Glu₅₂₄ interage com Arg₁₂₀, tanto na PGHS-1 como na PGHS-2. Ao nível do sítio cicloxigenase da PGHS-2 detectou-se que a Arg₁₂₀, a Tyr₃₅₅ e o Glu₅₂₄ participam de uma rede de ligações^{63,64}. Essas observações reforçam a tese de que mudanças dinâmicas sutis, resultantes das interações com os inibidores, possam estar ocorrendo no sítio enzimático. Entretanto, os dados disponíveis até o momento não permitem que seja possível determinar-se as diferentes contribuições farmacofóricas responsáveis pela seletividade observada em certos inibidores de PGHS-2²⁶.

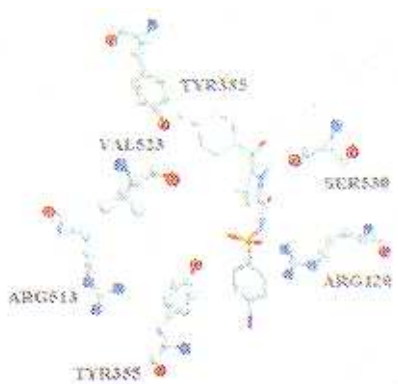


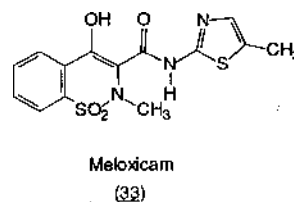
Figura 4. Resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação do RS104897 (31) ao sítio cicloxigenase da PGHS-263.

A partir da análise do complexo de (32) com o sítio cicloxigenase da PGHS-2 foi aventada a hipótese de que existam conformações alternadas neste sítio causadas pela ligação com este inibidor. Evidenciou-se, ainda, a preferência deste sítio para conformação aberta, na qual a Arg₁₂₀ não mais participa da rede de ligações de hidrogênio que define o sítio ativo. Isto ocorre devido à presença da unidade piridazinônica de (32), que interage através de ligações de hidrogênio com os átomos de oxigênio carbonílicos do resíduo Glu₅₂₄, deslocando a Arg₁₂₀ e gerando modificações conformacionais detectáveis numa região da proteína que está ligada ao MBD. Estas mudanças

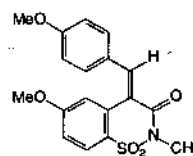
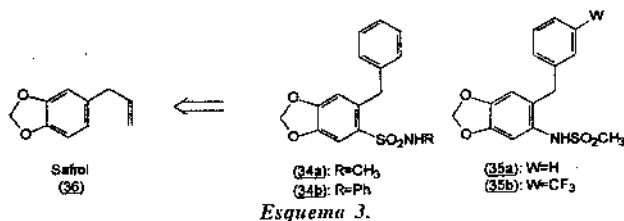
conformacionais no fundo do canal não parecem provocar alterações significativas no restante da estrutura do sítio cicloxigenase, uma vez que se observou rms de 0,6 Å na sobreposição dos átomos do backbone das conformações aberta (complexada com 32) e fechada (complexada com 31) e a PGHS-2⁶⁴.

CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A descoberta da PGHS-2 como isoforma induzida da PGHS permitiu nova abordagem terapêutica para o tratamento de quadros inflamatórios⁷⁰. Conseqüentemente, várias classes de compostos bioativos na inflamação, sem os efeitos gastro-irritantes mecanismo-dependentes dos agentes NSAID's-clássicos, foram descobertos, representando novas entidades químicas úteis para tratamento de doenças inflamatórias crônicas que atingem *ca.* 1% da população mundial⁷⁰. Recentemente, foi descrito o meloxicam (33), comercializado no Brasil sob o nome Movatec[®], como promissor agente antiinflamatório seletivo para PGHS-2^{71,72,73}.



O LASSBio tem dado sua contribuição nesta área, desenvolvendo estudos sobre o planejamento e a síntese de novos candidatos à protótipo de inibidores seletivos de PGHS-2, tendo recentemente descoberto os compostos (34) e (35)⁷⁴, sintetizados a partir do safrol (36) (Esquema 3), principal componente químico do óleo de sassafrás, e a nova série de derivados (37)⁷⁵.



Vimos, ainda, desenvolvendo no LASSBio, com a colaboração do Prof. Alencastro do Instituto de Química da UFRJ, estudos de modelagem molecular⁷⁶ com inibidores seletivos descritos na literatura, que têm subsidiado o planejamento estrutural de novos compostos candidatos a protótipos de inibidores seletivos de PGHS-2, cujas respectivas sínteses⁷⁷, são objeto de estudos em nosso laboratório, no momento.

Pelo exposto, pode-se concluir que, apesar de ser estratégia terapêutica recente (*ca.* de seis anos) para o tratamento da inflamação, a busca de novos protótipos de inibidores seletivos de PGHS-2, objeto de inúmeros relatos na literatura, representa nova estratégia terapêutica para a descoberta racional, pelos Químicos Medicinais, de novos agentes antiinflamatórios não esteróides seletivos e mais seguros^{26,27}. Os estudos de modelagem molecular e "docking" de inibidores seletivos da PGHS-2

com o sítio cicloxigenase da enzima humana⁷⁸, embora ainda emergentes, deverão ajudar a esclarecer os fatores estruturais responsáveis pela seletividade observada em determinados compostos para esta isoforma enzimática e fornecer os subsídios necessários ao desenvolvimento de novos antiinflamatórios mais potentes, seletivos e seguros.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq (#50.0033/96-5), à FAPERJ (#171.299-95) e à FUJB (#6276-6 e #7675-9) pelo apoio financeiro e também ao CNPq pelas bolsas concedidas (ASL; NCR; CAMF e EJB). Agradecemos as valiosas sugestões do assessor da Editoria.

NOTA ADICIONADA NAS PROVAS

Durante a publicação deste trabalho foi descrita uma revisão sobre inibidores seletivos de COX-2, veja: Prasit, P.; Riendeau, D.; *Ann. Rept. Med. Chem.* **1997**, 32, 211.

REFERÊNCIAS

- Holtzman, M. J.; Turk, J. & Shornick, L. P.; *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 21438.
- Smith, W. L.; *Biochem. J.* **1989**, 259, 315.
- Loll, P. J.; Picot, D.; Ekabo, O. & Garavito, M.; *Biochemistry* **1996**, 35, 7330.
- Allison, M. C.; Howatson, A. G.; Torrance, C. J.; Lee, F. D. & Russell, R. I.; *N. Engl. J. Med.* **1992**, 327, 749.
- Schlondorff, D.; *Kidney Int.* **1993**, 44, 643.
- Masferrer, J. L.; Zweifel, B. S.; Manning, P. T.; Hauser, S. D.; Leahy, K. M.; Smith, W. G.; Isakson, P. C. & Seibert, K.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 3228.
- Reitz, D. B.; Li, J. J.; Norton, M. B.; Reinhard, E. J.; Collins, J. T.; Anderson, G. D.; Gregory, S. A.; Koboldt, C. M.; Perkins, W. E.; Seibert, K. & Isakson, P. C.; *J. Med. Chem.* **1994**, 37, 3878.
- Diaz, A.; Reginato, A. M. & Jimenez S. A.; *J. Biol. Chem.* **1992**, 267, 10816.
- Lyons-Giordano, B.; Pratta, M. A.; Galbraith, W.; Davis, G. L. & Arner, E. C.; *Exp. Cell. Res.* **1993**, 206, 58.
- Mitchell, J. A.; Belvisi, M. G.; Akarasereenont, P.; Robbins, R. A.; Know, O. J.; Croxtall, J.; Barnes, P. J. & Vane, J. R.; *Br. J. Pharmacol.* **1994**, 113, 1008.
- Masferrer, J. L.; Zweifel, B. S.; Seibert, K. & Needleman, P.; *J. Clin. Invest.* **1990**, 86, 1375.
- O'Sullivan M. G.; Huggins Jr, E. M.; Meade, E. A.; Dewitt, D. L. & McCall, C. E.; *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1992**, 187, 1123.
- Hempel, S. L.; Monick, M. M. & Hunninghake, G. W.; *J. Clin. Invest.* **1994**, 93, 391.
- Jones, D. A.; Carlton, D. P.; McIntyre, T. M.; Zimmerman, G. A. & Prescott, S. M.; *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 9049.
- Crofford, L. J.; Wilder, R. L.; Ristimäki, A. P.; Sano, H.; Remmers, E. F.; Epps, H. R. & Hla, T.; *J. Clin. Invest.* **1994**, 93, 1095.
- Créminon, C.; Habib, A.; Maclouf, J.; Pradelles, P.; Grassi, J. & Frobert, Y.; *Biochim. Biophys. Acta.* **1995**, 1254, 341.
- Rimarachin, J. A.; Jacobson, J. A.; Szabo, P.; Maclouf, J.; Créminon, C. & Weksler, B. B.; *Arteriosclerosis and Thrombosis* **1994**, 14, 1021.
- Hugues, A. K.; Padilla, E.; Kutchera, W. A.; Michael, J. R. & Kohan, D. E.; *Kidney Intern.* **1995**, 47, 53.
- Thivierge, M. & Rola-Pleszczynski, M.; *J. Immunol.* **1995**, 154, 6593.
- Smith, W. L.; Meade, E. A. & Dewitt, D. L.; *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1994**, 714, 136.
- Entre os agentes NSAI's-clássicos disponíveis no Brasil contam-se 17 substâncias, a saber: aciclofenaco, ácido acetilsalicílico, benzidamina, bumadizona, cetoprofeno, diclofenaco, fenilbutazona, hidroxifenilbutazona, ibuprofeno, indometacina, meloxicam, nabumetona, naproxeno, nimesulida, oxifenilbutazona, piroxicam, tenoxicam. Fonte: Dicionário de Especialidades Farmacêuticas 97/98.
- Wallace, J. L. & Cirino, G.; *TIPS* **1994**, 15, 405.
- Gierse, J. K.; McDonald, J. J.; Hauser, S. D.; Rangwala, S. H.; Koboldt, C. M. & Seibert, K.; *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 15810.
- Smith, W. L.; Lecomte, M.; Laneuville, O.; Breuer, D. K. & Dewitt, D. L.; *Eur. J. Med. Chem.* **1995**, 30(Suppl.), 417.
- a) Frolich, J. C.; *TIPS* **1997**, 18, 30.; cf. b) Griswold, D. E.; Ruffolo, R. R.; Poste, G. & Torphy, T. T.; *TIPS* **1997**, 18, 311; c) Frolich, J. C.; *TIPS* **1997**, 18, 312; d) Botting, R. & Vane, J.; *TIPS* **1997**, 18, 312; c) Frolich, J. C.; *TIPS* **1997**, 18, 313.
- Garavito, R. M.; *Nature Struct. Biol.* **1996**, 3, 897.
- Khanna, I. K.; Weier, Y. Y.; Collins, P. W.; Miyashiro, J. M.; Koboldt, C. M.; Veenhuizen, A. W.; Currie, J. L.; Seibert, K. & Isakson, P. C.; *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 1619.
- O'Neill, G. P.; Kennedy, B. P.; Mancini, J. A.; Kargman, S.; Ouellet, M.; Yergey, J.; Falgoutret, J.; Cromlish, W. A.; Payette, P.; Chan, C. C.; Culp, S. A.; Vincent, C.; Boily, C.; Abramovitz, M.; Evans, J. F.; Ford-Hutchinson, A. W.; Vickers, P. J. & Percival, M. D.; *AAS* **1995**, 46, 159.
- Mancini, J. A.; Riendeau, D.; Falgoutret, J.; Vickers, P. J. & O'Neill, G. P.; *J. Biol. Chem.* **1995**, 270, 29372.
- Bhattacharyya, D. K.; Lecomte, M.; Riche, C. J.; Garavito, R. M. & Smith, W. L.; *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 2179.
- Gans, K. R.; Galbraith, W.; Roman, R. J.; Harber, S. B.; Kerr, J. S.; Schmidt, W.; Smith, C.; Hewes, W. E. & Ackerman, N. R.; *J. Pharm. Exp. Ther.* **1990**, 254, 180.
- Leblanc, Y.; Gauthier, J. Y.; Ethier, D.; Guay, J.; Mancini, J.; Riendeau, D.; Tagari, P.; Vickers, P.; Wong, E. & Prasit, P.; *BioMed. Chem. Lett.* **1995**, 5, 2123.
- Futaki, N.; Arai, I.; Hamasaka, Y.; Takahashi, S.; Higuchi, S. & Otomo, S.; *J. Pharm. Pharmacol.* **1993**, 45, 753.
- Copeland, R. A.; Williams, J. M.; Giannaras, J.; Nurnberg, S.; Covington, M.; Pinto, D.; Pick, S. & Trzaskos, J. M.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 11202.
- Li, C.; Black, W. C.; Chan, C.; Ford-Hutchinson, A. W.; Gauthier, J.; Gordon, R.; Guay, D.; Kargman, S.; Lau, C. K.; Mancini, J.; Ouimet, N.; Roy, P.; Vickers, P.; Wong, E.; Young, R. N.; Zamboni, R. & Prasit, P.; *J. Med. Chem.* **1995**, 38, 4897.
- Seibert, K.; Zhang, Y.; Leahy, K.; Hauser, S.; Masferrer, J.; Perkins, W.; Lee, L. & Isakson, P.; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, 91, 12013.
- Vane, J. R. & Botting, R. M.; *Inflamm. Res.* **1995**, 44, 1.
- Gierse, J. K.; Hauser, S. D.; Koboldt, C.; Rangwala, S. H.; Isakson, P. C. & Seibert, K.; *Biochem. J.* **1995**, 305, 479.
- Ouellet, M. & Percival, M. D.; *Biochem. J.* **1995**, 306, 247.
- Huang, H. C.; Li, J. J.; Garland, D. J.; Chamberlain, T. S.; Reinhard, E. J.; Manning, R. E.; Seibert, K.; Koboldt, C. M.; Gregory, S. A.; Anderson, G. D.; Veenhuizen, A. W.; Zhang, Y.; Perkins, W. E.; Burton, E. G.; Cogburn, J. N.; Isakson, P. C. & Reitz, D. B.; *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 253.
- Reitz, D. B.; Huang, H.; Li, J. J.; Garland, D. J. & Manning, R. E.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **1995**, 5, 867.
- Huang, H. C.; Chamberlain, T. S.; Seibert, K.; Koboldt, C. M.; Isakson, P. C. & Reitz, D. B.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **1995**, 5, 2377.
- Barreiro, E. J.; Silva, J. F. M.; Fraga, C. A. M.; *Quím. Nova* **1996**, 19, 641.
- a) Barreiro, E. J.; *Rev. Bras. Farm.* **1991**, 72, 2; b) Barreiro, E. J.; *Rev. Bras. Farm.* **1991**, 72, 34.

45. Klein, T.; Nüsing, R. M.; Pfeilschifter, J. & Ullrich, V.; *Biochem. Pharmacol.* **1994**, 48, 1605.
46. Wiesenberger-Boettcher, I.; Schweizer, A.; Green, J. R.; Muellerm, K.; Maerki, F. & Pfeilschifter, J.; *Drugs Exp. Clin. Res.* **1989**, 15, 501.
47. Klein, T.; Nüsing, R. M.; Wiesenberger-Boettcher, I. Ullrich, V.; *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 51, 285.
48. Swingle, K. F.; Moore, G. G. I. & Grant, T. J.; *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* **1976**, 221, 132.
49. Bevilacqua, M.; Vago, T.; Baldi, G.; Renesto, E.; Dallegri, F. & Norbiato, G.; *Eur. J. Pharmacol.* **1994**, 268, 415.
50. Rabasseda, X.; *Drugs Today* **1996**, 32 (Suppl.D), 1.
51. Vago, T.; Bevilacqua, M. & Norbiato, G.; *Drug Res.* **1995**, 45, 1096.
52. Chan, C.; Boyce, S.; Brideau, C.; Ford-Hutchinson, A. W.; Gordon, R.; Guay, D.; Hill, R. G. Li, C.; Mancini, J.; Penne-ton, M.; Prasit, P.; Rasori, R.; Riendeau, D.; Roy, P.; Tagari, P.; Vickers, P.; Wong, E. & Rodger, I. W.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1995**, 274, 1531.
53. Li, J. J.; Norton, M. B.; Reinhard, E. J.; Anderson, G. D.; Gregory, S. A.; Isakson, P. C.; Koboldt, C. M.; Masferrer, J. L.; Perkins, W. E.; Seibert, K.; Zhang, Y.; Zweifel, B. S. & Reitz, D. B.; *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 1846.
54. Esta hipótese surgiu com a observação de que só a PGHS-2 acetilada pelo AAS (1) e tratada com AA fornecia novo icosanóide, o qual foi identificado como o 15-HETE. Desta forma, acredita-se que a acetilação da PGHS-2 não bloqueia o acesso do araquidonato ao seu sítio ativo, porém ocasiona mudança conformacional na enzima de modo que sua atividade enzimática fica direcionada para síntese de 15-HETE. Em contraste, a acetilação da PGHS-1 bloqueia o acesso do araquidonato ao sítio catalítico^{1,20,24,55}.
55. Meade, E. A.; Smith, W. L. & Dewitt, D. L.; *J. Biol. Chem.* **1993**, 268, 6610.
56. Black, W. C.; Bayly, C.; Belley, M.; Chan, C. C.; Charleson, S.; Denis, D.; Gauthier, J. Y.; Gordon, R.; Guay, D.; Kargman, S.; Lau, C. K.; Leblanc, Y.; Mancini, J.; Ouellet, M.; Percival, D.; Roy, P.; Skorey, K.; Tagari, P.; Vickers, P.; Wong, E.; Xu, L. & Prasit, P.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **1996**, 6, 725.
57. Leblanc, Y.; Black, W. C.; Chan, C. C.; Charleson, S.; Delorme, D.; Denis, D.; Gauthier, J. Y.; Grimm, E. L.; Gordon, R.; Guay, D.; Hamel, P.; Kargman, S.; Lau, C. K.; Mancini, J.; Ouellet, M.; Percival, D.; Roy, P.; Skorey, K.; Tagari, P.; Vickers, P.; Wong, E.; Xu, L. & Prasit, P.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **1996**, 6, 731.
58. Thérien, M.; Brideau, C.; Chan, C. C.; Cromlish, W. A.; Gauthier, J. Y.; Gordon, R.; Greig, G.; Kargman, S.; Lau, C. K.; Leblanc, Y.; Li, C.; O'Neill, G. P.; Riendeau, D.; Roy, P.; Wang, Z.; Xu, L. & Prasit, P.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **1997**, 7, 47.
59. Trimble, L. A.; Chauret, N.; Silva, J. M.; Nicoll-Griffith, D. A.; Li, C. & Yergey, J. A.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **1997**, 7, 53.
60. Roy, P.; Leblanc, Y.; Ball, R. G.; Brideau, C.; Chan, C. C.; Chauret, N.; Cromlish, W. A.; Ethier, D.; Gauthier, J. Y.; Gordon, R.; Greig, G.; Kargman, S.; Lau, C. K.; O'Neill, G. P.; Silva, J.; Thérien, M.; van Staden, C.; Wong, E.; Xu, L. & Prasit, P.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **1997**, 7, 57.
61. Boehm, J. C.; Smietana, J. M.; Sorenson, M. E.; Garigipati, R. S.; Gallagher, T. F.; Sheldrake, P. L.; Bradbeer, J.; Badger, A. M.; Laydon, J. T.; Lee, J. C.; Hillegass, L. M.; Griswold, D. E.; Breton, J. J.; Chabot-Fletcher, M. C. & Adams, J. L.; *J. Med. Chem.* **1996**, 39, 3929.
62. Picot, D., Loll, P. J. & Garavito, R. M.; *Nature* **1994**, 367, 243.
63. Luong, C., Miller, A., Barnett, J., Chow, J., Ramesha, C. & Browner, M. F.; *Nature Struct. Biol.* **1996**, 3, 927.
64. Kurumbail, R. G., Stevens, A. M., Gierse, J. K., McDonald, J. J., Stageman, R. A., Pak, J. Y., Gildehaus, D., Miyashiro, J. M., Penning, T. D., Seibert, K., Isakson, P. & Stallings, W. C.; *Nature* **1996**, 384, 644.
65. Loll, P. J., Picot, D., Ekabo, O. & Garavito, R. M.; *Biochem.* **1996**, 35, 7330-7340.
66. Mancini, J. A., Vickers P. J., O'Neill, G.P., Boily, C., Falguyret, J. P. & Riendeau, D.; *Mol. Pharm.* **1997**, 51, 52.
67. De Witt D. L., El-Harith, E. A., Kraemer, S. A., Andrews, M. J., Yao, E. F., Armstrong, R. L. & Smith, W. L.; *J. Biol. Chem.* **1990**, 5192.
68. Wong, E., Bayly, C., Waterman, H. L., Riendeau, D. & Mancini, J. P.; *J. Biol. Chem.* **1997**, 272, 9280.
69. Guo, Q., Wang, L., Ruan, K. & Kulmacz, R.; *J. Biol. Chem.* **1996**, 271, 19134.
70. Harris, E. D.; *N. Engl. J. Med.* **1990**, 322, 1277.
71. Englhardt, G.; Bögel, R.; Schnitzer, C. & Utzmann, R.; *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 51, 21.
72. Englhardt, G.; Bögel, R.; Schnitzer, C. & Utzmann, R.; *Biochem. Pharmacol.* **1996**, 51, 29.
73. Lazer, E. S.; Miao, C. K.; Cywin, C. L.; Sorcek, R.; Wong, H.; Meng, Z.; Potocki, I.; Hoermann, M.; Snow, R. J.; Tschanz, M. A.; Kelly, T. A.; McNeil, D. W.; Coutts, S. J.; Churchill, L.; Graham, A. G.; David, E.; Grob, P. M.; Engel, W.; Meier, H. & Trummlitz, G.; *J. Med. Chem.* **1997**, 40, 980.
74. a) Lages, A. S.; Fraga, C. A. M. & Barreiro, E. J.; *Resumos da 19a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química* **1996**, QO-108; b) Lages, A. S.; Silva, K. C. M.; Parrini, S. C.; Miranda, A. L. P.; Fraga, C. A. M. & Barreiro, E. J.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química* **1997**, SA-17; c) Silva, K. C. M.; Parrini, S. C.; Leda, P. H. O.; Lages, A. S.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J. & Miranda, A. L. P.; *Resumos da XII Reunião Anual das Federações de Sociedades de Biologia Experimental* **1997**, 14.068.
75. Teixeira, L. H. P.; Barreiro, E. J. & Fraga, C. A. M.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química* **1997**, QO-020.
76. Nelilma, C. R.; de Alencastro, R. B. & Barreiro, E. J.; *Resumos da 20a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química* **1997**, SA-16.
77. Para um exemplo recente, veja: Lages, A. S.; Silva, K. C. M.; Miranda, A. L. P.; Fraga, C. A. M.; Barreiro, E. J.; *Bioorg. Med. Chem. Letters* **1998**, 8, 183.
78. Di Marco, S., Priestle, J. P., Grüter, M. G., Wennogle, L. P. & Boyar, W.; *Acta Cryst.* **1997**, D53, 224.