

# Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos \*

## Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor Analgesics: Therapeutic Advances

Wilson Andrade Carvalho <sup>1</sup>; Rosemary Duarte Sales Carvalho <sup>2</sup>; Fabrício Rios-Santos <sup>3</sup>

### RESUMO

Carvalho WA, Carvalho RDS, Rios-Santos F - Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos

**JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS:** Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINE) estão entre as drogas mais prescritas e usadas no mundo, incluindo a utilização em Anestesiologia. O propósito desta revisão é discutir alguns aspectos atuais da bioquímica da ciclooxygenase, que vem servindo de base para o desenvolvimento dos novos AINE.

**CONTEÚDO:** Estas drogas exercem suas ações principalmente através da inibição da ciclooxygenase (COX), a enzima chave que catalisa a conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas e tromboxanos. Pelo menos duas isoformas da COX já foram identificadas, a COX-1, que é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos, e a COX-2, que é uma forma induzível da enzima localizada principalmente nas células e tecidos envolvidos em processos inflamatórios. Com a descoberta da COX-2 e a determinação de sua estrutura, foi possível desenvolver drogas mais seletivas que reduzem a inflamação sem afetar a COX-1, protetora do estômago e rins, dando origem a uma nova geração de compostos antiinflamatórios denominados de inibidores específicos da COX-2.

**CONCLUSÕES:** Embora estes compostos de última geração apresentem menor toxicidade para o trato gastrointestinal, outros efeitos adversos graves têm sido observados, incluindo insuficiência renal e efeitos cardiovasculares, como o infarto agudo do miocárdio e a trombose. Apesar destes efeitos colaterais, estes novos fármacos estão sendo testados em outras condições clínicas, principalmente no tratamento preventivo do câncer e da doença de Alzheimer.

**Unitermos:** ANTIINFLAMATÓRIOS: inibidores da COX-2; DOR, Crônica: câncer

### SUMMARY

Carvalho WA, Carvalho RDS, Rios-Santos F - Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor Analgesics: Therapeutic Advances

**BACKGROUND AND OBJECTIVES:** Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) are among the most widely prescribed drugs, including for Anesthesiology. This review aimed at discussing some current cyclooxygenase biochemical aspects, which have provided the basis for the development of new analgesic and anti-inflammatory drugs.

**CONTENTS:** These drugs primarily act by inhibiting cyclooxygenase (COX), which is the key-enzyme catalyzing the conversion of arachidonic acid into prostaglandins and thromboxane. At least two COX isoforms have already been identified: COX-1, which is constitutively expressed in most tissues, and the inducible enzyme COX-2, which is primarily found in inflammatory cells and tissues. The discovery of COX-2 has enabled the development of more selective drugs to decrease inflammation without affecting COX-1 that protects stomach and kidneys and giving origin to a new generation of anti-inflammatory compounds called specific COX-2 inhibitors.

**CONCLUSIONS:** Although there is significantly lower gastrointestinal toxicity in patients treated with selective COX-2 inhibitors, other severe adverse effects have been observed, including renal failure and cardiovascular effects, such as myocardial infarction acute and thrombosis. Despite these potential side effects, these new drugs are being tested in different clinical conditions, especially in cancer prevention and Alzheimer's disease.

**Key Words:** ANTI-INFLAMMATORY: COX-2 inhibitors; PAIN, Chronic: cancer

### INTRODUÇÃO

Desde 1893, quando o químico alemão Felix Hoffman motivou a Bayer a produzir o ácido acetilsalicílico, patenteado como a Aspirina, os agentes antiinflamatórios não esteroidais (AINE) passaram a ser as drogas mais largamente prescritas e usadas em todo o mundo. Estima-se que, somente nos Estados Unidos, aproximadamente 50 milhões de pessoas aplicam em torno de 5 a 10 bilhões de dólares por ano no consumo destas drogas <sup>1</sup>. Contudo, apesar do largo uso desses agentes, o seu mecanismo de ação somente foi esclarecido em 1971, quando John Vane <sup>2</sup>, laureado com o Prêmio Nobel pela sua descoberta, propôs que os antiinflamatórios semelhantes à aspirina suprimem o processo inflamatório pela inibição da ciclooxygenase (COX), impedindo assim a síntese de prostaglandinas. A COX, enzima chave que catalisa a biossíntese das prostaglandinas, também conhecida como Prostaglandina Sintetase ou Prostaglandina Endoperóxido Sintetase, foi isolada em 1976 e clonada em 1988. Em 1991 foi identificado um gene que codificava uma segunda isoforma da enzima, então deno-

\* Recebido do (Received from) Hospital São Rafael, Faculdade de Farmácia da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e no Departamento de Saúde da Universidade Estadual de Santa Cruz (UESC)

1. Professor Titular de Farmacologia da UESC e Professor Adjunto da UFBA, Anestesiologista do Hospital São Rafael  
2. Professora de Farmacologia da Faculdade de Farmácia da UFBA  
3. Professor Assistente de Farmacologia do Departamento de Saúde/FMUESC

Apresentado (Submitted) em 05 de maio de 2003  
Aceito (Accepted) para publicação em 01 de setembro de 2003

Endereço para correspondência (Correspondence to)  
Dr. Wilson Andrade Carvalho  
Hospital São Rafael  
Av. São Rafael, 2152, São Marcos  
41256-900 - Salvador, BA  
E-mail: laborat@hrs.com.br

© Sociedade Brasileira de Anestesiologia, 2004

minada de ciclooxigenase-2. Sabe-se, atualmente, que dois genes expressam duas isoformas distintas bastante similares da enzima: a ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2). As duas isoformas têm estrutura protéica primária similar e catalisam essencialmente a mesma reação<sup>3-8</sup>. Com a descoberta da COX-2, isoforma induzida e expressa predominantemente durante o processo inflamatório, uma nova perspectiva terapêutica emergiu para o desenvolvimento de drogas mais seletivas e com menores efeitos adversos. O conjunto desses agentes originou uma nova geração de anti-inflamatórios (inibidores seletivos da COX-2), denominados de Coxibes<sup>9,10</sup>. Mais recentemente, novas motivações para o uso clínico e para a pesquisa foram encontradas com a descrição de uma terceira variante da ciclooxigenase denominada de COX-3<sup>11</sup>.

**BIOQUÍMICA DA CICLOOXIGENASE E SÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS**

Os compostos da família das prostaglandinas e dos leucotrienos são denominados de eicosanóides, em virtude de serem derivados de ácidos graxos essenciais de vinte carbonos esterificados em fosfolipídios da membrana celular. A síntese dos eicosanóides pode ser desencadeada por diversos estímulos que ativam receptores de membrana, acoplados a uma proteína regulatória ligada a um nucleotídeo guanínico (proteína G), resultando na ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> ou elevação da concentração intracelular do Ca<sup>2+</sup>. A fosfolipase A<sub>2</sub> hidrolisa fosfolipídios da membrana, particularmente fos-

fatidilcolina e fosfatidiletanolamina, liberando o ácido araquidônico<sup>10-14</sup>.

O ácido araquidônico liberado servirá como substrato para duas vias enzimáticas distintas: a via das ciclooxigenases, que desencadeia a biossíntese das prostaglandinas e dos tromboxanos, e a via das lipoxigenases, responsável pela síntese dos leucotrienos, lipoxinas e outros compostos<sup>15-18</sup> (Figura 1).

A existência de uma isoforma induzível da COX foi inicialmente descrita por Needleman e seu grupo, os quais demonstraram a sua indução por estímulos inflamatórios e por citocinas<sup>19</sup>. Passou-se então a admitir, em virtude das características distintas de sua expressão, a existência das isoformas COX-1 e COX-2<sup>5,19-21</sup>. A COX-1 foi a primeira a ser caracterizada e é expressa constitutivamente, ou seja, está presente nas células em condições fisiológicas, principalmente nos vasos sanguíneos, plaquetas, estômago e rins. A COX-2 pode ser induzida na presença de citocinas (interleucina-1, interleucina-2 e do fator  $\alpha$  de necrose tumoral), ésteres do forbol, fatores de crescimento e endotoxinas, sendo expressa caracteristicamente por células envolvidas no processo inflamatório, como macrófagos, monócitos e sinoviócitos. Por outro lado, a expressão da COX-2 pode ser inibida por glicocorticóides, interleucina-4, interleucina-13 e interleucina-10, enquanto que a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) promove regulação crescente (*up-regulation*) na expressão da COX-2<sup>4,5,9,22-25</sup>. A COX-2 pode também ser regulada de modo pós-transcricional. Perda da regulação pós-transcricional da COX-2, pela mutação de proteínas que interagem especificamente em determina-

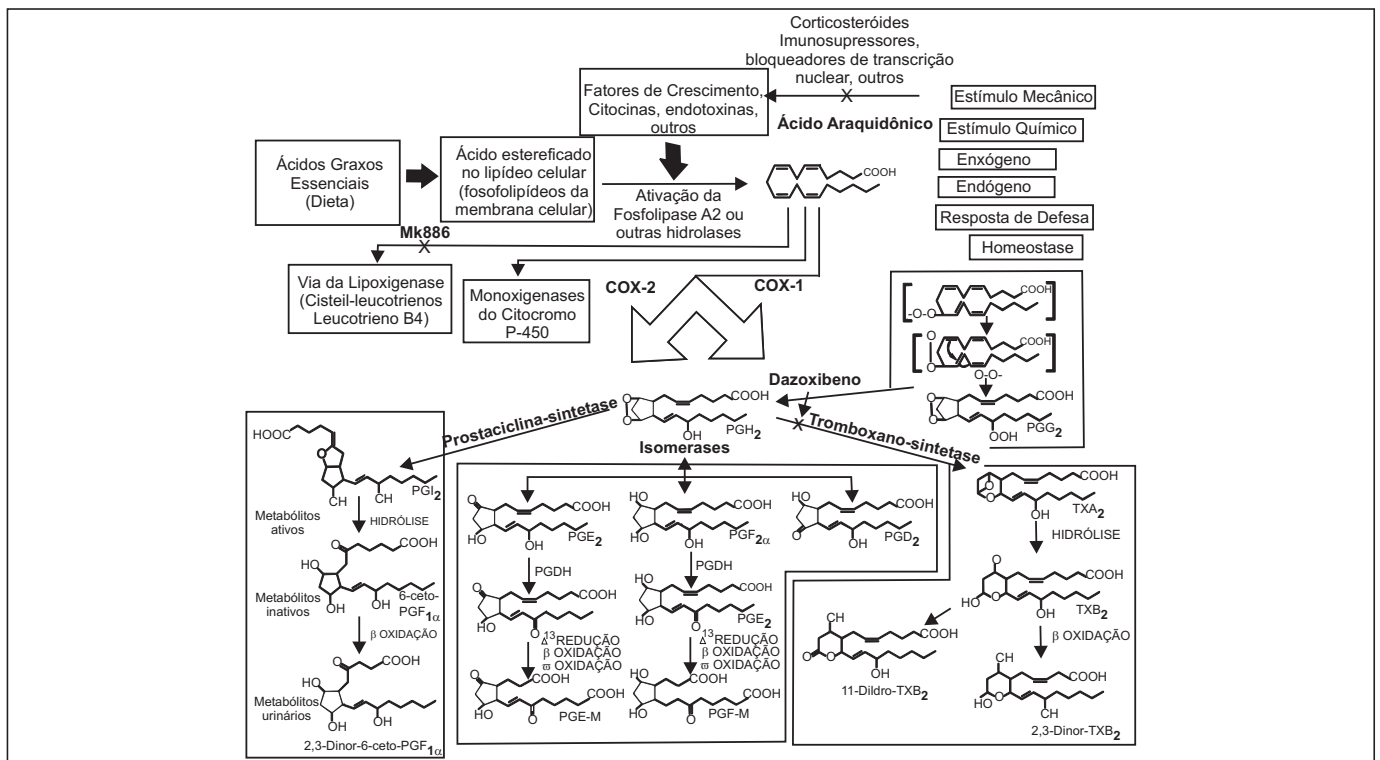


Figura 1 - Biossíntese das Prostaglandinas (Adaptado de Vane e col. 1998)

dos elementos do RNA mensageiro da enzima, pode resultar em elevação na expressão da COX-2, cujo mecanismo tem sido proposto como fator crucial envolvido na carcinogênese de intestino<sup>26</sup> (Figura 2).

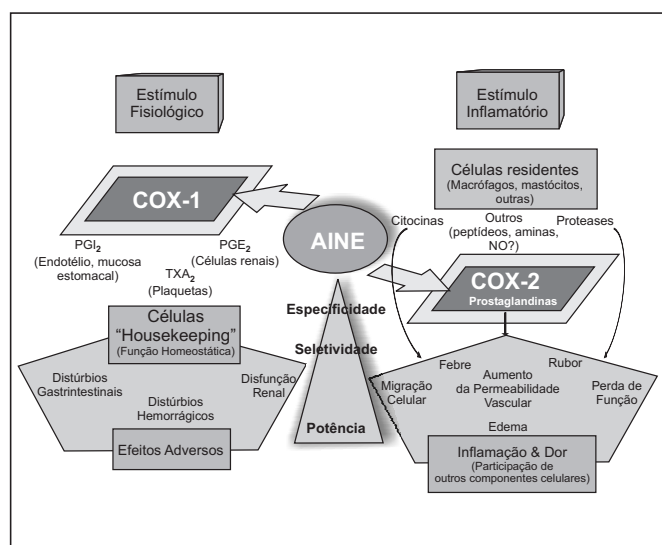


Figura 2 - Ciclooxigenase na Homeostase e Inflamação

A COX-1 apresenta importante papel para a manutenção das funções fisiológicas normais (housekeeping). Por outro lado, mediadores pró-inflamatórios induzem a expressão da COX-2 em diferentes tipos celulares, como células residentes e de defesa. A liberação de PG amplifica o processo inflamatório juntamente com as proteases e outros mediadores presentes. O uso racional dos AINE deve ser orientado segundo o perfil clínico do indivíduo, assim como as características inibitórias de cada agente. A busca de inibidores específicos da COX-2 permanece, sem a perda da sua potência antiinflamatória e analgésica, uma das principais áreas de interesse para a Anestesiologia

A COX-1 e a COX-2 são proteínas integrais que se localizam dentro do folheto interno da bicamada lipídica de fosfolípidios da membrana. O número de aminoácidos que compõe as duas isoenzimas é bastante semelhante, variando de 599 aminoácidos para a COX-1 e de 604 aminoácidos para a COX-2<sup>24</sup>. A estrutura das ciclooxigenases consiste de três domínios distintos: um domínio amino terminal semelhante ao fator de crescimento epidérmico (EGF), seguido por domínio de ligação da membrana e domínio catalítico carboxílico terminal, que contém os locais ativos de atividade ciclooxigenase e peroxidase. O exame estrutural da COX revela diferenças na região peptídica sinalizante amino-terminal e na cadeia peptídica carboxílica terminal, mas de importância desconhecida. A COX-1 contém uma seqüência de 17 aminoácidos em sua cadeia peptídica amino-terminal, que não está presente na COX-2, enquanto a COX-2 tem uma inserção adicional de 18 aminoácidos em sua terminação carboxila. A seqüência remanescente do núcleo da COX-1 e COX-2, entretanto, é cerca de 75% idêntica e todos os resíduos identificados como essenciais para a atividade catalítica são conservados<sup>4,6,26-28</sup>.

As ciclooxigenases possuem duas atividades distintas. Uma atividade de endoperóxido redutase que oxida e cicliza o ácido graxo precursor não-esterificado, para formar o endoperóxido cíclico PGG (prostaglandina G), e uma outra atividade peroxidase que converte o PGG em prostaglandina H (PGH). O local ativo com atividade de ciclooxigenase está localizado em um longo canal hidrofóbico formado no centro de  $\alpha$ -hélices associadas à membrana, permitindo que o ácido araquidônico tenha acesso diretamente ao local ativo sem deixar a membrana. A função de peroxidase está localizada do outro lado da enzima, sendo semelhante em ambas as isoformas enzimáticas. A síntese das prostaglandinas inicia-se, portanto, com a atividade da ciclooxigenase catalisando a adição do oxigênio molecular ao ácido araquidônico, para formar, inicialmente, o endoperóxido intermediário prostaglandina G<sub>2</sub> (PGG). A mesma enzima, por sua atividade peroxidase, catalisa a redução desta prostaglandina para formar a PGH<sub>2</sub>. As PGG e PGH apresentam pouca atividade e servem como substrato para a formação de diferentes prostaglandinas e tromboxanos ativos, incluindo PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e tromboxanos (TX) (Figura 1)<sup>3,6,8,24,27,29</sup>.

Embora notáveis diferenças tenham sido observadas na estrutura e regulação dos genes da COX no DNA e RNA, a estrutura da proteína e a função enzimática são significativamente similares. As isoformas COX-1 e COX-2 apresentam homologia genética de cerca de 60% em suas regiões codificantes, e seus genes estão localizados nos cromossomos 9 e 1, respectivamente<sup>7,8,24</sup>.

As prostaglandinas formadas a partir da ação das ciclooxigenases ligam-se a receptores prostanoídes que se encontram localizados na membrana celular, acoplados à proteína G. A ativação da proteína G resulta na estimulação de sistemas efetores responsáveis pela liberação de segundos mensageiros em diversos tecidos. Estes receptores já foram clonados e estão organizados em cinco grupos de acordo com a PG com os quais eles apresentam maior afinidade, designados de DP (PGD<sub>2</sub>), FP (PGF<sub>2</sub>), IP (PGI<sub>2</sub>), TP (PXA<sub>2</sub>) e EP (PGE<sub>2</sub>). Embora a maioria dos receptores das prostaglandinas seja receptores de superfície da membrana celular, constituindo a superfamília de receptores acoplados à proteína G, alguns podem estar localizados na membrana nuclear, cujos ligantes atuam como fatores de transcrição, alterando a expressão gênica celular. Mais recentemente, foi demonstrado que determinados eicosanóides, incluindo a PGI<sub>2</sub>, prostaglandinas da série J, 15desoxi- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (d15-PGJ<sub>2</sub>) e leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), são ligantes endógenos de uma família de receptores nucleares denominada de receptores ativadores de proliferação do peroxissomo (PPARs - *Peroxisome Proliferator-Activated Receptors*), que regulam o metabolismo lipídico, a diferenciação e proliferação celular. São conhecidos atualmente três isoformas do receptor PPAR, denominadas de  $\alpha$ ,  $\delta$  e  $\gamma$ <sup>13,30,31</sup>.

Pelo menos dois sistemas efetores que atuam via a liberação de segundos mensageiros vêm sendo associados à ação das prostaglandinas. Um deles é o da adenilato ciclase, cuja ativação estimula a síntese de adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMP cíclico). As PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> ativam a adeni-

lato ciclase, aumentando a concentração de AMP cíclico, enquanto  $\text{TxA}_2$  reduz esta atividade. Outro sistema efetor é o da fosfolipase C, que quando ativada pelas prostaglandinas aumenta a formação de diacilglicerol e 1,4,5-trifosfato de inositol, resultando na ativação em cascata de proteínas quinases e elevação do  $\text{Ca}^{++}$  intracelular<sup>13,14,32,33</sup>.

### EXISTE UMA COX-3?

A expressão de uma terceira variante catalítica da COX (COX-3) foi demonstrada em estudos *in vitro* com linhagens de macrófagos<sup>11,34,35</sup>. A singularidade é que a expressão desta variante não originaria prostaglandinas pró-inflamatórias, mas um membro da família das ciclopentanonas, a 15desoxe- $\Delta^{12-14}$  PGJ<sub>2</sub>, agonista dos receptores ativadores de proliferação do peroxissomo (PPARs), com atividade anti-inflamatória<sup>34-40</sup>. Se a hipótese de uma terceira ciclooxigenase com atividade anti-inflamatória estiver correta, a sua expressão pode resultar em períodos típicos de remissão do processo inflamatório, como tem sido constatado em algumas doenças crônicas, como a artrite reumática.

A COX-3, possivelmente uma variante da COX-1 (pois é derivada do mesmo gene dessa isorforma), encontra-se distribuída principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração, sendo mais sensível ao acetaminofeno (paracetamol) do que a COX-1 e COX-2. Postulou-se que a inibição da COX-3 poderia representar o mecanismo central primário pelo qual as drogas analgésicas e antipiréticas do tipo AINE desenvolveriam suas atividades de redução da dor e da febre<sup>11</sup>.

### FUNÇÕES FISIOLÓGICAS E PATOLÓGICAS DAS CICLOOXIGENASES

As prostaglandinas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo, por exemplo, vasodilatação ou vasoconstrição; contração ou relaxamento da musculatura brônquica ou uterina; hipotensão; ovulação; metabolismo ósseo; aumento do fluxo sanguíneo renal (resultando em diurese, natriurese, caliuressa e estimulação da secreção de renina); proteção da mucosa gástrica e regulação do fluxo sanguíneo local; inibição da secreção ácida gástrica; crescimento e desenvolvimento nervoso; resposta imunológica; hiperalgesia; regulação da atividade quimiotóxica celular; resposta endócrina; angiogênese; progressão metastásica, dentre outras<sup>10,14,17,18,40-46</sup>.

Na maioria dos leitos vasculares as prostaglandinas da família E (PGEs) são potentes vasodilatadores. A atividade vasodilatadora envolve principalmente arteríolas, esfíncteres pré-capilares e vênulas pós-capilares. A PGD<sub>2</sub> causa geralmente vasodilatação na vasculatura mesentérica, coronariana e renal, e vasoconstrição na circulação pulmonar. A PGI<sub>2</sub> é um eficiente vasodilatador, podendo causar importante hipotensão arterial, enquanto o  $\text{TXA}_2$  apresenta potente atividade vasoconstritora. No sangue, as prostaglandinas modulam também a função plaquetária. A PGE<sub>1</sub>, PGD<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub> são inibidoras da agregação de plaquetas, ao passo que o trombo-

xano A<sub>2</sub> é forte indutor da sua agregação. A PGI<sub>2</sub> é sintetizada pelo endotélio vascular, controlando a adesão de células ao endotélio e a agregação plaquetária, contribuindo como mecanismo antitrombogênico da parede vascular intacta<sup>44</sup>.

As PGEs e as PGI<sub>2</sub> inibem a secreção ácida gástrica estimulada pela alimentação, histamina ou gastrina e reduzem o volume de secreção, a acidez e o conteúdo de pepsina. As prostaglandinas são vasodilatadoras na mucosa gástrica e parece que estão envolvidas na regulação do fluxo sanguíneo local. A secreção de muco no estômago e intestino delgado é aumentada pelas PGEs. Estes efeitos ajudam a manter a integridade da mucosa gástrica, conferem proteção às células epiteliais e são referidos como propriedades citoprotetoras das prostaglandinas sintetizadas pela COX-1. De fato, os efeitos adversos gastrintestinais dos AINE estão associados à supressão da expressão constitutiva da COX-1, resultando em lesão gástrica, hemorragia e ulceração<sup>13,45,47</sup>.

As prostaglandinas também influenciam a distribuição do fluxo sanguíneo renal, reabsorção de sódio e água e liberação de renina. A PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> e PGD<sub>2</sub> determinam secreção de renina no córtex renal, provavelmente por efeito direto nas células justaglomerulares. A COX-2 tem sido localizada na vasculatura renal, na mácula densa cortical, nas células intersticiais dos rins, no ducto coletor e na porção delgada da alça de Henle, apresentando aumento da sua expressão em determinadas áreas, com a progressão da idade<sup>7,9,13,14,45</sup>.

As prostaglandinas e os leucotrienos quando liberados exercem também papel fundamental na gênese dos sinais e sintomas do processo inflamatório<sup>10,15,16,17,22</sup>. Ferreira (1979)<sup>42</sup> constatou que a administração intradérmica de prostaglandina produzia hiperalgesia. Foi demonstrado que a PGE e a PGI<sub>2</sub> hipersensibilizam os nociceptores polimodais das fibras C a estímulos mecânicos e químicos<sup>17,18,42,43</sup>.

Tem sido demonstrado que as prostaglandinas são produzidas em neurônios e vasos do SNC com importante participação em diversas funções centrais, incluindo o controle do ciclo do sono e do despertar, a termogênese febril e a transmissão nociceptiva. As prostaglandinas e citocinas (interleucina-6) encontram-se também implicadas na fisiopatologia de algumas doenças degenerativas encefálicas, como a esclerose múltipla, demência associada à síndrome de imunodeficiência adquirida (aids) e na doença de Alzheimer<sup>6,8,24,27,48</sup>.

Sabe-se que os lipopolissacarídeos (LPS) e as citocinas podem promover a indução de COX-2 em várias regiões do encéfalo e que a COX-1 é constitutivamente expressa em diversos neurônios. A COX-1 é distribuída prevalentemente no prosencéfalo, onde as prostaglandinas podem estar envolvidas em funções de integração, como modulação do sistema nervoso autônomo e de vias sensoriais de transmissão. De maneira interessante, a COX-2 é expressa constitutivamente em algumas regiões do encéfalo, destacando-se principalmente córtex, hipocampo, complexo amígdala-hipocampo (importante para a memória e comportamento), hipotálamo e medula espinhal. Dentre os circuitos neurais, a via regulatória da resposta febril é a melhor compreendida. A liberação de interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), a partir do estímulo de pirógenos, promove a síntese central de PGE<sub>2</sub> e esta, por sua vez, ativa

o centro termorregulador situado na área pré-óptica do hipotálamo anterior, desencadeando a febre<sup>6,49-51</sup>. Uma vez que o olho origina-se ontogeneticamente do neuroepitélio e compartilha de muitas das características do SNC, tem despertado o interesse dos investigadores para o estudo da distribuição da COX-2 neste órgão. A investigação da utilização das prostaglandinas no tratamento do glaucoma de ângulo aberto primário propiciou a constatação de que a expressão da COX-2 é completamente reduzida no epitélio secretório não-pigmentado do corpo ciliar de pacientes portadores desta doença, permanecendo inalterada em outras partes do olho<sup>26</sup>.

#### INIBIDORES ESPECÍFICOS DA CICLOOXIGENASE-2

Desde 1844 quando foi isolado o ácido salicílico do óleo de gaultéria, por Cahours, passando pela introdução do ácido acetilsalicílico na clínica em 1899 por Dreser, que a pesquisa de novos AINE continua em franco desenvolvimento, contando atualmente com grande número de compostos comercializados em diversos países do mundo<sup>14</sup> (Quadro I). Embora os primeiros antiinflamatórios, como os salicilatos, sejam bastante eficazes como analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios, o uso destes compostos por períodos mais prolongados é limitado, na grande maioria dos pacientes, por desenvolverem efeitos gastrintestinais bastante desagradáveis, como dispepsia, dor abdominal, sangramento, úlcera e perfuração gástrica ou duodenal. Os efeitos colaterais gastrintestinais foram atribuídos à baixa especificidade de inibição destes compostos sobre a COX-2<sup>8,9,18,28</sup>.

A seletividade para a COX-2 tem sido avaliada principalmente com a utilização de ensaios *in vitro*, em virtude da simplicidade e rapidez destes testes. Diversos sistemas têm sido testados com este objetivo, incluindo ensaios com enzima recombinante humana, culturas de células e sangue total. Nos ensaios com sangue total, a síntese de tromboxano de plaquetas durante a formação do coágulo é usada como índice de atividade da COX-1, enquanto a síntese de PGE<sub>2</sub> (principalmente por monócitos) em sangue total exposto ao lipopolissacarídeo é utilizada como índice de atividade de COX-2. A maioria destes ensaios determina a concentração inibitória 50% (IC<sub>50</sub>), que representa a concentração da droga que, sob condições controladas, inibe 50% da atividade da COX. Para a avaliação dos AINE é utilizado um índice de especificidade relativa entre as isoformas da COX, expresso como o índice IC<sub>50</sub> para COX-2/COX-1. De acordo com este critério, quanto menor o valor do quociente relativo ou razão de COX-2/COX-1, maior será a seletividade da droga sobre a COX-2. Estes índices de proporcionalidade de inibição das duas isoformas são usados para comparar a potência das drogas e teoricamente deveriam também estar correlacionados com a predisposição clínica aos efeitos adversos gastrintestinais. Entretanto, a utilização destes testes *in vitro* não apresenta resultados muito reprodutíveis, provavelmente refletindo diferenças no tipo de teste utilizado. Em adição, o valor de IC<sub>50</sub> não necessariamente reflete a complexidade da interação droga-enzima e a quantidade real de inibi-

ção *in vivo* e, desta forma, não deve ser utilizado como medida da eficácia clínica. Na tabela I podemos observar a atividade inibitória de diversos AINE<sup>28</sup>.

#### Quadro I - Classificação dos Antiinflamatórios Não-Estereoidais (AINE)

##### Inibidores Não Específicos da COX

Derivados do Ácido Salicílico (salicilatos)

Ácido Acetilsalicílico (Aspirina), Salicilato de Sódio, Salicilato de Metila, Diflunisal, Flunfenisal, Sufasalazina, Olsalazina.

Derivados Pirazolônicos

Antipirina, Aminopirina, Dipirona, Fenilbutazona, Apazona, Sulfimpirazona.

Derivados do Para-aminofenol

Acetaminofeno (paracetamol)

Derivados do Ácido Indolacético e Ácido Indenoacético

Indometacina, Sulindaco

Derivados do Ácido N-fenilntranílico (fenamatos)

Ácido Mefenâmico, Ácido Meclofenâmico, Ácido Flufenâmico, Ácido Tolfenâmico, Ácido Etofenâmico.

Derivados do Ácido Heteroarilacético

Tolmetino, Cetoralaco, Etodalaco

Derivados do Ácido Fenilacético

Diclofenaco de Sódio

Derivados do Ácido Arilpropiónico

Ibuprofeno, Naproxeno, Flurbiprofeno, Cetoprofeno, Fenoprofeno, Oxaprozino, Indoprofeno, Ácido Tiaprofênico.

Derivado do Ácido Enólico (Oxicam)

Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam, Sudoxicam, Isoxicam, Ampiroxicam, Droxicam, Lornoxicam, Cinoxicam.

Alcanonas

Nabumetona, Proquazona

Derivados do Ácido Carbâmico

Flupirtina

##### Inibidores Específicos da COX-2

Derivado da Fenoximetanossulfanilida

Nimesulida

Derivado do Ácido Indolacético

Etodalaco

Derivado Furanona Diarilsubstituído

Rofecoxibe

Derivado Pirazol Diarilsubstituído

Celecoxibe

Outros Coxibes

Valdecoxibe, Etoricoxibe

Tabela I - Especificidade dos Antiinflamatórios Não-Esteroidais (AINE)

Droga	IC50 COX-1 (µM)	IC50 COX-2 (µM)	IC50 COX-2/COX-1
<b>Inibidores não Específicos da COX-2</b>			
Aspirina	1,67	278	166
Ácido Mefenâmico	0,15	0,28	1,87
Cetoprofeno	0,006	0,119	19,8
Cetorolaco	0,32	0,88	2,75
Diclofenaco Sódio	1,57	1,1	0,70
Fenoprofeno	2,73	4,03	1,47
Flurbiprofeno	0,59	3,46	5,90
Indometacina	0,028	1,68	60
Ibuprofeno	4,88	22,4	4,60
Nabumetona	278	187	0,67
Naproxeno	11	52,3	4,6
Oxaprozino	14,6	36,7	2,51
Piroxicam	0,0005	0,3	600
Tenoxicam	23,0	14,2	0,62
Tolmetino	1,23	7,09	5,76
<b>Inibidores Específicos da COX-2</b>			
Celecoxibe	15	0,04	0,003
Cetorolaco	0,083	0,012	0,14
DFU	50,0	0,04	< 0,001
Etodalaco	34,0	3,4	0,10
L-745337	369	1,5	0,004
Meloxicam	4,8	0,43	0,09
Nimesulide	9,2	0,52	0,06
NS-398	16,8	0,10	0,006
Rofecoxibe	26,3	0,34	0,01
SC-58125	38,7	0,27	0,007

IC<sub>50</sub> = Concentração Inibitória 50%

A avaliação clínica da especificidade destes compostos baseia-se no emprego de técnicas que permitem observar a toxicidade clínica, como, por exemplo, a endoscopia para visualização de úlceras gastroduodenais, ou na observação de efeitos terapêuticos de doses antiinflamatórias do agente. É importante considerar, entretanto, que diversos fatores determinam a resposta clínica de um inibidor da COX-2, incluindo, entre os mais relevantes, a variabilidade genética da proteína alvo ou de enzimas metabolizadoras, a interação entre drogas e as características do paciente, que podem influenciar, seja a eficácia, sejam os efeitos adversos, durante o ensaio clínico<sup>8,9,21,28</sup>.

A aspirina promove inibição irreversível da atividade da ciclooxigenase pela ligação covalente com uma molécula de serina do local ativo. Na estrutura da COX-1, a aspirina aceti-

la a serina na posição 530, prevenindo a ligação do ácido araquidônico ao local ativo da enzima. Na COX-2, a aspirina acetila uma molécula de serina na posição 516. Embora a aspirina não deva ser recomendada como droga de primeira escolha para o tratamento de processos inflamatórios crônicos, como o reumatismo e artrite, devido a sua potente ação inibitória sobre a COX-1, constitui importante alternativa para o tratamento profilático de doenças de elevado risco tromboembólico, como o infarto do miocárdio, beneficiando-se, nestes casos, do mecanismo anti-COX-1 pela prevenção da agregação plaquetária. Este efeito irreversível da aspirina é particularmente importante em Anestesiologia, quando os pacientes em uso crônico da droga apresentam maior risco de sangramento no intra e pós-operatório. Como a inibição da ciclooxigenase plaquetária dá-se durante toda a vida da plaqueta, que corresponde de 8 a 10 dias, recomenda-se aos pacientes suspender o uso da droga pelo menos uma semana antes do evento cirúrgico, a menos que o risco-benefício justifique o contrário<sup>13,14,18</sup>.

Outros AINE como o mefenamato, diclofenaco e ibuprofeno agem como inibidores competitivos reversíveis de ambas as isoformas, competindo com a ligação do ácido araquidônico no local ativo da COX. Uma terceira classe de AINE, representados pelo flurbiprofeno e indometacina, causa inibição reversível lenta e tempo-dependente da COX-1 e COX-2, resultado da formação de uma ponte salina entre o carboxilato da droga e a arginina na posição 120 do local ativo, seguida por alterações de conformação<sup>26</sup>.

A primeira geração propriamente dita dos inibidores específicos da COX-2 é representada pelo nimesulide, etodalaco e meloxicam. A descoberta da especificidade destes produtos foi na realidade constatada após a comercialização, sendo decorrente, principalmente, de observações clínicas e experimentais da reduzida incidência de efeitos colaterais gastrintestinais, sendo posteriormente constatada por estudos *in vitro*. O nimesulide é considerado exemplo aberrante dos AINE, com boa potência *in vivo* em modelos inflamatórios, mas com fraca inibição *in vitro* de preparações da COX. O nimesulide, além de exibir especificidade de ação sobre a COX-2, apresenta adicionalmente outros efeitos que intensificam sua atividade antiinflamatória, como a inibição da ativação de neutrófilos e propriedades antioxidantes. Baseando-se em estudos *in vitro*, inicialmente sugeriu-se que o meloxicam inibia seletivamente a COX-2. No entanto, quando testado *in vivo* em seres humanos, sua especificidade para a COX-2 foi somente cerca de dez vezes maior do que aquela para a COX-1, apresentando ainda inibição plaquetária<sup>52</sup>. A modificação molecular destes produtos, notadamente do nimesulide, visando o aumento de sua seletividade sobre a COX-2, originou estruturas sem um grupamento carboxílico e com a presença de grupos sulfonamida ou de sulfona, originando os chamados inibidores específicos de segunda geração. Este grupo inclui o celecoxibe, rofecoxibe, valdecoxibe, parecoxibe (pró-droga do valdecoxibe), APHS [*o*-(*acetoxifenyl*)hept-2-ynyl sulfide] e etoricoxibe<sup>8</sup> (Quadro I, Tabela I e Figura 3).

A utilização relativamente recente da técnica de cristalografia de raios X tem permitido a elucidação gradativa do meca-

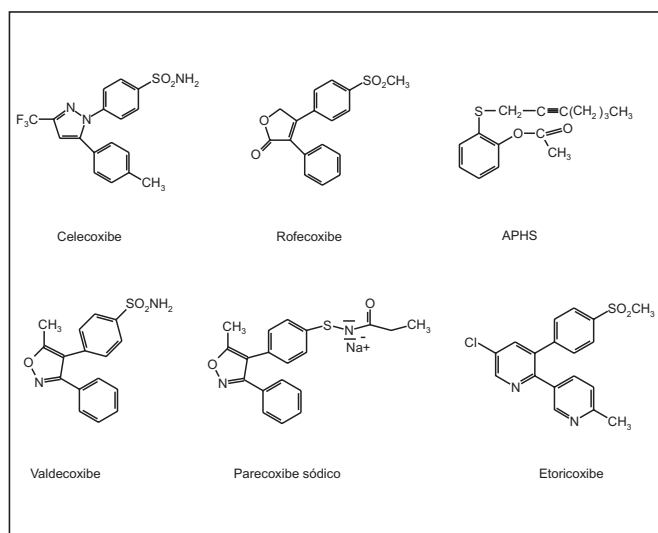


Figura 3 - Estrutura Química dos Inibidores da COX-2

nismo de ação pelo qual os AINE inibem a ciclooxigenase. Picot e col. (1994)<sup>53</sup>, utilizando esta técnica, reportaram a estrutura tridimensional da COX-1, iniciando um novo entendimento das ações terapêuticas dos inibidores da COX. O conhecimento das estruturas da COX-1 e da COX-2 e de seus locais ativos, constituem a base fundamental para o desenvolvimento de inibidores mais específicos para a COX-2 e para a elaboração de estudos de relação estrutura-atividade destes produtos. Durante a atividade enzimática, o ácido araquidônico liga-se a uma arginina na posição 120 e a uma serina na posição 530. Uma transferência de elétrons da tirosina na posição 385 para um heme oxidado, que também está ligado dentro da enzima, inicia a reação de ciclooxigenase. Diversos estudos tentam elucidar como e onde os AINE agem na ciclooxigenase para bloquear a síntese de prostaglandinas. Dentro do canal hidrofóbico da COX, uma diferença de aminoácido na posição 523 (isoleucina na COX-1 e valina na COX-2) pode ser de importância crítica na seletividade de diversas drogas<sup>19,24,28,29</sup>.

No estágio atual do conhecimento, no qual os locais de ligação para os inibidores específicos na COX-2 já foram descritos, e a estrutura protéica tridimensional da enzima encontra-se claramente estabelecida, a utilização de técnicas modernas de modelagem molecular deverá ser capaz de criar novos compostos de elevada afinidade e especificidade, mas provavelmente, sem a presença dos grupos sulfonamida e sulfona dos compostos de segunda geração vistos anteriormente. O composto RS57067000 pode-se constituir em um dos primeiros desta classe de inibidores realmente específicos da COX-2, representando assim, o nascimento de uma terceira geração dos inibidores específicos da COX-2<sup>6,27</sup>.

#### NOVAS APLICAÇÕES DOS INIBIDORES ESPECÍFICOS DA CICLOOXIGENASE-2

As células cerebrais humanas são capazes de iniciar e amplificar resposta inflamatória cerebral característica, envolven-

do a síntese de citocinas, proteínas da fase aguda, ativação do complemento, liberação de prostaglandinas e de radicais de oxigênio. Na doença de Alzheimer todos os sinais de inflamação da microglia e ativação da astrogliia com deposição de proteína amilóide estão associados a patogênese da doença. Um evento crucial encontrado nesta doença é que a proteína  $\beta$ -amilóide é capaz de ativar a microglia, resultando na elevação da expressão neuronal de COX-2, potencializando o estresse oxidativo mediado pela proteína amilóide. Informações recentes sugerem que as prostaglandinas derivadas da COX-2 aumentam o processo inflamatório neurodegenerativo, induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias nas células da astrogliia e potencializam a excitotoxicidade do glutamato acelerando a neurodegeneração. Os inibidores específicos da COX-2 podem oferecer importante alternativa na terapêutica profilática de redução da produção central de prostaglandinas nestes pacientes<sup>1,26,54,55</sup>.

Informações obtidas de diversos estudos epidemiológicos humanos, de modelos animais e de experimentos *in vitro* de cultura de células, evidenciam a participação da COX-2 no desenvolvimento de processos neoplásicos, abrindo a perspectiva do uso dos inibidores específicos da COX-2 na prevenção e no tratamento de diversos tipos de câncer. Estudos epidemiológicos revelaram que a aspirina é capaz de reduzir de 40% a 50% a incidência de câncer de cólon<sup>56-58</sup>. Diversos outros AINE, incluindo os inibidores específicos da COX-2, têm mostrado excelentes resultados na prevenção de vários tipos de câncer, incluindo os de pâncreas, fígado, esôfago, intestino, estômago, pulmão, mama, próstata, dentre outros<sup>57-64</sup>.

A base molecular para o desenvolvimento da atividade quimioprotetora dos AINE nos processos neoplásicos encontra-se principalmente relacionada com a elevada expressão e produção de COX-2 pelo tecido tumoral, como acontece no adenocarcinoma de esôfago e em neoplasias colorretais. Durante o desenvolvimento do câncer colorretal, a ocorrência seqüencial de múltiplas alterações genéticas culmina na transformação de um pólipo em câncer. A alteração genética inicial é a mutação no gene APC (*Adenomatous Polyposis coli*) supressor de tumor. O gene APC codifica uma proteína com a capacidade de reduzir a concentração de uma segunda proteína citoplasmática, denominada de  $\beta$ -catenina, que possui importantes funções de adesão e desenvolvimento celular. A mutação causa substancial elevação nos níveis de  $\beta$ -catenina que se desloca até o núcleo, formando um complexo com outra proteína chamada de fator 4 de células T (*T-cell Factor 4*, TCF-4). Este complexo liga-se então ao DNA e induz a expressão de genes que promovem o crescimento e proliferação celular. O complexo também induz a expressão do receptor  $\delta$  ativador de proliferação do peroxissomo (PPAR $\delta$ ). Após a interação com o ligante, o PPAR $\delta$  forma um complexo com um outro receptor nuclear, denominado de receptor retinóide X (RRX - *Retinoid X Receptor*), capaz de acoplar-se ao DNA e ativar genes-alvo. Os ligantes do PPAR $\delta$  incluem certos eicosanóides originados da ativação da COX-2 e alguns ácidos graxos<sup>64-66</sup>. A utilização dos testes de genética molecular pode ser muito útil na determinação

das mutações presentes nas neoplasias colorretais, orientando inclusive no aconselhamento do paciente e de sua família <sup>67</sup>.

Um dos mecanismos propostos para atividade antineoplásica dos AINE seria a inibição da ligação do PPAR $\delta$  com o DNA da célula, impedindo a ativação dos genes responsáveis pelo desenvolvimento, metabolismo, crescimento e diferenciação celular. Um outro mecanismo seria o da capacidade dos AINE de induzir apoptose das células cancerosas, pela inibição da função do PPAR $\delta$ . Além disso, os AINE, inibindo a COX-2, estariam também impedindo a formação de PGE<sub>2</sub> no tecido tumoral, prevenindo a estimulação do Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF - *Vascular Endothelial Growth Factor*), que induz a angiogênese, estimulando indiretamente o crescimento e expansão da célula neoplásica <sup>57,64-66</sup>. A expressão aumentada de COX-2 e a regulação negativa de PPAR $\delta$ , com a modulação subsequente nas concentrações de PGE<sub>2</sub> e 15desoxi $\Delta$ <sup>12-14</sup>PGJ<sub>2</sub>, podem influenciar o desenvolvimento de câncer de mama, e sua progressão para metástase <sup>68</sup>. Este dado sugere, de maneira indireta, que possa ocorrer uma possível participação da COX-3, como fonte de 15desoxi $\Delta$ <sup>12-14</sup>PGJ<sub>2</sub>. No entanto, esta é uma observação apenas especulativa.

Eibl e col. (2003) <sup>69</sup> demonstraram que o efeito antimetastático do nimesulide, um inibidor específico da COX-2, sobre células de câncer pancreático, é indireto, induzindo apoptose, independentemente da expressão da COX-2. De acordo com estes achados, o uso de rofecoxib, um inibidor específico da COX-2, resultou *in vitro* em aumento dose-dependente da apoptose e tempo-dependente da inibição do crescimento da proliferação de células tumorais, como revisto por outros autores <sup>70</sup>.

Na especialidade de Anestesiologia, para o tratamento da dor do câncer, utilizam-se diversos representantes do grupo dos AINE, principalmente em associação com os opióides, postula-se que os pacientes nesta situação possam apresentar benefícios adicionais com o uso de inibidores específicos da COX-2 em substituição aos AINE tradicionalmente usados e de baixa seletividade.

#### EFEITOS COLATERAIS DOS INIBIDORES ESPECÍFICOS DA COX -2

Considera-se que as prostaglandinas derivadas da COX-1 conferem citoproteção ao trato gastrointestinal. Dois grandes estudos clínicos multicêntricos foram realizados com a finalidade de avaliar a eficácia clínica e as complicações gastrointestinais dos coxibes (celecoxibe e rofecoxibe), o denominado *Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research* (VIGOR) e o *Celecoxib Long-Term Arthritis Safety Study* (CLASS). No ensaio VIGOR foram observados 8076 pacientes com artrite reumatóide, tratados, em média, durante nove meses, com uma dose diária de 50 mg de rofecoxibe, comparada com uma dose de 500 mg de naproxeno, administrada duas vezes ao dia. Neste grupo, a média de idade dos pacientes era de 58 anos e 80% deles eram do sexo feminino. Cerca de 60% haviam recebido terapia com glicocorticóide durante longo período

de e 8% tinham história de perfuração gastrointestinal, hemorragia ou sintomas de úlcera péptica. Os resultados deste estudo revelaram incidência de perfuração e hemorragia gastrointestinal ou sintomas de úlcera péptica em 4,5 por 100 pacientes/ano do grupo do naproxeno e de 2,1 por 100 pacientes/ano do grupo do rofecoxibe, uma diferença estatisticamente significativa de 54% <sup>9</sup>.

O ensaio CLASS consistiu-se de dois estudos separados. Em um deles, o celecoxibe (400 mg duas vezes ao dia) foi comparado ao diclofenaco (75 mg duas vezes ao dia). No outro, o celecoxibe foi comparado ao ibuprofeno (800 mg, três vezes ao dia). Dos pacientes estudados, 72% tinham osteoartrite e 68,5% eram do sexo feminino. A duração do estudo foi de 13 meses e neste caso era permitido o uso de aspirina na dose de até 325 mg/dia. Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação à incidência de úlcera gástrica, obstrução ou sangramento gastrointestinal alto <sup>9</sup>.

De acordo com a ADRAC (*Adverse Drug Reactions Advisory Committee*), desde o início da comercialização do celecoxibe (celebra), em outubro de 1999, já foram registrados mais de 919 relatos sobre os efeitos adversos e colaterais relacionados com o seu uso. Como esperado, poucos pacientes relataram alterações gastrointestinais como náusea, dor abdominal, diarreia e dispepsia. No entanto, outros efeitos adversos mais proeminentes com o uso do celecoxibe e de outros inibidores específicos da COX-2 puderam ser observados, entre eles a urticária, cefaléia, alergia (como edema de língua e angiodema) e insuficiência renal <sup>71-79</sup>.

Os resultados obtidos com o estudo VIGOR demonstraram maior risco de desenvolvimento de eventos cardiovasculares trombóticos com o uso do rofecoxibe, incluindo infarto do miocárdio, angina instável, trombos cardíacos, morte súbita, ataques isquêmicos e ataques isquêmicos transitórios. Outros estudos demonstraram resultados semelhantes entre o rofecoxibe e celecoxibe <sup>71,72</sup>. Alguns estudos revelam que a presença da COX-2 é essencial para o início do fechamento do duto arterioso durante a gravidez, sugerindo que o uso materno dos inibidores da COX-2 muito próximo do período do parto determina elevação da incidência de dutos arterioso patente após o nascimento <sup>26</sup>.

Scheider e col. <sup>79</sup> reportaram a manifestação de uma vasculite alérgica com púrpura necrótica difusa seguida de falência de múltiplos órgãos associada ao uso clínico de celecoxibe.

Embora ainda não seja conclusivo, alguns autores chamam a atenção para a interação farmacodinâmica deletéria da combinação da aspirina com inibidores reversíveis da COX, como o ibuprofeno e diclofenaco, devido à inibição competitiva do local ativo pelos inibidores reversíveis, impedindo o acesso da aspirina ao seu alvo na posição 530 da enzima, resultando em antagonismo do efeito cardioprotetor da aspirina em pacientes com doença cardiovascular estabelecida <sup>80,81</sup>.

Os inibidores específicos da COX-2, de forma semelhante aos demais AINE, podem promover alterações da função renal, resultando principalmente em edema periférico, hipertensão, inibição da excreção renal de água e sódio e hiperca-



lemia. A hipercalemia pode ser resultante da redução na liberação de renina mediada por prostaglandina, que por sua vez promove uma redução na formação de aldosterona e decréscimo na excreção de potássio no túbulo distal. O celecoxibe e o rofecoxibe produzem modesta hipercalemia<sup>26</sup>.

Embora não se conheça o verdadeiro impacto do celecoxibe e rofecoxibe na concentração plasmática do lítio, os pacientes em tratamento combinado deverão monitorizar os níveis plasmáticos do lítio, uma vez que é de amplo conhecimento a capacidade dos demais AINE não seletivos em diminuir a eliminação renal do lítio<sup>26</sup>.

Concluindo, destacamos que as últimas gerações de anti-inflamatórios inibidores específicos da COX-2 apresentam ainda sucesso limitado, em virtude, principalmente, de seus efeitos colaterais e de suas próprias contra-indicações. No entanto, graças à descoberta de outras variantes da ciclooxigenase, ao emprego da modelagem molecular na obtenção de compostos mais seletivos e às novas aplicações para esses agentes, inclusive no tratamento do câncer e do mal de Alzheimer, o interesse nos AINE permanece tão atual quanto 100 anos atrás.

## ***Specific Cyclooxygenase-2 Inhibitor Analgesics: Therapeutic Advances***

Wilson Andrade Carvalho, M.D.; Rosemary Duarte Sales Carvalho, M.D.; Fabrício Rios-Santos, M.D.

### INTRODUCTION

Since 1893, when German chemist Felix Hoffman has motivated Bayer to produce acetylsalicylic acid, patented as Aspirin, non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have become the most widely prescribed and used drugs worldwide. It is estimated that in the United States alone, approximately 50 million people spend around 5 to 10 billion dollars/year with those drugs<sup>1</sup>.

However, and despite the wide use of these agents, their mechanism of action has been only explained in 1971 when John Vane<sup>2</sup>, that has been awarded the Nobel Prize for his discovery, has proposed that aspirin-like anti-inflammatory drugs would suppress inflammatory processes by cyclooxygenase (COX) inhibition, thus preventing prostaglandins synthesis.

COX, key-enzyme catalyzing prostaglandins biosynthesis and also known as Prostaglandin Synthetase or Prostaglandin Endoperoxide Synthetase, was isolated in 1976 and cloned in 1988. In 1991 a gene was identified which would code a second enzyme isoform, then called cyclooxygenase-2. Today it is known that the two genes express two different isoforms of the enzyme, called: cyclooxygenase-1 (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2).

Both isoforms have similar primary protein structure and essentially catalyze the same reaction<sup>3-8</sup>.

With the discovery of COX-2, induced isoform predominantly expressed during inflammatory processes, a new therapeutic perspective came to light for the development of more selective drugs with less adverse effects. These agents' group has originated a new generation of anti-inflammatory drugs (selective COX-2 inhibitors), called Coxibs<sup>9,10</sup>. More recently, new motivations for clinical use and research were found with the description of a third cyclooxygenase variant called COX-3<sup>11</sup>.

### CYCLOXYGENASE BIOCHEMISTRY AND PROSTAGLANDINS SYNTHESIS

Prostaglandin and leucotriens compounds are called eicosanoids, for being derived from essential fatty acids of twenty carbons esterified into cell membrane phospholipids. Eicosanoids synthesis may be triggered by different stimulations activating membrane receptors, coupled to a regulatory protein bound to a guanidine nucleotide (G protein), resulting in the activation of phospholipase A<sub>2</sub> or increased intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. Phospholipase A<sub>2</sub> hydrolyzes membrane phospholipids, especially phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine, releasing arachidonic acid<sup>10-14</sup>.

Released arachidonic acid is the substrate for two different enzymatic pathways: cyclooxygenases pathway, which triggers prostaglandins and thromboxanes biosynthesis, and lipoxygenases pathway, responsible for leucotriens, lipoxins and other compounds synthesis<sup>15-18</sup> (Figure 1).

The presence of an inducible COX isoform was first described by Needleman et al., who have shown its induction by inflammatory stimulation and cytokines<sup>19</sup>. Due to different expression characteristics, two isoforms were then accepted: COX-1 and COX-2<sup>5,19-21</sup>. COX-1 was the first to be described and is constitutively expressed, that is, it is present in cells in physiologic conditions, especially blood vessels, platelets, stomach and kidneys. COX-2 may be induced by cytokines (interleukin-1, interleukin-2 and tumor necrosis factor  $\alpha$ ), phorbol esters, growth factors and endotoxins, being primarily expressed by cells involved in the inflammatory process, such as macrophages, monocytes and synoviocytes. On the other hand, COX-2 expression may be inhibited by glucocorticoids, interleukin-4, interleukin-14 and interleukin-10, while prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) promotes COX-2 expression up-regulation<sup>4,5,9,22-25</sup>. COX-2 may also be post-transcriptionally regulated. Loss of COX-2 post-transcriptional regulation by mutation of proteins specifically interacting with some messenger RNA elements of the enzyme may result in increased COX-2 expression, the mechanism of which has been proposed as a critical factor involved in bowel cancer<sup>26</sup> (Figure 2).

COX-1 and COX-2 are integral proteins located within the internal leaflet of the liposoluble bilayer of membrane phospholipids. The number of aminoacids of both isoenzymes is very similar, varying 599 aminoacids for

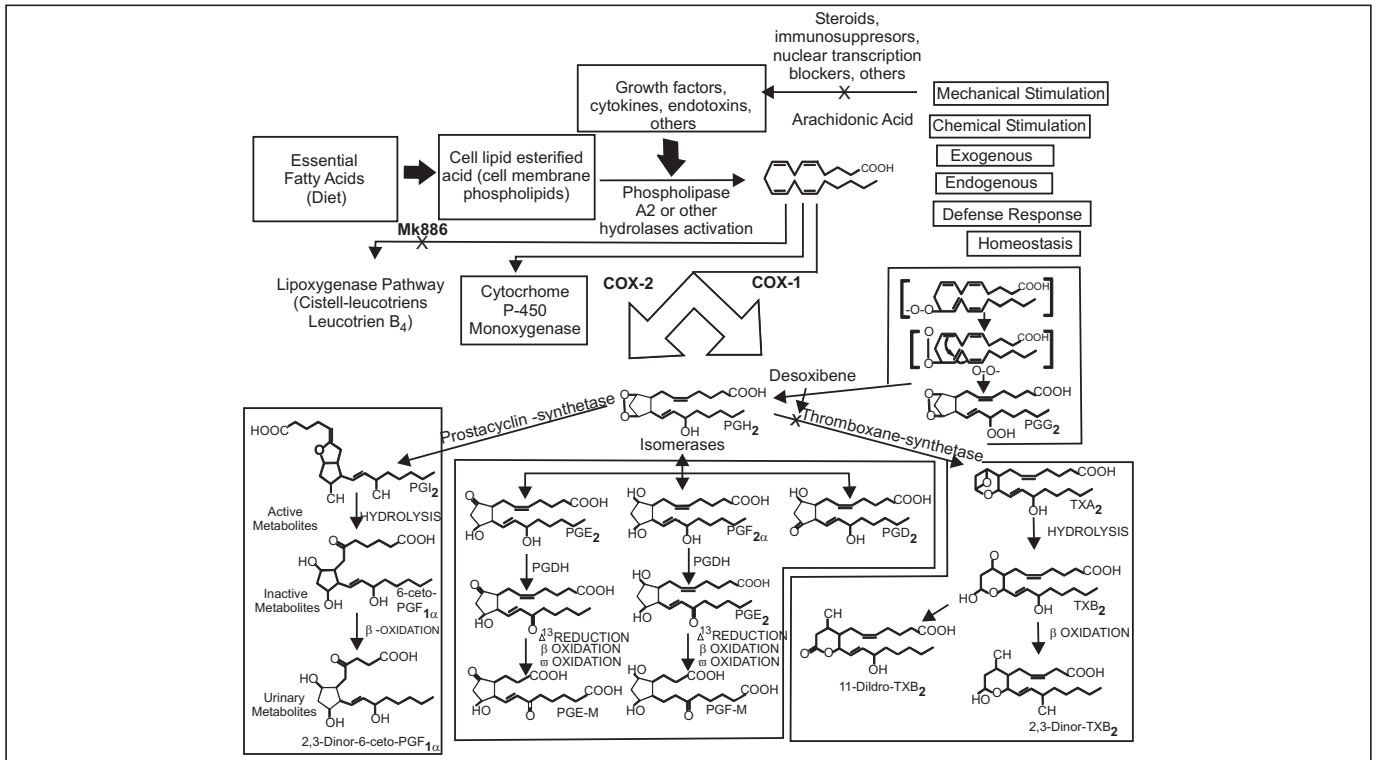


Figure 1 - Prostaglandins Biosynthesis (Adapted from Vane et al. 1998)

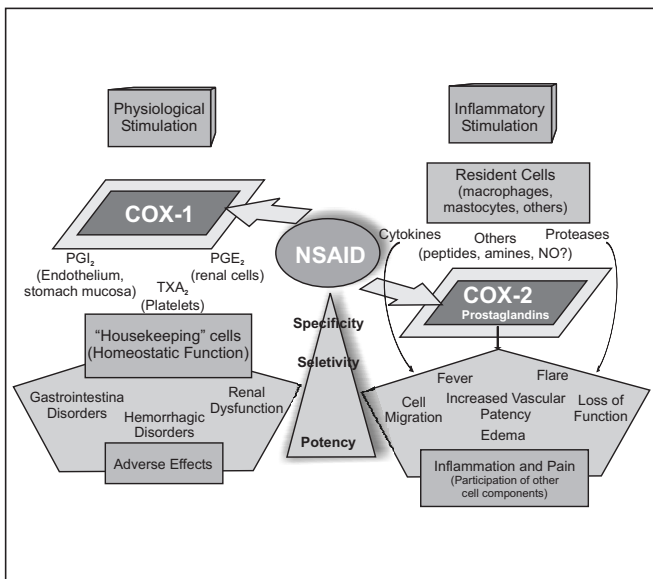


Figure 2 - Cyclooxygenase in Homeostasis and Inflammation  
 COX-1 plays a major role in normal physiological functions maintenance (housekeeping). On the other hand, pro-inflammatory mediators induce COX-2 expression in different cell types, such as resident and defense cells. PGs release amplifies the inflammatory process together with proteases and other mediators. Rational use of NSAIDs should be oriented according to individual clinical profile, as well as to inhibitory characteristics of each agent. The search for specific COX-1 inhibitors without losing their anti-inflammatory and analgesic potency remains one of the primary interest areas for Anesthesiology

COX-1 and 604 aminoacids for COX-2<sup>24</sup>. Cyclooxygenases structure has three different domains: one amino terminal domain similar to epidermal growth factor (EGF), followed by membrane binding domain and terminal carboxylic catalytic domain, which contains active sites of cyclooxygenase and peroxidase activity. Structural COX analysis reveals differences in the amino-terminal signaling peptide region and in the terminal carboxylic peptide chain, however of unknown importance. COX-1 has a sequence of 17 aminoacids in its amino-terminal peptide chain, which is not present in COX-2, while COX-2 has an additional insertion of 18 aminoacids in its carboxyl termination. Remaining COX-1 and COX-2 nucleus sequence, however, is approximately 75% identical and all residues identified as essential for catalytic activity are maintained<sup>4,6,26-28</sup>.

Cyclooxygenases have two different activities. One endoperoxide reductase activity which oxidizes and cycles non-esterified precursor fatty acid to form cyclic endoperoxide PGG (prostaglandin G), and a peroxidase activity which converts PGG into prostaglandin H (PGH). Active cyclooxygenase site is located in a long hydrophobic canal formed in the core of membrane-associated  $\alpha$ -helixes and provides direct access of arachidonic acid to the active site without leaving the membrane. Peroxidase function is located on the other side of the enzyme and is similar for both isoforms. Prostaglandin synthesis, then, starts with cyclooxygenase activity catalyzing the addition of molecular oxygen to arachidonic acid to initially form intermediate endoperoxide prostaglandin G<sub>2</sub> (PGG). The same enzyme by

its peroxidase activity, catalyzes this prostaglandin reduction to form PGH<sub>2</sub>. PGG and PGH have weak activity and serve as the substrate to form different active prostaglandins and thromboxanes, including PSD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, prostacyclins (PGI<sub>2</sub>) and thromboxanes (TX) (Figure 1)<sup>3,6,8,24,27,29</sup>.

Although remarkable differences were observed in DNA and RNA of COX genes structure and regulation, protein structure and enzymatic function are very similar. COX-1 and COX-2 have approximately 60% genetic homology in their coding regions, and their genes are located on chromosomes 9 and 1, respectively<sup>7,8,24</sup>.

Prostaglandins formed as from cyclooxygenase action bind to prostanoid receptors located in the cell membrane, coupled to G protein. G protein activation results in the stimulation of effector systems responsible for second messengers release in different tissues. These receptors have already been cloned and are organized in five groups according to the PG to which they have more affinity, called DP (PGD<sub>2</sub>), FP (PGF<sub>2</sub>), IP (PGI<sub>2</sub>), TP (PXA<sub>2</sub>) and EP (PGE<sub>2</sub>). Although most prostaglandin receptors are cell membrane surface receptors and make up the super-family of G protein-coupled receptors, some may be located in the nuclear membrane, the ligands of which act as transcription factors changing genetic cell expression. It has been recently shown that some eicosanoids, including PGI<sub>2</sub>, series J prostaglandins, 15 desoxy-Δ<sup>12-14</sup>-PGJ<sub>2</sub>(d15-PGJ<sub>2</sub>) and B<sub>4</sub> leucotrien (LTB<sub>4</sub>) are endogenous ligands of a family of nuclear receptors called Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs), which regulate lipid metabolism, cell differentiation and proliferation. There are currently three known PPAR receptor isoforms, called α, δ and γ<sup>13,30,31</sup>.

At least two effector systems acting through second messengers release are being associated to prostaglandin action. One is adenylate cyclase, the activation of which stimulates cyclic adenosine-3',5'-monophosphate (cyclic AMP). PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> and PGD<sub>2</sub> activate adenylate cyclase increasing cyclic AMP concentration, while TXA<sub>2</sub> decreases such activity. The other effector system is phospholipase C which, when activated by prostaglandins, increases diacylglycerol and 1,4,5-inositol triphosphate resulting in cascade activation of kinase proteins and increased intracellular Ca<sup>++</sup><sup>13,14,32,33</sup>.

### IS THERE A COX-3?

The expression of a third catalytic COX variant (COX-3) has been shown in *in vitro* studies with macrophage strains<sup>11,34,35</sup>. The uniqueness of this variant expression is that its origin are not pro-inflammatory prostaglandins but a member of the cyclopentanones family, 15desoxy-Δ<sup>12-14</sup> PGJ<sub>2</sub>, Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs) with anti-inflammatory activity<sup>34-40</sup>. If the hypothesis of a third cyclooxygenase with anti-inflammatory activity is correct, its expression may result in typical inflammation remission periods, as it has been observed with some chronic diseases, such as rheumatoid arthritis.

COX-3, possibly a COX-1 variant (for deriving from the same gene) is primarily distributed in cerebral cortex, spinal cord and heart, being more sensitive to acetaminophen (paracetamol) as compared to COX-1 and COX-2. It has been proposed that COX-3 inhibition could represent the primary central mechanism through which NSAID-type analgesic and antipyretic drugs would decrease pain and fever<sup>11</sup>.

### CYCLOOXYGENASE PHYSIOLOGICAL AND PATHOLOGICAL FUNCTIONS

Prostaglandins are involved in different physiological and pathological processes, including vasodilation or vasoconstriction; bronchial or uterine muscles contraction or relaxation; hypotension; ovulation; bone metabolism; renal blood flow increase (resulting in diuresis, natriuresis, kaliuresis and renin secretion stimulation); gastric mucosa protection and local blood flow regulation; gastric acid secretion inhibition; nervous growth and development; immune response; hyperalgesia; cell chemotactic activity regulation; endocrine response; angiogenesis; metastatic progression, among others<sup>10,14,17,18,40-46</sup>.

Family E prostaglandins (PGEs) are potent vasodilators for most vascular beds. Vasodilating activity primarily involves arterioles, pre-capillary sphincters and post-capillary venules. PGD<sub>2</sub>, in general, dilates mesenteric, coronary and renal vessels, and constricts pulmonary circulation. PGI<sub>2</sub> is an effective vasodilator and may lead to major arterial hypotension, while TXA<sub>2</sub> is a potent vasoconstrictor. In blood, prostaglandins also modulate platelet function. PGE<sub>1</sub>, PGD<sub>2</sub> and PGI<sub>2</sub> are platelet aggregation inhibitors, while thromboxane A<sub>2</sub> is a major aggregation inducer. PGI<sub>2</sub> is synthesized by vascular endothelium, controls cells adhesion to endothelium and platelet aggregation and contributes to intact vascular wall antithrombotic mechanism<sup>44</sup>.

PGEs and PGI<sub>2</sub> inhibit gastric acid secretion stimulated by food, histamine or gastrins and decrease pepsin secretion, acidity and content. Prostaglandins are gastric mucosa vasodilators and seem to be involved with local blood flow regulation. Stomach and small bowel mucus secretion is increased by PGEs. These effects help maintaining gastric mucosa integrity, protect epithelial cells and are referred to as cytoprotecting properties of COX-1 synthesized prostaglandins. In fact, adverse gastrointestinal NSAIDs effects are associated to the suppression of COX-1 constitutive expression, resulting in gastric damage, hemorrhage and ulceration<sup>13,45,47</sup>.

Prostaglandins also influence renal blood flow distribution, sodium and water reabsorption and renin release. PGI<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub> and PGD<sub>2</sub> determine renin secretion in renal cortex, probably by direct effect on juxtaglomerular cells. COX-2 is found in renal vessels, cortical macula densa, interstitial renal cells, collector duct and the small portion of Henle's loop, with increased expression in certain areas with aging<sup>7,9,13,14,45</sup>.

Prostaglandins and leucotriens, when released, also play a critical role in inflammatory process signs and symptoms genesis<sup>10,15,16,17,22</sup>. Ferreira (1979)<sup>42</sup> has observed that intradermal prostaglandin induces hyperalgesia. It has been shown that PGE and PGI<sub>2</sub> hypersensitize C fibers polymodal nociceptors to mechanical and chemical stimulations<sup>17,18,42,43</sup>.

It has been shown that prostaglandins are produced in CNS neurons and vessels with major participation in several central functions, including sleep and emergence cycle control, febrile thermogenesis and nociceptive transmission. Prostaglandins and cytokines (interleukine-6) are also implied in the pathophysiology of some degenerative brain diseases, such as multiple sclerosis, AIDS-associated dementia and Alzheimer's disease<sup>6,8,24,27,48</sup>.

It is known that lipopolysaccharides (LPS) and cytokines may induce COX-2 in different brain regions, and that COX-1 is constitutively expressed in several neurons. COX-1 is predominantly distributed in the forebrain where prostaglandins may be involved in integration functions, such as autonomous nervous system and sensorial transmission pathways modulation. Interestingly, COX-2 is constitutively expressed in some brain regions, especially cortex, hippocampus, tonsila-hippocampus complex (important for memory and behavior), hypothalamus and spinal cord. Among neural circuits, fever response regulatory pathway is the best known. Interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) release as from pirogenic stimulation promotes central PGE<sub>2</sub> synthesis which, in turn, activates the thermoregulating center located in anterior hypothalamus pre-optic area and triggering fever<sup>6,49-51</sup>.

Since the eye is ontogenetically generated from neuroepithelium and shares many CNS characteristics, it has called the attention of investigators to study COX-2 distribution in this organ. The study of primary open angle glaucoma treatment with prostaglandins has led to the observation that COX-2 expression is totally decreased in the non-pigmented secretory epithelium of the ciliary body of glaucoma patients, remaining unchanged in other parts of the eye<sup>26</sup>.

#### SPECIFIC CYCLOXYGENASE-2 INHIBITORS

Since 1844 when salicylic acid was isolated from gaultheria oil by Cahours, to the introduction of acetylsalicylic acid in 1899 by Dreser, the search for new NSAIDs is in overt development, currently counting on a large number of compounds available in several countries of the world<sup>14</sup> (Chart I). Although older anti-inflammatory drugs, such as salicylates, are very effective analgesic, antipyretic and anti-inflammatory drugs, their prolonged use is limited in most patients for developing highly uncomfortable gastrointestinal effects, such as dyspepsia, abdominal pain, bleeding, gastric or duodenal ulcer or perforation. Gastrointestinal side effects were attributed to the low COX-2 inhibition specificity of these compounds<sup>8,9,18,28</sup>.

#### Chart I - Non-Steroidal Anti-Inflammatory (NSAIDs)

---

##### Non Specific COX Inhibitors

Salicylic Acid Derivatives (salicylates)

Acetylsalicylic Acid (Aspirin), Sodium Salicylate, Methyl Salicylate, Diflunisal, Flunfenisal, Sulfasalazine, Olsalazine.

Pyrazolone Derivatives

Antipyrine, Aminopyrine, Dipirone, Fenylbutazone, Apazone, Sulfinpyrazone

Para-aminophenol Derivatives

Acetaminophen (paracetamol)

Indolacetic Acid and Indenoacetic Acid Derivatives

Indomethacin, Sulindac

N-phenylantranilic Acid Derivatives (phenamates)

Mefenamic Acid, Meclofenamic Acid, Flufenamic Acid, Tolfenamic Acid, Etofenamic Acid.

Heteroarilacet Acid Derivatives

Tolmetin, Ketoralac, Etodalac

Phenylacetic Acid Derivatives

Sodium Diclofenac

Arylpropionic Acid Derivatives

Ibuprofen, Naproxen, Flurbiprofen, Ketoprofen, Fenoprofen, Oxaprozin, Indoprofen, Thiaprofenic Acid.

Enolic Acid Derivatives (Oxicam)

Piroxicam, Meloxicam, Tenoxicam, Sudoxicam, Isoxicam, Ampiroxicam, Droxicam, Lornoxicam, Cinoxicam.

Alkanones

Nabumetone, Proquazone

Carbamic Acid Derivatives

Flupirtine

##### Specific COX-2 Inhibitors

Phenoxymethanesulfanilide Derivatives

Nimesulide

Indolacetic Acid Derivative

Etodalac

Furanone Diarylsubstituted Derivative

Rofecoxib

Prirazol Diraylsubstituted Derivative

Celecoxib

Other Coxibs

Valdecoxib, Etoricoxib

---

COX-2 specificity has been primarily evaluated in *in vitro* studies for simplicity and speed reasons. Several systems have been tested with this aim, including studies with human recombinant enzymes, cell cultures and whole blood. In whole blood studies, platelet thromboxane synthesis during clot formation is used as COX-1 activity index, while PGE<sub>2</sub> synthesis (primarily by monocytes) in whole blood exposed to lipopolysaccharides is used as COX-2 activity index. Most studies determine 50% inhibitory concentra-

tion ( $IC_{50}$ ) representing drug concentration which, in controlled conditions, inhibits 50% of COX activity. NSAIDs are evaluated by a relative specificity index between COX isoforms, expressed as  $IC_{50}$  for COX-2/COX-1. According to this criteria, the lower the relative coefficient or COX-2/COX-1 ratio, the higher the drug specificity to COX-2. These proportional inhibition indices of both isoforms are used to compare drug potency, and in theory should also be correlated to clinical predisposition to gastrointestinal adverse effects. These *in vitro* studies, however, have poorly reproducible results, probably reflecting study differences. In addition,  $IC_{50}$  does not necessarily reflect drug-enzyme interaction complexity and real *in vivo* inhibition and for such should not be used to measure clinical efficacy. Different NSAIDs inhibitory activity is shown in table I<sup>28</sup>.

Table I - Non-Steroid Anti-Inflammatory Drugs (NSAIDs) Specificity

Drugs	IC <sub>50</sub> COX-1 (µM)	IC <sub>50</sub> COX-2 (µM)	IC <sub>50</sub> COX-2/COX-1
<b>Non Specific COX-2 Inhibitors</b>			
Aspirin	1.67	278	166
Fenoprofen	2.73	4.03	1.47
Flurbiprofen	0.59	3.46	5.90
Ibuprofen	4.88	22.4	4.60
Indomethacin	0.028	1.68	60
Ketoprofen	0.006	0.119	19.8
Ketorolac	0.32	0.88	2.75
Mefenamic acid	0.15	0.28	1.87
Nabumetone	278	187	0.67
Naproxen	11	52.3	4.6
Oxaprozine	14.6	36.7	2.51
Piroxicam	0.0005	0.3	600
Sodium Diclofenac	1.57	1.1	0.70
Tenoxicam	23.0	14.2	0.62
Tolmetin	1.23	7.09	5.76
<b>Specific COX-2 Inhibitors</b>			
Celecoxib	15	0.04	0.003
DFU	50.0	0.04	< 0.001
Etodalac	34.0	3.4	0.10
Ketorolac	0.083	0.012	0.14
L-745337	369	1.5	0.004
Meloxicam	4.8	0.43	0.09
Nimesulide	9.2	0.52	0.06
NS-398	16.8	0.10	0.006
Rofecoxib	26.3	0.34	0.01
SC-58125	38.7	0.27	0.007

IC<sub>50</sub> = Inhibitory Concentration 50%

Clinical evaluation of these compounds specificity is based on the use of techniques allowing the observation of clinical toxicity, such as endoscopy for gastric ulcers visualization, or observation of therapeutic effects of anti-inflammatory doses of the agent. It is important to consider, however, that several factors determine clinical COX-2 inhibitor response, including among the most relevant, genetic variability of target-protein or metabolizing enzymes, drugs interaction and patient's characteristics, which may influence both efficacy and adverse effects during clinical trials<sup>8,9,21,28</sup>. Aspirin promotes irreversible inhibition of cyclooxygenase activity by covalent binding with a serine molecule of the target site. Aspirin acetylates serine in position 530 of COX-1 structure preventing arachidonic acid binding to enzyme active site. In COX-2, aspirin acetylates a serine molecule in position 516. Although not being recommended as first choice for chronic inflammatory processes, such as rheumatism and arthritis due to its potent inhibitory action on COX-1, aspirin is still a major alternative to prevent high thromboembolic risk diseases, such as myocardial infarction, in these cases benefiting from the anti-COX-1 mechanism by preventing platelet aggregation. This irreversible aspirin effect is particularly important in Anesthesiology when patients in chronic use of the drug present higher intra and postoperative bleeding risk. Since platelet cyclooxygenase inhibition is present throughout platelet life, corresponding to 8 to 10 days, it is recommended that patients withdraw the drug at least one week before surgery, unless risk-benefit ratio justifies otherwise<sup>13,14,18</sup>.

Others NSAIDs, such as mefenamate, diclofenac and ibuprofen are reversible competitive inhibitors of both isoforms, competing with arachidonic acid binding in COX target-site. A third class of NSAIDs, represented by flurbiprofen and indomethacin, promotes time-dependent slow reversible COX-1 and COX-2 inhibition as result of a saline bridge between drug's carboxylate and arginine in position 120 of target-site, followed by conformation changes<sup>26</sup>.

COX-2 specific inhibitors first generation is represented by nimesulide, etodalac and meloxicam. These products selectivity was in fact observed after their commercialization and was primarily result of clinical and experimental observations of low incidence of gastrointestinal side effects which were further proven by *in vitro* studies. Nimesulide is the aberrant NSAID example, with good *in vivo* potency in inflammatory models, but with weak *in vitro* inhibition of COX preparations. Nimesulide, in addition to COX-2 specificity, has additional effects that intensify its anti-inflammatory activity, such as neutrophils activation inhibition and antioxidant properties. Based on *in vitro* studies it has initially been suggested that meloxicam would selectively inhibit COX-2. However, when tested *in vivo*, its COX-2 specificity has been just approximately 10 times higher as compared to COX-1, in addition to presenting platelet inhibition<sup>52</sup>. Molecular changes in these products, especially nimesulide, aiming at increasing COX-2 specificity, have originated structures without carboxylic cluster and with the presence of sulfonamide or sulfone clusters, originating the so-called specificity or specific second

generation inhibitors. This group includes celecoxib, rofecoxib, valdecoxib, parecoxib (valdecoxib pro-drug), APHS [*o*-(*acetoxyphenyl*)*hept-2-ynyl sulfide*] and etoricoxib, being the two former already available in the market<sup>8</sup> (Chart I, Table I and Figure 3).

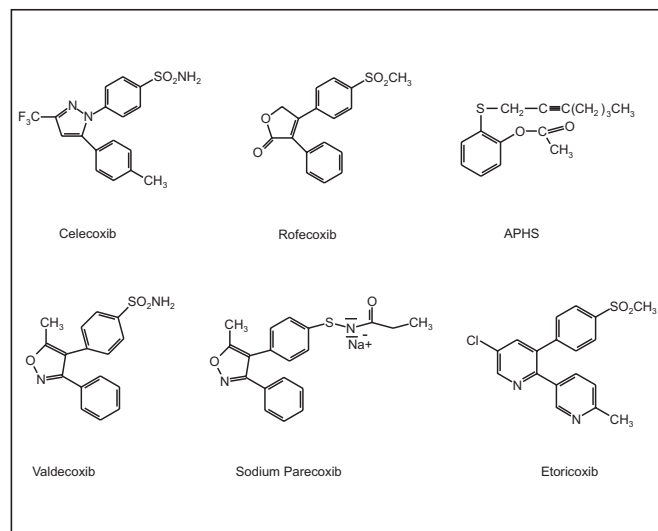


Figure 3 - Chemical COX-2 Inhibitors Structure

The relatively recent X-rays crystallography technique is gradually elucidating the action mechanism through which NSAIDs inhibit cyclooxygenase. Picot et al. (1994)<sup>53</sup> using this technique have reported COX-1 tridimensional structure starting a new understanding of COX inhibitors therapeutic actions. The understanding of COX-1 and COX-2 structures and their active sites is the fundamental basis for the development of more specific COX-2 inhibitors and for studies on the structure-activity ratio of such products. During enzyme activity, arachidonic acid is bound to arginine in position 120 and to serine in position 530. The transfer of tyrosine electrons in position 385 to an oxidized heme, which is also bound to the enzyme, starts cyclooxygenase reaction. Several studies have tried to explain how and where NSAIDs act in cyclooxygenase to block prostaglandins synthesis. Inside COX hydrophobic channel, a difference of aminoacid in position 523 (isoleukin in COX-1 and valine in COX-2) may be critical for the specificity of several drugs<sup>19,24,28,29</sup>.

Currently, since binding sites for specific COX-2 inhibitors have already been described, and enzyme tridimensional structure is well-established, modern molecular modeling techniques may develop new compounds with high affinity and specificity, but probably without sulfonamide and sulfone clusters of second generation compounds. Compound RS57067000 may be one of the first in this class of really specific COX-2 inhibitors, thus representing the birth of a third generation of specific COX-2 inhibitors<sup>6,27</sup>.

## NEW SPECIFIC CYCLOOXYGENASE-2 INHIBITORS APPLICATIONS

Human brain cells are able to start and amplify characteristic brain inflammatory response involving cytokine synthesis, acute phase proteins, complement activation, prostaglandins and oxygen radicals release. In Alzheimer's disease, all signs of microglia inflammation and astroglia activation with amyloid protein deposition are associated to the pathogenesis of the disease. A critical event in this pathology is that  $\beta$ -amyloid protein is able to activate microglia resulting in increased neuronal COX-2 expression, potentiating amyloid protein-mediated oxidative stress. Recent information suggests that COX-2-derived prostaglandins increase neurodegenerative inflammatory process, induce pro-inflammatory cytokines synthesis in astroglia cells and potentiate glutamate excitotoxicity accelerating neurodegeneration. Selective COX-2 inhibitors may be a major alternative for preventing central prostaglandin production in those patients<sup>1,26,54,55</sup>.

Several epidemiological human, animal and *in vitro* studies have observed the involvement of COX-2 in neoplastic processes opening the perspective of using selective COX-2 inhibitors to treat several types of cancer. Epidemiological studies have shown that aspirin is able to decrease the incidence of colon cancer in 40% to 50%<sup>56-58</sup>. Several other NSAIDs, including specific COX-2 inhibitors, have shown excellent results in preventing several types of cancer, including pancreas, liver, esophagus, intestine, stomach, lungs, breast and prostate, among others<sup>57-64</sup>.

Molecular basis for the development of NSAIDs chemoprotective activity in neoplastic processes is primarily related to high COX-2 expression and production by tumor tissue, as it is the case with esophageal carcinomas and colo-rectal neoplasias. During colo-rectal cancer development, a sequence of multiple genetic changes peaks with the transformation of a polyp in cancer. Initial genetic change is a mutation in tumor suppressor gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*). APC gene codes a protein able to decrease concentration of a second cytoplasm protein called  $\beta$ -catenine, which plays a major role in cell adhesion and development. Mutation substantially increases  $\beta$ -catenine which is displaced toward the nucleus forming a complex with another protein called T-cell Factor 4 (TCF-4). This complex then binds to DNA and induces the expression of genes promoting cell growth and proliferation. The complex also induces the expression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors  $\delta$  (PPAR $\delta$ ). After interacting with the ligand, PPAR $\delta$  forms a complex with other nuclear receptor called Retinoid X Receptor (RXR) able to couple to DNA and activate target-genes. PPAR $\delta$  ligands include some eicosanoids originated from the activation of COX-2 and some fatty acids<sup>64-66</sup>.

Molecular genetics tests may be very useful in determining colo-rectal neoplastic mutations and in guiding patients and their relatives<sup>67</sup>.

A proposed mechanism for NSAIDs antineoplastic activity would be the inhibition of PPAR $\delta$  binding to cell DNA, preventing the activation of genes responsible for cell development, metabolism, growth and differentiation. A different mechanism would be NSAIDs ability to induce cancer cells apoptosis by inhibiting PPAR $\delta$  function. In addition, by inhibiting COX-2, NSAIDs would also be preventing PGE2 formation in tumor tissue, preventing stimulation of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), which induces angiogenesis by indirectly stimulating neoplastic cell growth and expansion<sup>57,64-66</sup>. Increased COX-2 expression and negative PPAR $\delta$  regulation with subsequent modulation in PGE2 and 15desoxy $\Delta$  12-14 PGJ2 concentration may influence breast cancer development and progression to metastasis<sup>68</sup>. These data indirectly suggest that COX-3 may participate as a source of 15desoxy $\Delta$ 12-14 PGJ2. This is however mere speculation.

Eibl et al. (2003)<sup>69</sup> have shown that the antimetabolic effect of nimesulide, selective COX-2 inhibitor, on pancreas cancer cells is indirect, inducing apoptosis regardless of COX-2 expression. According to these findings, rofecoxib, specific COX-2 inhibitor, has resulted *in vitro* in dose-dependent apoptosis increase and time-dependent tumor cell proliferation inhibition, as reviewed by other authors<sup>70</sup>.

Several NSAIDs are used in Anesthesiology to treat cancer pain, especially in association with opioids. It is believed that patients in those situations may have additional benefits from the use of selective COX-2 inhibitors to replace traditionally used and low selectivity NSAIDs.

#### SPECIFIC COX-2 INHIBITORS SIDE EFFECTS

COX-1-derived prostaglandins are considered to offer cytoprotection to gastrointestinal tract. Two major multicentric clinical trials were performed aiming at evaluating coxibes (celecoxib and rofecoxib) clinical efficacy and gastrointestinal complications: the so-called Vioxx Gastrointestinal Outcomes Research (VIGOR) and Celecoxib Long-Term Arthritis Safety Study (CLASS). VIGOR trial has evaluated 8076 rheumatoid arthritis patients treated in average for nine months with daily 50 mg rofecoxib as compared to 500 mg naproxene twice a day. In this group, mean age was 58 years and 80% were females. Approximately 60% had been treated with glucocorticoids for a long period and 8% had history of intestinal perforation, hemorrhage or peptic ulcer symptoms. This study has revealed perforation and gastrointestinal hemorrhage or peptic ulcer symptoms in 4.5 per 100 patients/year in the naproxene group as compared to 2.1 per 100 patients/year in the rofecoxib group, with statistically significant difference of 54%<sup>9</sup>.

CLASS trial consisted of two separate studies. One has compared celecoxib (400 mg twice a day) and diclofenac (75 mg twice a day). The other has compared celecoxib and ibuprofen (800 mg three times a day). From studied patients, 72% had osteo-arthritis and 68.5% were females. Study has lasted 13 months and aspirin was allowed until 325 mg/day.

There were no significant differences between groups in the incidence of gastric ulcer, upper gastrointestinal bleeding or obstruction<sup>9</sup>.

According to ADRAC (Adverse Drug Reactions Advisory Committee), since the introduction of celecoxib (celebra) in the market in 1999, more than 919 reports on related adverse and side effects have been recorded. As expected, few patients have reported gastrointestinal changes such as nausea, abdominal pain, diarrhea and dyspepsia. However, more prominent adverse effects were observed with celecoxib and other COX-2 specific inhibitors, such as hives, headache, allergy (such as tongue edema and angioedema) and renal failure<sup>71-79</sup>.

VIGOR trial results have shown a higher risk for thrombotic cardiovascular events with rofecoxib, including myocardial infarction, unstable angina, heart clots, sudden death, ischemic attacks and transient ischemic attacks. Other studies have shown similar results between rofecoxib and celecoxib<sup>71,72</sup>. Some studies have shown that COX-2 is essential for starting ductus arteriosus closing during pregnancy, suggesting that maternal use of COX-2 inhibitors very close to labor would increase the incidence of patent ductus arteriosus after delivery<sup>26</sup>.

Scheider et al.<sup>79</sup> have reported allergic vasculitis with diffuse necrotizing purpura followed by multiple organ failure associated to clinical use of celecoxib.

Although not conclusive, some authors call the attention to the noxious pharmacodynamic interaction of aspirin with reversible COX inhibitors, such as ibuprofen and diclofenac, due to competitive active site inhibition by reversible inhibitors, preventing aspirin to reach its target in position 530 of the enzyme, resulting in antagonism of aspirin cardioprotective effect on patients with established cardiovascular disease<sup>80,81</sup>.

Specific COX-2 inhibitors, similarly to other NSAIDs, may promote renal function changes primarily resulting in peripheral edema, arterial hypertension, renal water and sodium excretion inhibition and hyperkalemia. Hyperkalemia may result from decreased prostaglandin-mediated rennin release, which in turn promotes aldosterone decrease and distal tubule potassium excretion decrease. Celecoxib and rofecoxib promote mild hyperkalemia<sup>26</sup>.

Although not knowing the real impact of celecoxib and rofecoxib on lithium plasma concentration, patients under combined treatment should monitor their lithium plasma levels since it is widely known that other non-selective NSAIDs decrease renal lithium excretion<sup>26</sup>.

In conclusion, we stress that newer generations of specific COX-2 inhibitor anti-inflammatory drugs are still of limited success especially due to their side-effects and contraindications. However, thanks to the discovery of different cyclooxygenase variants, to the use of molecular modeling to obtain more specific compounds, and to new applications for those agents, including cancer treatment and Alzheimer's disease, the interest on NSAIDs will remain as current as 100 years ago.

## REFERÊNCIAS - REFERENCES

01. Dubois RN, Abramson SB, Crofford L et al - Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J*, 1998;12:1063-1073.
02. Vane JR - Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nat New Biol*, 1971;231: 232-235.
03. DeWitt DL, Smith WL - Primary structure of prostaglandin G/H synthase from sheep vesicular gland determined from the complementary DNA sequence. *Proc Natl Acad Sci*, 1988;85: 1412-1416.
04. Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC et al - TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J Biol Chem*, 1991;266:12866-12872.
05. Xie W, Chipman JG, Robertson DL et al - Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci*, 1991;88: 2692-2696.
06. Crofford LJ - COX-1 and COX-2 tissue expression: implications and predictions. *J Rheumatol*, 1997;24:15-19.
07. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM - Cyclooxygenase 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998;38:97-120.
08. Kulkarni SK, Jain NK, Singh A - Cyclooxygenase isoenzymes and newer therapeutic potential for selective COX-2 inhibitors. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 2000;22:291-298.
09. Fitzgerald GA, Patrono C - The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med*, 2001;345:433-442.
10. Carvalho WA, LEMONICA L - Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos, em: Braz JRC, Castiglia, YMM - Temas de Anestesiologia. Curso de Graduação em Medicina, 2ª Ed, São Paulo, Artes Médicas, 2000;265-280.
11. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL et al - COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci*, 2002;99:13926-13931.
12. Janeway CA, Travers P, Walport M et al - Immunobiology. The Immune System in Health and Disease, 5<sup>th</sup> Ed, New York, Garland Publishing/Churchill Livingstone, 2001.
13. Morrow JD, Roberts LJ - Lipid-Derived Autacoids. Eicosanoids and Platelet-Activating Factor, em: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG - Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics. New York, McGraw-Hill, 2001;669-685.
14. Carvalho WA - Analgésicos, Antipiréticos e Antiinflamatórios, em: Silva P - Farmacologia, 6ª Ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002;431-455.
15. Samuelsson B, Granstrom E, Green K et al - Prostaglandins. *Ann Rev Biochem*, 1975;44:669-694.
16. Samuelsson B - The leukotrienes: a new group of biologically active compounds including SRS-A. *Trends Pharmacol Sci*, 1980;1: 227-230.
17. Carvalho WA - Mecanismos de ação das drogas anti-inflamatórias não-esteróides. I. Ações farmacológicas das prostaglandinas e leucotrienos. *F Med*, 1990;100:37-44.
18. Carvalho WA - Mecanismos de ação de drogas antiinflamatórias não-esteróides. II. Ações analgésicas, antiinflamatórias e antipiréticas. *F Med*, 1990;100:111-122.
19. Raz A, Wyche A, Needleman P - Temporal and pharmacological division of fibroblast cyclooxygenase expression into transcriptional and translational phases. *Proc Natl Acad Sci*, 1989;86:1657-1661.
20. Fu JY, Masferrer JL, Seibert K et al - The induction and suppression of prostaglandin H2 synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. *J Biol Chem*, 1990;265:16737-16740.
21. Mitchell JA, Akarasereenont P, Thiemermann C et al - Selectivity of nonsteroid anti-inflammatory drugs as inhibitors of constitutive and inducible cyclooxygenase. *Proc Natl Acad Sci*, 1993;90: 11693-11697.
22. Meade EA, Smith WL, Dewitt DL - Differential inhibition of spinal nociceptive processing. *Pain*, 1993;9-43.
23. Vane JR, Botting RM - New insights into the mode of action of anti-inflammatory drugs. *Inflamm Res*, 1995;1-10.
24. Jouzeau Y, Terlain B, Abid A et al - Cyclo-oxygenase isoenzymes. How recent findings affect thinking about nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Drugs*, 1997;53: 563-582.
25. Morisset S, Patry C, Lora, M et al - Regulation of cyclooxygenase-2 expression in bovine chondrocytes in culture by interleukin 1 $\alpha$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , glucocorticoids, and 17 $\beta$ -estradiol. *J Rheumatol*, 1998;25:1146-1153.
26. Hinz B, Brune K - Cyclooxygenase-2 10 years later. *J Pharmacol. Exp Ther*, 2002;300:367-375.
27. Kurumbail RG, Stevens AM, Gierse JK et al - Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 1996;384:644-648.
28. Cryer B, Dubois A - The advent of highly selective inhibitors of cyclooxygenase. A review. *Prostaglandins*, 1998;56:341-361.
29. Needleman P - In search of a better NSAID. Proceedings of the 9<sup>th</sup> International Conference on Prostaglandins and Related Compounds. Florence, Italy, 1994;6-10.
30. Devchand PR, Keller H, Peters JH et al - The PPAR $\alpha$ -leukotriene B4 pathway to inflammatory control. *Nature*, 1996;384:39-43.
31. Hla T, Bishop-Bailey D, Liu CH et al - Cyclooxygenase-1 and -2 isoenzymes. *Int J Bioch Cell Biol*, 1999;31:551-557.
32. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S - International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors and clinical potential distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev*, 1994;46:205-229.
33. Graziano MP, Gilman AG - Guanine nucleotide-binding regulatory protein: mediators of transmembrane signaling. *Trends Pharmacol Sci*, 1987;8:478-481.
34. Colville-Nash PR, Qureshi SS, Willis D et al - Inhibition of inducible nitric oxide synthase by peroxisome proliferator-activated receptor agonists: correlation with induction of heme oxygenase 1. *J Immunol*, 1998;161:978-984.
35. Gilroy DW, Tomlinson A, Willoughby DA - Differential effects of inhibition of isoforms of cyclooxygenase (COX-1, COX-2) in chronic inflammation. *Inflamm Res*, 1998;47:79-85.
36. Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D et al - Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med*, 1999;5:698-701.
37. Jiang C, Ting AT, Seed B - PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*, 1998;391: 82-86.
38. Ricote M, Huang J, Fajas L et al - Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998;95:7614-7619.
39. Ricote M, Li AC, Willson TM et al - The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*, 1998;391:79-82.
40. Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR - COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. *Lancet*, 2000;355:646-648.
41. Carvalho WA, LEMONICA L - Mecanismos Centrais de Transmissão e de Modulação da Dor. Atualização Terapêutica, em: Braz JRC, Castiglia YMM - Temas de Anestesiologia. para o Curso de Graduação em Medicina, 2ª Ed, São Paulo, Artes Médicas, 2000;281-296.
42. Ferreira SH, Vane JR - Mode of Action of Anti-Inflammatory Agents which are Prostaglandin Synthetase Inhibitory, em: Vane JR, Ferreira SH - Anti-Inflammatory Drugs. New York, Springer-Verlag, 1979;348-398.
43. Moncada S, Ferreira SH, Vane JR - Pain and Inflammatory Mediators, em: Vane JR, Ferreira SH - Hand Books of Experimental Inflammation. New York, Springer-Verlag, 1978;588-616.
44. Moncada S, Vane JR - Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A2, and prostacyclin. *Pharmacol Rev*, 1978;30:293-331.
45. Piper P, Vane J - The release of prostaglandins from lung and other tissues. *Ann N Y Acad Sci*, 1971;180:383-385.
46. Fischer JW, Gross DM - Effects of Prostaglandins on Erythropoiesis, em: Silver M, Smith BJ, Kocsis JJ - Prostaglandins in Haematology. New York, Spectrum Publications Inc, 1977; 159-185.
47. Cohn SM, Schloemann S, Tessner T et al - Crypt stem cell survival in the mouse intestinal epithelium is regulated by prostaglandins synthesized through cyclooxygenase-1. *J Clin Invest*, 1997;99: 1367-1379.



48. Yamagata K, Andreasson KI, Kaufmann WE et al - Expression of a mitogen-inducible cyclooxygenase in brain neurons: regulation by synaptic activity and glucocorticoids. *Neuron*, 1993;11:371-386.
49. Breder C, Saper CB - Expression of inducible cyclooxygenase mRNA in the mouse brain after systemic administration of bacterial lipopolysaccharide. *Brain Res*, 1996;713:64-69.
50. Kaufmann WE, Worley PF, Pegg J - COX-2, a synaptically induced enzyme, is expressed by excitatory neurons at postsynaptic sites in rat cerebral cortex. *Proc Natl Acad Sci*, 1996;93:2317-2321.
51. Fiebich BL, Hull M, Lieb K et al - Prostaglandin E<sub>2</sub> induces interleukin-6 synthesis in human astrocytoma cells. *J Neurochem*, 1997;68:704-709.
52. Panara MR, Renda G, Sciulli MG et al - Dose-dependent inhibition of platelet cyclooxygenase-1 and monocyte cyclooxygenase-2 by meloxicam in healthy subjects. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999;290:276-280.
53. Picot D, Loll PJ, Garavito RM - The X-ray crystal structure of the membrane protein prostaglandin H<sub>2</sub> synthase 1. *Nature*, 1994;367:243-249.
54. Hull M, Lieb K, Fiebich BL - Anti-inflammatory drugs: a hope for Alzheimer's disease? *Expert Opin Investig Drugs*, 2000;9: 671-683.
55. Hawke CJ - COX-2 Inhibitors. *Nature*, 1999;353:307-314.
56. Williams CS, Smalley W, DuBois RN - Aspirin use and potential mechanisms for colorectal cancer prevention. *J Clin Invest*, 1997;100:1325-1329.
57. Baron JA, Cole BF, Sandler RS et al - A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas. *N Engl J Med*, 2003;348: 891-899.
58. Sandler RS, Halabi S, Baron JA et al - A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2003;348:883-890.
59. Zhang Z, DuBois RN - Detection of differentially expressed genes in human colon carcinoma cells treated with a selective COX-2 inhibitor. *Oncogene*, 2001;20:4450-4456.
60. Steinbach G, Lynch PM, Phillips RKS et al - The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*, 2000;342:1946-1952.
61. Kundu N, Fulton AM - Selective cyclooxygenase COX-1 or COX-2 inhibits control metastatic disease in a murine model of breast cancer. *Cancer Res*, 2002;62:2343-2346.
62. Kaur BS, Khamnehei N, Iravani M et al - Rofecoxib inhibits cyclooxygenase-2 expression and activity and reduces cell proliferation in Barrett's esophagus. *Gastroenterology*, 2002;123: 60-67.
63. Singh-Ranger G, Mokbel K - Current concepts in cyclooxygenase inhibition in breast cancer. *J Clin Pharm Ther*, 2002;27:321-327.
64. Wu GD - A nuclear receptor to prevent colon cancer. *N Engl J Med*, 2000;342:651-653.
65. He TC, Chan TA, Kinzler KW - PPAR $\delta$  is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell*, 1999;99:335-345.
66. Barnes CJ, Lee M - Chemoprevention of spontaneous intestinal adenomas in the adenomatous polyposis coli min mouse model with aspirin. *Gastroenterology*, 1998;114:873-877.
67. Lynch HT, Chapelle A - Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2003;348:919-932.
68. Badawi AF, Badr MZ - Expression of cyclooxygenase-2 and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and levels of prostaglandin E<sub>2</sub> and 15-deoxy-delta<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> in human breast cancer and metastasis. *Int J Cancer*, 2003;103:84-90.
69. Eibl G, Reber HA, Wente MN et al - The selective cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide induces apoptosis in pancreatic cancer cells independent of COX-2. *Pancreas*, 2003;26:33-41.
70. Subongkot S, Frame D, Leslie W et al - Selective cyclooxygenase-2 inhibition: a target in cancer prevention and treatment. *Pharmacotherapy*, 2003;23:9-28.
71. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ - Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. *JAMA*, 2001;286: 954-959.
72. Mukherjee D, Nissen SE, Topol EJ - COX-2 inhibitors and cardiovascular risk: we defend our data and suggest caution. *Cleve Clin J Med*, 2001;68:963-964.
73. Whelton A - Renal aspects of treatment with conventional nonsteroidal anti-inflammatory drugs versus cyclooxygenase-2 specific inhibitors. *Am J Med*, 2001;110:(Suppl)33S-42S.
74. Grob M, Scheidegger P, Wuthrich B - Allergic skin reaction to celecoxib. *Dermatology*, 2000;201:383.
75. Knowles S, Shapiro L, Shear NH - Should celecoxib be contraindicated in patients who are allergic to sulfonamides? Revisiting the meaning of 'sulfa' allergy. *Drug Saf*, 2001;24:239-247.
76. Ahmad SR, Kortepeter C, Brinker A et al - Renal failure associated with the use of celecoxib and rofecoxib. *Drug Saf*, 2002;25:537-544.
77. Ernst EJ, Egge JA - Celecoxib-induced erythema multiforme with glyburide cross-reactivity. *Pharmacotherapy*, 2002;22: 637-640.
78. Rocha JL, Fernandez-Alonso J - Acute tubulointerstitial nephritis associated with the selective COX-2 enzyme inhibitor, rofecoxib. *Lancet*, 2001;357:1946-1947.
79. Schneider F, Meziani F, Chartier C et al - Fatal allergic vasculitis associated with celecoxib. *Lancet*, 2002;359:852-853.
80. FitzGerald GA - Parsing an enigma: the pharmacodynamics of aspirin resistance. *Lancet*, 2003;361:542-544.
81. MacDonald TM, Wei L - Effect of ibuprofen on cardioprotective effect of aspirin. *Lancet*, 2003;361:573-574.

## RESUMEN

Carvalho WA, Carvalho RDS, Rios-Santos F - Analgésicos Inibidores Específicos de la Ciclooxygenase-2: Avanzos Terapéuticos

**JUSTIFICATIVA Y OBJETIVOS:** Los antiinflamatorios no-esteroidales (AINE) están entre las drogas más prescritas y usadas en el mundo, incluyendo la utilización en Anestesiología. El propósito de esta revisión es discutir algunos aspectos actuales de la bioquímica de la ciclooxygenase, que viene sirviendo de base para el desenvolvimiento de los nuevos AINE.

**CONTENIDO:** Estas drogas ejercen su acción principalmente a través de la inhibición de la ciclooxygenase (COX), la enzima clave que catalisa la conversión de ácido araquidónico en prostaglandinas y tromboxanos. Por lo menos dos isoformas de la COX ya fueron identificadas, la COX-1, que es constitutivamente expresa en la mayoría de los tejidos, y la COX-2, que es una forma inducible de la enzima localizada principalmente en células y tejidos envueltos en procesos inflamatorios. Con la descubierta de la COX-2 y la determinación de su estructura, fue posible desenvolver drogas más selectivas que reducen la inflamación sin afectar la COX-1, protectora del estomago y riñones, dando origen a una nueva generación de compuestos antiinflamatorios denominados de inhibidores específicos de la COX-2.

**CONCLUSIONES:** No entanto estos compuestos de última generación presenten menor toxicidad para el trato gastrointestinal, otros efectos adversos graves han sido observados, incluyendo insuficiencia renal y efectos cardiovasculares, como el infarto del miocardio y la trombosis. A despecho de estos efectos colaterales, estos nuevos fármacos están siendo testados en otras condiciones clínicas, principalmente en el tratamiento preventivo del cáncer y de la enfermedad de Alzheimer.