

Capítol 2. Inflamació i resposta cel·lular

2.1 Generalitats Farmacològiques

La inflamació és un procés de defensa de l'organisme en la majoria dels casos contra agents invasors externs, però també interns com ara la renovació tissular i altres processos de regulació pròpia de l'organisme [1]; és aquí on radica el màxim interès ja que la mateixa inflamació és causa d'algunes reaccions no desitjables, per exemple avui en dia hi han nombrosos estudis que la relacionen amb malalties com l'asma, el càncer, l'Alzheimer, el Parkinson, l'esclerosi múltiple o el mateix envelliment cel·lular.

2.2 La reacció inflamatòria

La inflamació comprèn a un conjunt de reaccions en cascada que en definitiva originen el que coneixem com inflamació. Estructuralment totes les cèl·lules de l'organisme tenen una doble membrana formada per fosfolípids i proteïnes que selectivament permeten el pas de nutrients i de metabòlits des de l'interior a l'exterior de la cel·lula i viceversa. Quan un agent invasor provoca el trencament d'aquesta membrana per lesió mecànica o invasiva, els fosfolípids de la membrana s'alliberen i són substracte de l'enzim Fosfolipasa A₂ generant el primer producte de la cadena de reaccions: l'àcid araquidònic. La figura 1 representa aquesta formació amb la consegüent cadena de reaccions que se'n deriven i que constitueixen la inflamació.

Estructuralment l'àcid araquidònic és un àcid gras format per una cadena hidrocarbonada de 20 àtoms de carbó i amb quatre dobles enllaços que fan que sigui una estructura hidròfoba i susceptible de ser fàcilment oxidada. L'àcid araquidònic és transformat en una primera etapa en prostaglandina PGG₂ i en una segona en PGH₂. L'enzim responsable d'aquesta doble conversió és la prostaglandin-H-sintasa (PGHS). Una vegada sintetitzada la PGH₂ serà substrat de dos enzims específics com són la tromboxàsintasa i la prostaciclinsintasa [2-4], que sintetitzen respectivament als tromboxans (TXA₂ i TXB₂) i a les prostaciclins (PGL₂).

Els tromboxans i les prostaciclins tenen efectes contraris, així mentre els tromboxans són agregants plaquetaris i causen vasoconstricció, les prostaciclins tenen l'efecte oposat, és a dir són anti-agregants plaquetaris i causen vasoconstricció.

Depenent del tipus de situació en què es trobi l'organisme l'equilibri estarà més desplaçat cap a una activació de la tromboxàsintasa o de la prostaciclinsintasa, per exemple en situacions d'hemorràgia en la qual és patent un trencament d'un vas sanguini es troba molt més activada la tromboxàsintasa.

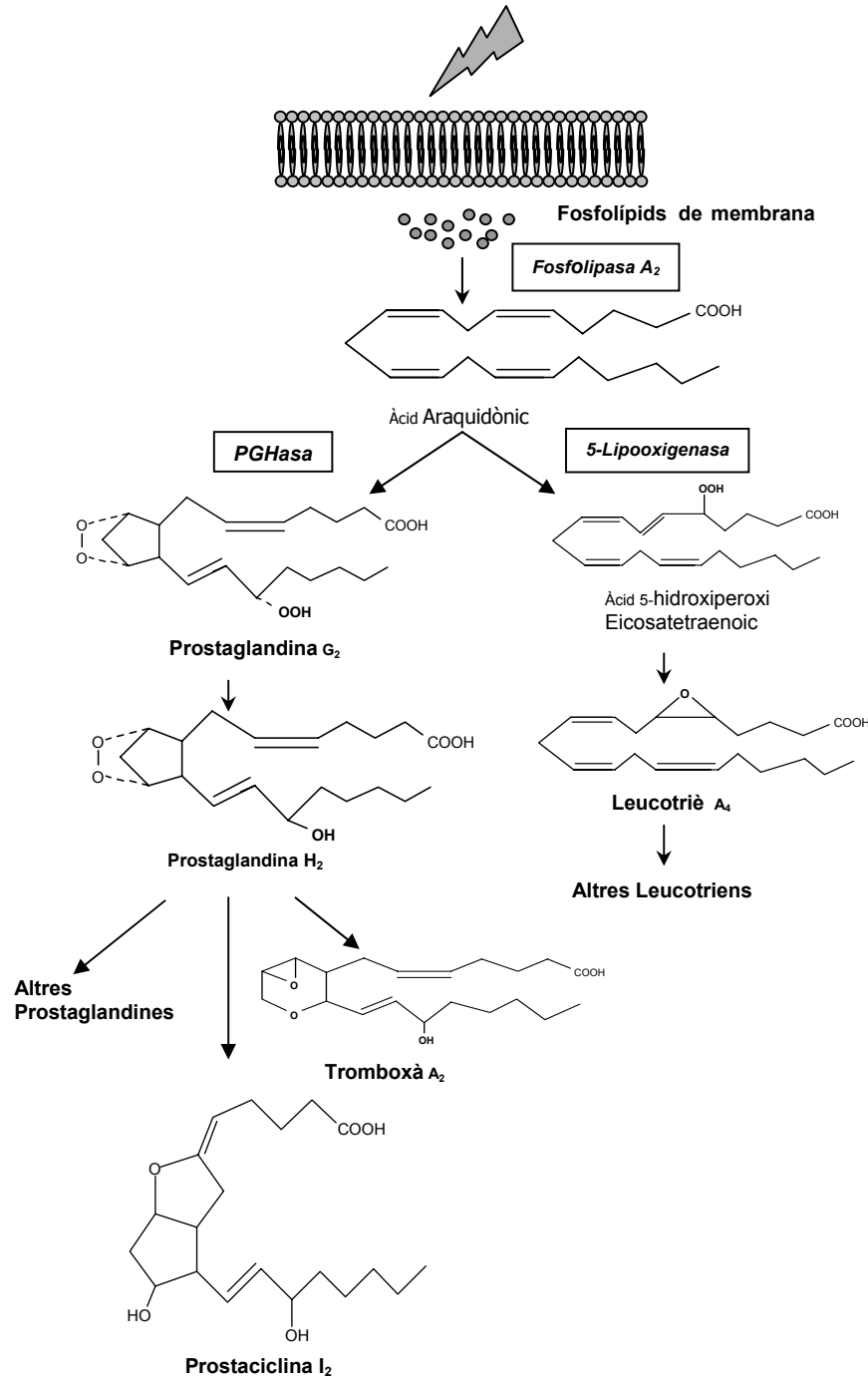


Figura 1. Representació seqüencial del conjunt de reaccions que integren el mecanisme de la inflamació i que deriven dels fosfolípids alliberats per la lesió de la membrana cel·lular.

D'altra banda part de la PGH_2 es transformada per la mateixa PGHS a altres prostaglandines com són la PGE_2 , PGD_2 i la PGF_2 que participen tant en processos directament relacionats amb la inflamació com en altres processos fisiològics, així la PGE_2 protegeix la mucosa gàstrica incrementant la producció de mucosa, a nivell perifèric causa vasodilatació i broncodilatació.

En canvi la PGF_2 tindria efectes contraris a la PGE_2 : sent vasoconstrictora i provocant broncoconstricció sent causa de l'asma quan es trobi més augmentada que la PGE_2 . A més les PGE_2 i PGD_2 tenen acció estimuladora de la desgranulació d'una classe de basòfils anomenats mastòcits que es troben en els teixits i amb el seu trencament alliberen histamina i cinines, que són substàncies relacionades amb el dolor i l'augment local de la temperatura com mecanisme de defensa del propi organisme.

Paral·lelament l'àcid araquidònic és també substrat de la 5-lipooxigenasa, formant l'intermediari àcid 5-hidroperoxi-eicosatetraenoic que ràpidament donarà lloc a la sèrie de leucotriens, el primer en formar-se és el leucotriè A_4 (LTA_4) que per oxidació amb una molècula d'aigua forma el leucotriè B_4 (LTB_4).

Els leucotriens són molt quimiotàctics i afavoreixen que ràpidament els monòcits i altres leucòcits com els PMN (polimorfonucleats) arribin al lloc de la lesió. Els monòcits es transformarien en macròfags fagocitant d'una banda possibles elements invasors (virus, bacteries) i per l'altra participen en la digestió de fibres i restes cel·lulars generats per la lesió. Els leucotriens també estan involucrats en altres processos fisiopatològics com ara el LTB_4 en la renovació de la mucosa gàstrica, sent responsable de certes úlceres gàstriques [5], per exemple el LTC_4 i LTD_4 incrementen l'activitat broncoespàstica i estimulen la secreció de mucosa en vies respiratòries altes relacionant-los amb l'asma.

Com veiem en la inflamació intervenen un gran nombre de reaccions i substàncies que es formen, es sintetitzen o activen sent un procés complex però alhora efectiu i encara que en menor grau és també susceptible de ser desequilibrat per causes genètiques o alienes a l'organisme. És precisament aquí, en aquest desequilibri on radica el màxim interès de crear fàrmacs que puguin inhibir puntualment a certs enzims, evitant que es formin certs mediadors o activadors que causen una resposta no desitjable per l'organisme.

2.3 La Prostaglandin H sintasa

La Prostaglandin H sintasa (PGHS), és l'enzim responsable de la transformació de l'àcid araquidònic en PGG_2 i posterior conversió en PGH_2 sent objecte en els darrers anys de nombrosos estudis [6-9], segons els quals la PGHS constaria de dos centres catalítics un ciclooxigenasa (COX) i un altre peroxidasa (POX). Com és mostra en la figura 2, aquests dos centres catalítics actuarien de forma seqüencial:

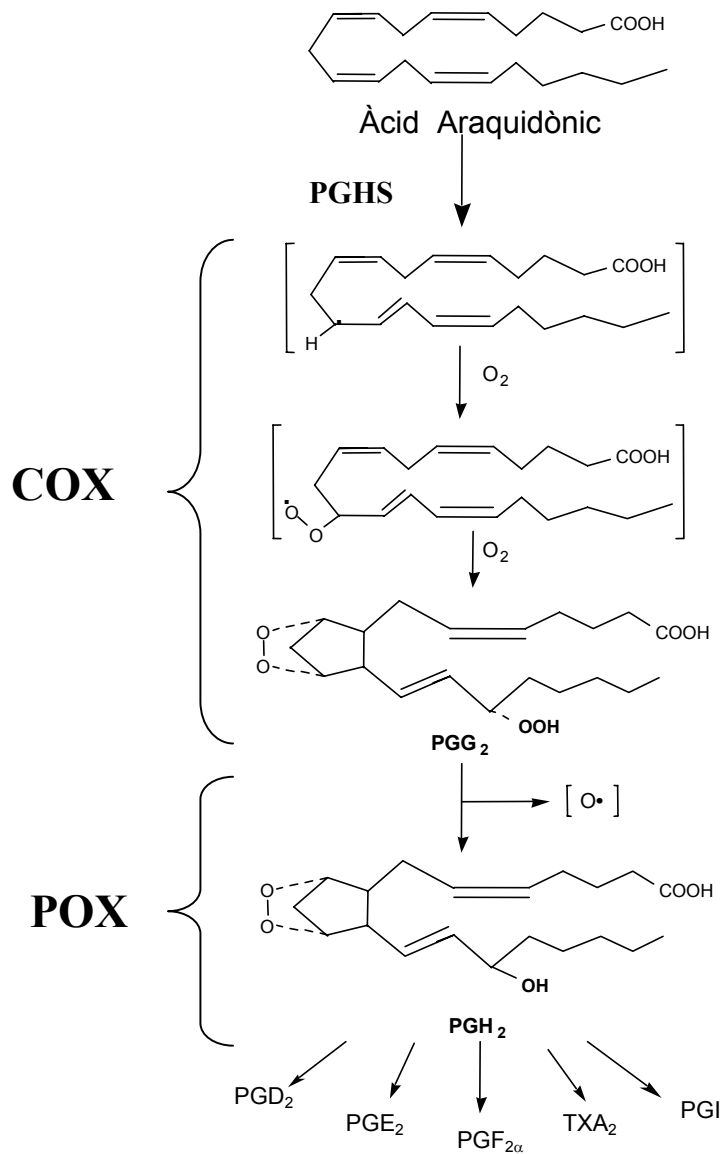


Figura 2. Acció seqüencial dels dos centres catalítics de la PGHasa sintasa

El centre actiu ciclooxigenasa (COX) en una primera etapa [7,67] causa l'abstracció de l'àtom d'hidrogen 11-pro-S generant en el C-11 un radical susceptible de reaccionar en

una segona etapa amb l'oxigen molecular formant el 11-peroxil radical. A aquesta reacció seguiria un procés de ciclació i posterior atac d'una segona molècula d'oxigen en el C-15. La reducció d'aquest nou radical peroxil formaria finalment la PGG₂.

D'altra banda el centre actiu peroxidasa (POX) consta d'un grup hemo i seguiria un mecanisme molt similar al d'altres peroxidases com són el citocrom C o la mateixa peròxid dismutasa, la seva acció seria bàsicament la reducció del grup peròxid de la PGG₂ a alcohol, formant una nova prostaglandina, la PGH₂.

En la figura 3 es mostren aquests dos centres catalítics com es disposen en la molècula de la PGHS.

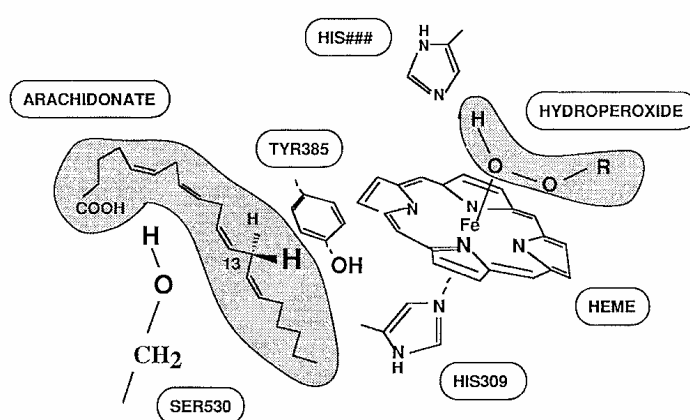


Figura 3. Disposició estructural del substrat àcid araquidònic en els centres d'acció catalítica ciclooxigenasa i peroxidasa segons el model de Smith i Marnett [7,67]

La COX presenta tres formes isomòrfiques: la COX1, la COX2 i recentment s'ha descobert una tercera: la COX3. La primera és constitutiva de gairebé totes les cèl·lules i apareix en major concentració en vasos sanguinis, estómac i ronyons, permetent que es mantingui una concentració basal de PG (prostaglandines) que tindrien un paper citoprotector de la mucosa gàstrica, també amb funció de vascularització renal, gàstrica i uterina [9].

La COX2 normalment no apareix, però pot ser induïda ràpidament per alguns factors sèrics, citocines, el complement, hormones, endotoxines i factors de creixement. Es troba incrementada en malalties inflamatòries cròniques especialment en l'artritis reumatoide i en l'osteoartritis [65-66].

La COX-2 també s'expressaria fàcilment en determinats teixits estimulables per agents proinflamatoris com per exemple certes parts del colon. Recentment hi han estudis que

estan demostrant la producció de COX-1 i COX-2 en les neurones relacionant la seva acció amb malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer o el Parkinson [15]. Sembla ser que la sobreexpressió de la COX-2 en el SNC seria causa de la neurodegeneració i els nivells de COX-2 es mantindrien elevats immediatament a la lesió i que en els mesos següents l'elevació seria de l'isoenzim COX-1 [15].

És per aquest motiu que l'evolució dels AINE en els últims anys és la de dissenyar nous antiinflamatoris que puguin inhibir selectivament als isoenzims de la COX. Aquests nous inhibidors s'administrarien segons convingui en l'estadi de la malaltia en què es trobi el pacient i tindrien menor grau de lesions gastrointestinals i altres efectes secundaris que els antiinflamatoris clàssics.

En la figura 4 es representen de forma comparada els locus de les dues isoenzimes COX1 i COX2. La COX-2 presenta en comparació amb la COX-1, un locus de major volum amb una cavitat hidrofòbica més extensa (*side pocket*) que seria lloc d'unió d'alguns AINE i els diferenciaria en quan a selectivitat per la unió amb la COX-2 [10].

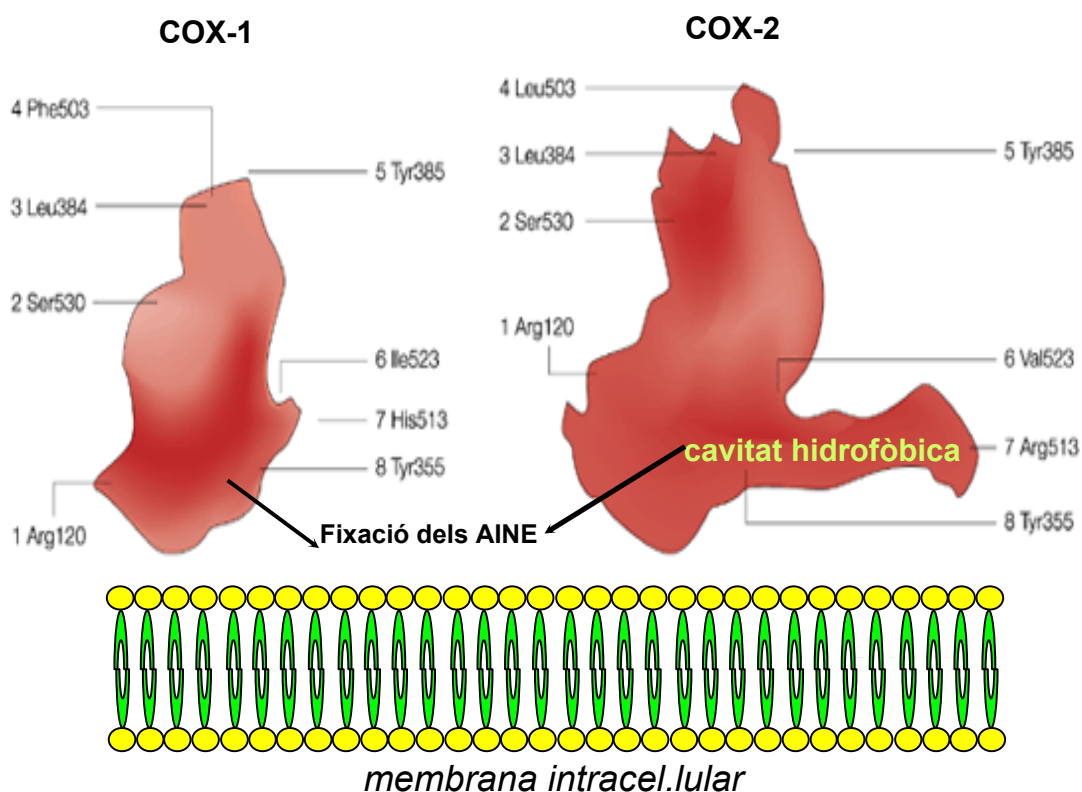


Figura 4. Comparació del locus de les dues isoenzimes COX1 i COX2.

Recentment, el grup de Dan Simmon's [11] ha descobert l'existència d'una tercera

forma isomòrfica: la COX3, aquesta s'expressaria en major grau en el cervell sent molt sensible a certs analgèsics tipus paracetamol (acetaminofè), descobrint que explicaria l'interrogant que va plantejar 33 anys enrera (1970) el professor John Vane quan comparà les accions de l'aspirina amb el paracetamol i no podia explicar les diferències d'acció entre aquests dos compostos. El fet que la COX3 s'expressa en cervell i és més sensible al paracetamol explicaria els efectes analgèsics i antipirètics d'aquest últim més que antiinflamatoris.

La COX-3 manté les propietats de la COX1 i COX2, però la presència d'un intron en l'ARNm que l'ha de traduir fa que tingui una cadena extra de 30 aminoàcids més en l'extrem amino-terminal [11-12]. També s'ha trobat en menor grau en l'aorta i teixit cardíac. És inhibida per analgèsics tipus paracetamol, diclofenac, ibuprofèn i antipirètics com l'antipirina, aminopirina, i fenacetina, sent aquests últims inactius per la COX1 i COX2.

Aquest nou descobriment de la COX3 unit a l'interès que tenen els inhibidors de la COX2 en el tractament de malalties com el Parkinson, [13], l'Alzheimer [14-15] o el càncer de colon [16] fan que des d'un punt de vista farmacològic l'estudi de la COX sigui fascinant i l'interès pel seu estudi augmenti espectacularment.

2.4 La 5-lipoxigenasa

Part de l'àcid araquidònic sintetitzat per la fosfolipasa-A2 és també substrat d'un altre enzim: la 5-lipoxigenasa (5-LOX), es tracta d'un enzim citoplasmàtic que forma als productes de la sèrie dels leucotriens que tenen un paper importat en la inflamació.

Com veurem alguns leucotriens són quimiotàctics de neutròfils que arriben al lloc de la lesió per tal de neutralitzar als possibles agents invasors [1].

La figura 5 mostra la seqüència de reaccions que catalitzaria la 5-LOX, on una molècula d'oxigen molecular s'uniria al C5 de l'àcid araquidònic formant l'àcid 5-hidroxi-peroxieicosatetraenoic (5-HPETE) que en una segona etapa de ciclació i posterior deshidratació forma el leucotriè A₄ (LTA₄), part d'aquest és transforma en leucotriè B₄ i part es conjuga amb una molècula de glutation formant els altres leucotriens de la sèrie C₄, D₄ i E₄ en funció dels residus aminoacídics amb els que estiguin units.

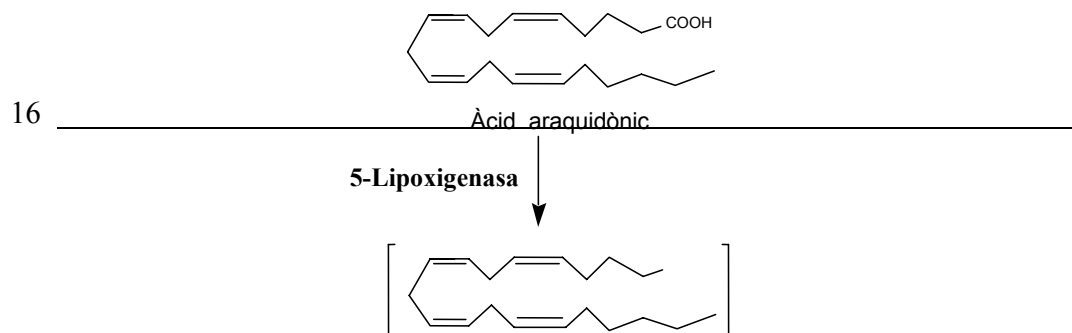


Figura 5. Reaccions seqüencials en la síntesi de leucotriens catalitzades per la 5-LOX

El LTB₄ tindria uns receptors dins de la membrana nuclear de forma que la seva unió regularia la transcripció nuclear de certs gens [20]. La 5-LOX també s'expressa en les neurones del sistema nerviós central i hi han estudis [21-22] que relacionen l'increment de la seva activitat enzimàtica amb la neurodegeneració [23,46].

Com altres lipoxigenases la 5-LOX conté un ferro no lligat a un grup HEMO si no que està coordinat amb sis histidines proximals [17-18]. Aquest àtom de ferro que actuaria com coenzima és essencial per l'activitat lipoxigenàsica i podria presentar dos possibles

estats d'oxidació: Fe^{2+} i Fe^{3+} . Estudis sobre el mecanisme d'acció [19] demostren que la màxima activitat correspondria a l'estat fèrric.

Ja que aquest estat fèrric que interaccionaria amb major facilitat amb l'àcid araquidònic (AH) i es produiria l'abstracció del H del C5 obtenint el corresponent radical pentadienil ($\text{A}\cdot$) que amb posterior reacció amb l'oxigen molecular formaria el radical hidroperoxid ($\text{AOO}\cdot$) amb capacitat d'abstracció d'un nou hidrogen d'una nova molècula d'àcid araquidònic formant l'hidroperoxid (5-HPETE) i regenerant-se l'enzim a la forma oxidada. El procés es tornaria a repetir ara amb el 5-HPETE formant-se després d'una ciclació a epoxid del LTA4 que donaria lloc a altres leucotriens com el LTB4.

La inhibició de la 5-LOX té un gran interès farmacològic, ja que per una banda amb la seva inhibició s'equilibra l'augment de síntesi de leucotriens i per l'altra s'afegeixen els efectes beneficiosos de la disminució de quimiotaxis, disminució de la permeabilitat vascular. Els inhibidors de la 5-LOX són efectius contra processos asmàtics, de rinitis, i sinusitis al·lèrgica també hi han estudis que els relacionen com preventius del càncer de colon [24].

2.5 Radicals lliures i malalties degeneratives

Al llarg de la seva vida tot ésser viu està sotmès a una sèrie de canvis bioquímics i fisiològics que a la llarga deriven en un envelliment cel·lular provocant en certs casos una pèrdua de la informació o del control a nivell cel·lular [25]. La causa fonamental d'aquest procés és una reacció de les cèl·lules amb els productes derivats de l'oxigen. Aquestes espècies químiques altament reactives i difícilment aïllables foren definides com radicals lliures per Ostwald en 1896. Als anys 60 els professors Gerschman i Harman estableixen la teoria gerontològica dels radicals lliures segons la qual l'envelliment de l'home i dels animals no és més que un efecte secundari de l'intens metabolisme aerobi de les cèl·lules que experimenten un procés irreversible de diferenciació. Aquest envelliment estaria més accentuat quan major és el desequilibri entre les oxidacions no controlades i les defenses antioxidants del propi organisme [26].

Però ara sabem que l'efecte nociu dels radicals lliures no només es limita a l'envelliment cel·lular si no que a més com hem vist en l'anterior apartat molts dels intermedis de reacció del procés inflamatori són radicalaris, a més els radicals lliures són responsables de la isquèmia i de molts processos degeneratius com el càncer,

l'amiloïdosi, certes immunodeficiències, l'arterioesclerosi, l'esclerosi múltiple, l'Alzheimer i el Parkinson entre altres [13-15 ,26].

Per tant, la supervivència d'un organisme aerobi en un ambient oxigenat depèn en gran mesura de la seva capacitat per controlar les espècies químiques reactives. Aquests mecanismes de control que té l'organisme es fonamenten en unes molècules que captarien a aquests radicals lliures neutralitzant-los tal i com fan els sistemes tampó amb els agent agressius àcids o bases. Aquestes molècules que capten els radicals lliures i els neutralitzen són els *scavengers*.

També l'organisme compta amb alguns sistemes enzimàtics capaços de neutralitzar als radicals lliures [27-28].

Com veiem les interaccions dels radicals lliures amb els sistemes biològics són d'un gran interès donat que així podem conèixer amb exactitud el mecanisme d'aquestes malalties degeneratives, la seva evolució, el seu tractament i el que és més important el seu control preventiu, evitant si fos possible el seu desenvolupament prematur.

Però arribat a aquest punt que entenem per un radical lliure ?

Un *radical lliure* és un àtom, un grup d'àtoms o una molècula en un estat electrònic amb un electró desaparellat que ocupa l'orbital més extern.

Quan el radical a més té càrrega positiva o negativa s'anomena *ió radical*. I si el nombre d'electrons desaparellats és de dos que ocupen dos orbitals externs, aleshores estaríem davant un *birradical*, per exemple el O₂ molecular, però el més habitual és trobar un únic electró desaparellat, el qual té gran tendència a interaccionar amb un altre similar, formant un par i per tant un enllaç químic. Aquestes etapes transcorren de forma consecutiva:

- **iniciació** és la primera etapa i comprèn la formació del radical lliure que al trobar-se en una concentració molt baixa s'anomena *steady state* i pot produir-se per múltiples causes tan naturals com la mateixa acció de la llum (fotolisi o radiolisi), per oxidació (o reducció) enzimàtiques sent en la majoria dels casos

les peroxidases els enzims més habituals, així l'oxigen molecular amb reacció redox amb un element metàl·lic com el ferro podria originar al radical superòxid:



També poden haver altres substàncies que generin aquests radicals com les amines, fenols, peròxids i alcohols.

- **propagació**, és una conversió o transformació del radical inicial, però sempre originant una altra espècie reactiva. Aquestes poden continuar en cadena o bé finalitzar en l'etapa de terminació. Així en l'equació 2.2 el radical superòxid es transformat en radical hidroxil per reacció amb una molècula de peròxid d'hidrogen:

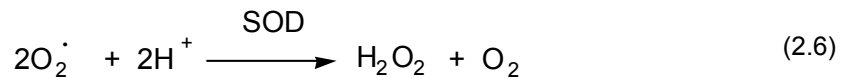


- **terminació**, el radical lliure ara transformat en una altra espècie química també radicalària es combinaria amb un altre radical formant una molècula estable tal i com mostrarien les equacions 2.3-2.5.



Aquesta fase de terminació també succeeix quan el radical és atrapat per un segretador (*scavenger*) com la mateixa vitamina E. En aquest sentit s'ha demostrat que quan aquests captadors de radicals baixen la seva concentració per esgotament, augmenta el risc de perdre la integritat cel·lular amb la consegüent aparició de mutacions, càncer, envelliment, inflamació i malalties neurodegeneratives.

També s'ha demostrat que alguns enzims participen en aquesta fase de terminació de radicals amb una homeostasi redox. A mode d'exemple tindriem diverses catalases, peroxidases o la mateixa la superòxid dismutasa (SOD) catalitzen una reacció de dismutació amb formació de H_2O_2 (equació 2.6), que finalment és reduïda a aigua per la posterior acció d'una catalasa o d'una peroxidasa.



Però en els sistemes biològics la capacitat reactiva del radical lliure depèn d'altres factors que poden reduir o accentuar el dany cel·lular, aquests factors serien entre altres la influència del dissolvent, la natura del medi on s'ha generat el radical i la concentració d'aquest.

Aquesta reactivitat perquè una substància A reaccioni amb un radical lliure R^{\cdot} vindria definida per l'equació 2.7.

$$(\text{Reactivitat}) A = [A] \times K_{AB} \quad (2.7)$$

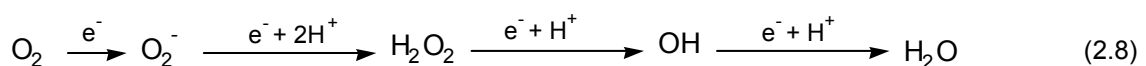
on K_{AB} seria la constant de velocitat de la reacció que multiplicaria a la concentració de la substància A.

Aquesta equació tindria interès per el disseny d'inhibidors de radicals lliures que actuessin com segrestadors en un medi definit amb unes propietats de solubilitat i estabilitat ben estudiades perquè la reactivitat sigui màxima.

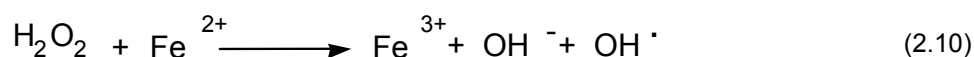
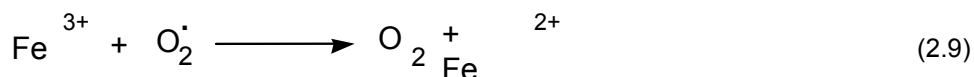
La velocitat de reacció dependria d'efectes termodinàmics en els quals tindria una especial rellevància les propietats hidrofíliques - hidrofòbiques dels scavengers que han de neutralitzar el radical que es genera en un medi concret. En aquest sentit els fosfolípids de la membrana cel·lular o els α -tocoferols que conté inserits en ella podrien actuar de segrestadors en medis més hidrofòbics.

Igualment, si el radical lliure es genera en compartiments iònics o aquosos com seria el medi extracel·lular, aleshores també existirien segrestadors més hidrofílics que podrien neutralitzar-lo, per exemple la vitamina C o àcid ascòrbic.

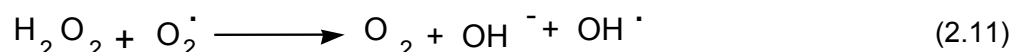
En la natura la gran majoria dels radicals es formen a partir de l'oxigen molecular O_2 degut a la seva presència en els organismes vius, el O_2 al ser una espècie molt electronegativa capta electrons amb facilitat formant l'anió superòxid el qual es transformaria en productes intermedis successius peròxid d'hidrogen i radical hidroxil per reduir-se finalment a aigua:



Un dels radicals lliures més abundants en els sistemes biològics és el radical hidroxil OH[•] diferents autors han coincidit en el mecanisme de producció d'aquest radical principalment per reducció del H₂O₂ per ions metàl·lics.



També poden generar-se radicals hidroxil per transferència d'electrons a nivell microsomal a partir de l'anió superòxid mitjançant la reacció d'Haber-Weiss representada en l'equació 2.11:



La participació dels radicals lliures en la pèrdua de la integritat de les cèl·lules està demostrada. Per altra part també hi han estudis que relacionen a enzims que participen en la inflamació com la ciclooxigenasa en malalties com l'Alzheimer. Actualment, el nombre de persones que pateixen aquesta malaltia a l'estat espanyol s'eleva a mig milió de persones (la prevalença d'aquesta patologia podria ser més alta ja que no tots els casos estan declarats) i la xifra podria augmentar fins al milió i mig, l'any 2025, a conseqüència de l'envelliment de la població [29].

L'Alzheimer i les malalties neurodegeneratives com el Parkinson són la tercera causa de mort en els països desenvolupats després de les malalties cardiovasculars i del càncer. A més, repercuteixen en tota la societat a causa del caràcter irreversible que té, la manca tractament curatiu i la càrrega que representa per als familiars dels malalts.

Els símptomes inicials més freqüents són la pèrdua de memòria episòdica i la desorientació tempo-espacial ocasional i transitòria. Recents investigacions [30,31] demostren que la concentració en cervell de l'enzim ciclooxigenasa seria directament proporcional al grau d'Alzheimer i neurodegeneració.

Així han detectat un increment de la forma isomòrfica de la ciclooxigenasa COX2 en les neurones de l'hipocamp (una de les regions del cervell amb major risc de

neurodegeneració) i utilitzen aquesta concentració com un paràmetre per avaluar el grau de progressió de l'Alzheimer [32,33].

En estudis post-mortem troben una elevació de COX2 en les dendrites de pacients en avançat estat de la malaltia [34]. La COX2 a més de produir les prostaglandines estaria relacionada amb la producció i posterior agregació del pèptid β -amiloïde que en els primers estadis de la malaltia forma uns agregats anomenats plaques neurítiques que dificultarien la transmissió de l'impuls nerviós i serien responsables de la demència i altres trastorns neuronals i neuromusculars.

Paral·lelament i tal com es representa en la Figura 6, les prostaglandines augmenten l'expressió genètica de les citokines, unes substàncies que participen activament en la neurodegeneració [32, 36].

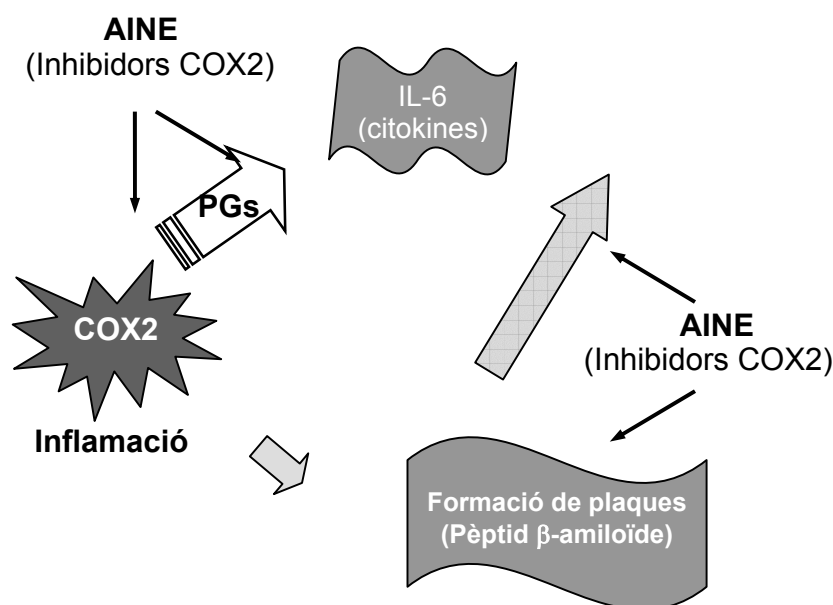


Figura 6. Importància de la inhibició de la COX2 en la progressió de l'Alzheimer

Els inhibidors selectius de la COX2 tindrien una doble acció, per una banda evitarien la formació de prostaglandines i per l'altra evitarien la formació de les plaques de pèptid β -amiloïde.

És per això que actualment el tractament de l'Alzheimer ha incorporat amb èxit alguns compostos AINE clàssics com l'ibuprofèn, el piroxicam, meloxicam, el flurbiprofèn [37-39] i altres de nova generació com el celecoxib (Celebrex[®], Pharmacia) i el rofecoxib (Vioxx[®], Merck), aquest tractament redueix la simptomatologia de la malaltia i s'ha

demostrat que [40-41] són més efectius com antiinflamatoris que els compostos blocants del calci que inicialment s'havien administrat i que ja s'han descartat per els seus efectes secundaris.

Així estudis histològics en teixit neuronal de l'hipocamp i de la microglia revelen que tant el tractament amb ibuprofèn [39,42] , nitroflurbiprofèn (NCX-2216) [43] com el mateix rofecoxib disminueixen la presència del S-100- β (un pèptid β -amiloide) i d'una citokina l'IL-1- β [44] .

Però altres investigadors [15] (Schwab 2003) suggereixen que no s'ha d'oblidar la inhibició de la COX-1, ja que si bé la COX-2 és responsable de la neurodegeneració i la seva expressió es manté elevada en els dies següents a la lesió neuronal, la COX-1 tendeix a acumular-se i infiltrar-se en el SNC en les setmanes i mesos següents tal i com mostra la figura 7.

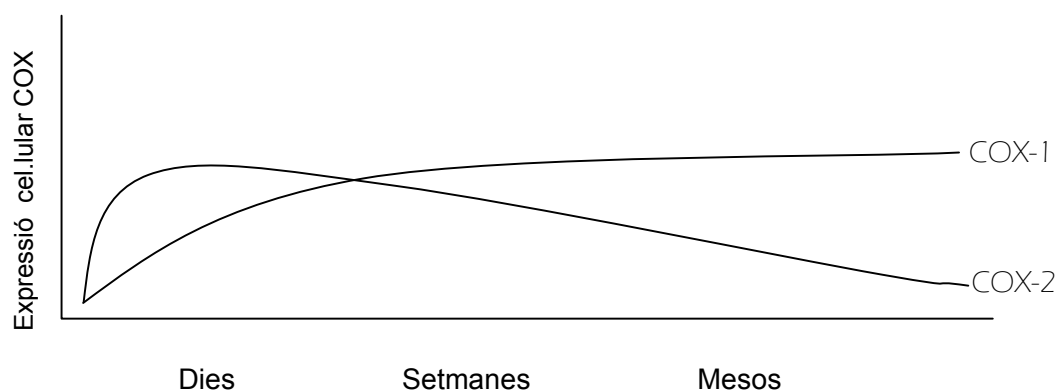


Figura 7. Nivells d'expressió cel·lular segons Schwab [15] de la COX després d'una lesió en el SNC. La COX-1 s'extravassa, envaeix, i persisteix durant molt temps en el parènquima lesionat del SNC.

D'altra banda a més de la COX també existiria un segon enzim que podria estar relacionat amb les malalties neurodegeneratives: és la 5-LOX, a l'igual que la COX2, intervé (com s'ha vist en l'apartat 2.4)en la inflamació i també s'expressa en el sistema nerviós. S'ha demostrat que la 5-LOX participa en el desenvolupament neuronal i en l'activació dels receptors dels pèptids opioïdes [45].

És també coincident amb la COX, que l'increment anormal de síntesis de 5-LOX és

nociu per la transmissió de l'impuls nerviós i en conseqüència seria causa de neurodegeneració [46]. En aquest sentit s'estan fent estudis per demostrar d'una forma més taxativa la implicació de la 5-LOX amb les malalties neurodegeneratives, aquests estudis ara per ara impliquen a una proteïna: la proteïna FLAP en l'activació anormal de la 5-LOX en el soma de les neurones [47], tanmateix i en fase d'assaigs clínics es troben alguns compostos AINE inhibidors duals de la COX i 5-LOX [48].

Aquests inhibidors duals podrien ser en un futur la base del tractament preventiu de les malalties neurodegeneratives [48].

2.6 Mecanismes i grups de fàrmacs antiinflamatoris

A l'any 1971 el professor John Vane descobreix que l'àcid acetilsalicílic i la indometacina fan disminuir la síntesi de les PG inhibint l'activitat de la COX. Aquest investigador suggereix que les activitats antiinflamatòries, antipirètiques i antiàlgiques dels AINE (antiinflamatoris no esteroïdals) poden explicar-se per la seva acció inhibidora de la formació de les PG [2].

Per tant, els fàrmacs antiinflamatoris poden tenir quatre possibles mecanismes d'acció:

- 1) Inhibidors de la fosfolipasa A₂, eviten la formació de l'àcid araquidònic a partir dels fosfolípids de membrana. El grup d'antiinflamatoris amb aquest mecanisme són els antiinflamatoris esteroïdes, per exemple la família dels corticoesteroïdes. En aquest mecanisme al no formar-se l'àcid araquidònic, s'anul·len també les vies de la COX1 i 2 i a més de la 5-LOX, fet que hem vist que no convé en absolut, ja que l'organisme necessita una concentració basal de PG. És per això, que aquests inflamatoris presenten un gran nombre d'efectes secundaris que en principi desaconsellen el seu ús.

- 2) Inhibidors de la COX, amb el qual no es formen les prostaglandines. És el grup més nombrós i en els darrers anys l'evolució d'aquest grup ha estat en dissenyar fàrmacs que inhibeixin selectivament a la COX2, respectant al màxim l'activitat de la COX1, que és la que sintetitza la concentració basal de PG necessàries per l'organisme. Segons la seva cinètica d'inhibició, s'agrupen alhora en quatre subgrups [49] :

- 2.1) Inhibidors irreversibles de la COX1 i COX2, com l'aspirina i els salicilats

que causen un bloqueig covalent d'ambdues formes isomòrfiques mitjançant una acetilació d'una serina que l'impedeix recuperar la activitat de l'enzim, d'aquí que siguin eficaços, però presenten l'inconvenient de produir efectes secundaris no desitjables.

2.2) Inhibidors reversibles temps-independents de la COX1 i COX2, competeixen amb el substracte àcid araquidònic per la unió amb el locus del receptor. Inhibidors d'aquest grup serien l'ibuprofèn, el naoprèn, el piroxicam o l'àcid mefenàmic.

2.3) Inhibidors reversibles temps-depenents de la COX1 i COX2, la seva inhibició és temporal, amb el qual l'enzim pot recuperar la seva activitat. Aquesta inhibició seria per una interacció iònica preferiblement del grup carboxílic. Són fàrmacs representatius d'aquest grup el diclofenac, la indometacina, el flurbiprofèn i l'àcid meclofenàmic que inhibirien tant a la COX1 com a la COX2. Mentre que el sulindac mostra una major activitat com inhibidors selectius de la COX1 que com COX2.

2.4) Inhibidors reversibles temps- independents de la COX-1 i temps-depenents de la COX2, també anomenats *slow-releasing* ja que inhibeixen selectivament la COX2 amb un mecanisme reversible però tan lent que fa que sigui quasi irreversible.

Dins d'aquest grup trobem el celecoxib (Celebrex[®], Pharmacia) i el rofecoxib (Vioxx[®], Merck) que es representen en la figura 8a [50-51].

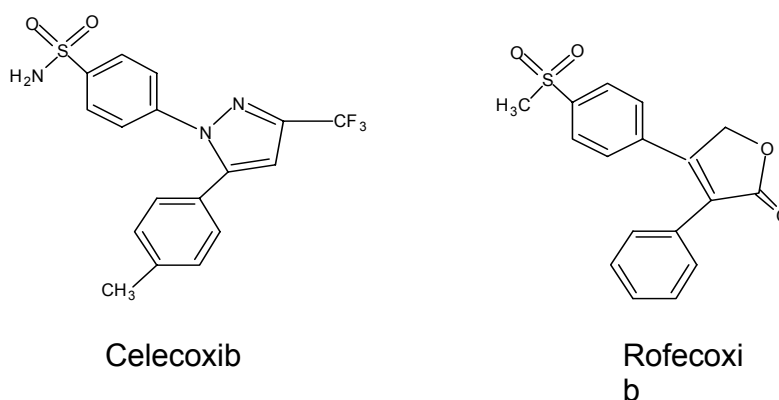


Figura 8a. Celecoxib i rofecoxib dos nous inhibidors selectius COX-2 amb mecanisme *slow-releasing*.

- 3) Inhibidors de la 5-LOX, fins a l'anys 1980 els laboratoris farmacèutics no es van plantejar les propietats terapèutiques dels inhibidors de la 5-LOX. Segons el seu mecanisme d'inhibició trobaríem diferents subgrups [52]:
- 3.1) Inhibidors redox, actuarien per un mecanisme de transferència d'electrons reduint el ferro de Fe^{3+} a Fe^{2+} , amb el qual la 5-LOX quedaria temporalment inactivada, però aquests antiinflamatoris per poder accedir al locus on es troba el ferro han de tenir un petit tamany i ser lipofíliques. En aquest grup es trobarien els fenols, quinones i dihidroquinones. Són compostos d'aquest grup la menadiona i el BW-755C. Encara en fase d'assaigs toxicològics es trobarien el L-649, E-608 i ICI-207.
 - 3.2) Queladors del ferro, aquests fàrmacs formarien un complex estable amb el ferro inactivant temporalment així a l'enzim. En aquest subgrup es trobarien compostos fenòlics, derivats de la *N*-hidroxi-urea i àcids hidroxicinàmics. Alguns exemples serien el Zileuton, A-631, ABT-761, i el BW-A4C.
 - 3.3) Inhibidors competitiu, serien compostos que actuarien per un mecanisme no redox i podrien unir-se al centre actiu de lla 5-LOX amb una unió estereoespecífica. Són exemple d'aquest subgrup compostos en fase clínica molt avançada com el ZM-211, ZM-230, o el L-739.
 - 3.4) Inhibidors de la proteïna FLAP, la proteïna FLAP seria una substància que seria necessària per la catàlisi de la 5-LOX. De forma que inhibint a la FLAP també s'inhibiria la síntesis de leucotriens. Són exemple el MK-886, BAY-X-1005 o el REV-5901.
- 4) Neutralització dels radicals lliures iniciadors i/o mediadors del procés inflamatori, és un mecanisme propi d'un reduït grup d'antiinflamatoris no esteroïdals com els fenols [53] salicilats i di-*tert*-butil-fenols. Sembla probable que alguns dels antiinflamatoris que presenten un mecanisme d'inhibició reversible (fenamats, fenilbutazona) o irreversible (aspirina) de la PGHS a més podrien tenir un mecanisme relacionat amb la neutralització de radicals que intervenen en la inflamació. Aleshores, el seu mecanisme podria catalogar-se com inhibidors reversibles tant de la COX-1 i 2 com de la 5-LOX temps-independents. Aquest grup d'antiinflamatoris tindrien una marcada activitat analgèsica, antiàlgica i antipirètica a més d'antiinflamatòria.

- 5) Inhibidors duals de la COX2 i 5-LOX, constitueix un grup de gran interès farmacològic [54-60]. Molts laboratoris farmacèutics han fet un gran esforç per desenvolupar compostos d'aquest grup que inclou a compostos amb grups di-*tert*-butil-phenol, guanidino o fenamat [61]. Aquests esforços han obtingut com a resultats compostos com la tepoxalina, la tebufelona, el flobufèn, ML-3000, CBS-1108, BF-389, BW755C, S-2474, ER.34122, BW-B70C, R-815 o el CI-987, alguns d'aquests fàrmacs estan representats en la figura 8b.

2.7 Futurs fàrmacs antiinflamatoris

Els efectes secundaris dels AINE estan vinculats a la inhibició de les PG que en condicions normals es trobarien en una certa concentració basal i que haurien estat sintetitzades per la COX1.

Els nous AINE que es dissenyen actuen selectivament sobre la COX2 presentant un millor perfil de seguretat al causar en molt menor grau lesions gastrointestinals que la dels antiinflamatoris clàssics.

Ara bé, en determinades situacions o en determinats teixits també és fa necessari inhibir parcialment (inflamació) o totalment (asma, malalties neurodegeneratives) la síntesi dels leucotriens i això pot aconseguir-se inactivant la 5-LOX.

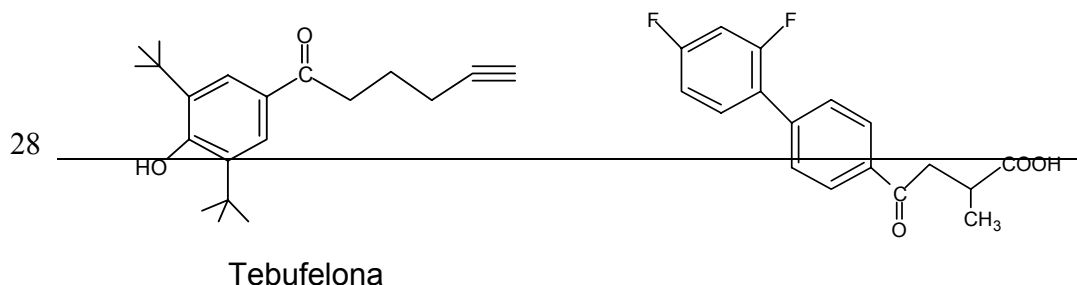
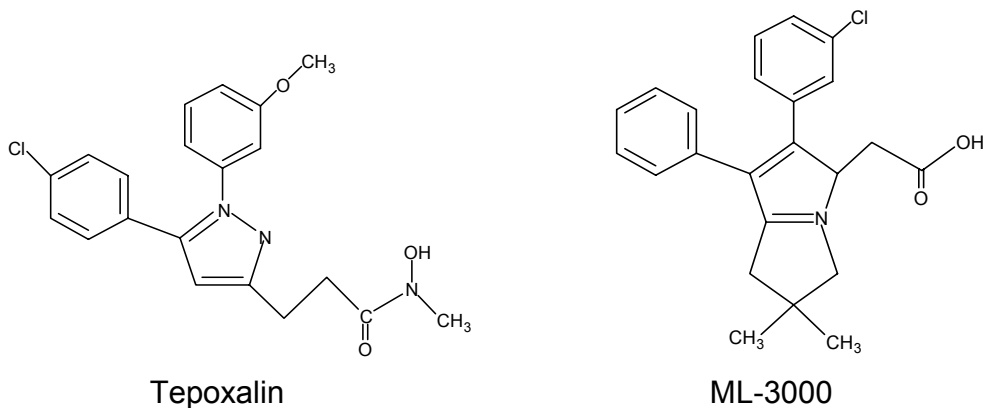


Figura 8b. Futurs fàrmacs antiinflamatoris: inhibeixen selectivament a la COX i a la 5-LOX a més de ser segrestadors radicalaris.

Els futurs fàrmacs antiinflamatoris han de tenir per tant capacitat d'inhibir selectivament als isoenzims de la COX i per l'altra també inhibeixin a la 5-LOX, a més de tenir un cert poder de captació de radicals lliures. Segons l'índex de selectivitat COX-1/COX-2 aquests fàrmacs tindrien aplicació en els diferents estadis de les malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer [14,70], el Parkinson [12] i l'esclerosi múltiple, de fet alguns dels inhibidors de la COX2 (com l'ibuprofèn) [62-63] i duals COX-2/ 5-LOX (com el flobufèn, naxoprèn o rofecoxib) [64] es podrien utilitzar molt aviat en la prevenció i tractaments dels estadis inicials de la malaltia, amb una gran expectativa de millora de la qualitat de vida dels pacients i presentant menors efectes secundaris.

2.8 Referències bibliogràfiques del capítol

- [1] Bowman, W.C. i M.J. Rand. Farmacologia. Bases bioquímicas y patológicas, Ed. Interamericana, Cap. 13, Inflamación y compuestos antiinflamatorios. pp. 13-45 (1985).
- [2] Vane, J.R. Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature London, New Biol.*, 231, 232-239 (1971).
- [3] Nicolson, K.C. i Smith, J.B. Prostacyclin, thromboxane and the arachidonic acid cascade: *Annual Rep. Med. Chem.*, 14, 178-187 (1979).
- [4] Kulmacz, R.J. i Lands, W.E.M. Prostaglandin and Related Substances: A practical approach, IRL Press, Washington, DC, en Benedetto, C., McDonald Gibson, R.G. Nigam, S., Slater, T.F. (Eds.). IRL Press, Washington D.C, pp.209-227 (1987).

-
- [5] Asako, H., Kubes, P., Wallace, J., Gaginella, T. i Wolf, R.E., Granger, D.N. Indomethacin-induced leukocyte adhesion in mesenteric venules: role of lipoxygenase products. *Am. J. Physiol.*, 262, G903-908 (1992).
- [6] Smith, W.L., Garavito, M. i DeWitt, D.L.. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases 1 and 2). *J. Biol. Chem.*, 271, 33157-33160 (1996).
- [7] Smith, W.L. i Marnett, L.. Prostaglandin endoperoxide H synthase: structure and catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1083, 1-17 (1991).
- [8] Hamberg, M. i Samuelsson, B. Biosynthetic pathway for prostanoid formation. *J. Biol. Chem.*, 242, 5336-5343 (1967).
- [9] Vane, J.R., Bakhle, Y.S. i Botting, R.M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 38, 97-120 (1998).
- [10] Flower, R.J. The development of COX2 inhibitors. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2, 179-191 (2003).
- [11] Chandrasekharan, N.V., Dai, Hu., Roos, K.I.T., Evanson, N.K., Tomsik, J., Elton, T.S. i Simmons, D.L. COX-3 a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 13926-13931 (2002).
- [12] Warner, T.D. i Mitchell, J.A. Cyclooxygenase-3 (COX-3): Filling in the gaps toward a COX continuum? *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 99, 13371-13373 (2002).
- [13] Teismann, P., Tieu, K., Choi, D-C., Wu, D-C., Naini, A., Hunot, S. i Vila, M. cyclooxygenase-2 is instrumental in Parkinson's disease neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100, 5473-5478 (2003).
- [14] Launer, L.J. Ph. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and Alzheimer disease. *JAMA*, 289, 2865-2867 (2003).
- [15] Schwab, J.M. i Schluessener, H.J. Cyclooxygenases and central nervous system inflammation. *Arch. Neurol.* 60, 630-632 (2003).
- [16] Harris, R.E., Chlebowski, R.T., Jackson, R.D., Frid, D.J., Ascenseo, J.L., Anderson, G., Loar, A., Rodabough, R.J., White, E. i McTiernan, A. *Cancer Research*. 63, 6096-6101 (2003).
- [17] Boyington, J.C., Gaffney, B.J., i Amzel, L.M. The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science*, 260, 1482-1486 (1993).
- [18] Skrypczak-Jankun, E., Funk, M.O.Jr., Boyington, J.C. i Amzel, L.M. Lipoxygenase: a molecular complex with a non-heme iron. *J. Mol. Struct.*, 374, 47-52 (1996).
- [19] Ford-Hutchinson, A.W., Gresser, M., i Young, R.N. 5-lipoxygenase mechanism. *Annu. Rev. Bio-Chem.*, 63, 383-417 (1994).
- [20] Yokomizo, T., Izumi, T., Chang, K., Takawa, Y. i Shimizu, T.A. G-protein-coupled receptor for leukotriene B4 that mediates chemotaxis. *Nature London, New Biol.*, 367, 620-624 (1997).
- [21] Uz, T., Pesold, C., Longone, P. i Manev, H. Regulation of neuronal 5-LOX expression: putative role in neuronal vulnerability. *FASEB J.* 12, 439-449 (1998).

- [22] Manev, H., Uz, T., Sugaya, K. i Qu, T. Putative role of neuronal 5-LOX in an aging brain. *FASEB J.* 14, 1464-1469 (2000).
- [23] Lammers, C.H., Schweitzer, P., Facchinetti, P., Arrang, J.M., Madamba, S.G., Siggins, G.R. i Pionelli, D. Arachidonate 5-lipoxygenase and its activating protein: prominent hippocampal expression. *J. Neurochem.* 66, 147-152 (1996).
- [24] Schureiqi, I., Chen, D., Lee, J.J. Yang, P., Newman, R.A., Brenner, D.E., Lotan, R., Fischer, S.M. i Lippman, F.S. LOX: a novel molecular target of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Acc. Discovery.*, 92, 1136-1142 (2000).
- [25] Vigo Baturone J., Lucero Muñoz, M.J. i León Wasmer M.J. Impacto de los radicales libres derivados del oxígeno en la salud. Reacciones celulares y tisulares. *Ciencia Farmacéutica.* 2, 245-255 (1992).
- [26] Freeman, B.A. i Crapo, J.D. Free radical and tissue injury. *Lab. Invest.*, 47, 412-423 (1982).
- [27] Pryor, W.A., the role of free radical reactions in biological systems. En Pryor W.A. Ed. *Free radicals in Medicine and Biology.* New York: Academic Press, 1-49 (1975).
- [28] Mason, R.P. i Chignell, C.F. Free radicals in Pharmacology and Toxicology. *Pharmacol. Rev.*, 33, 189-211 (1982).
- [29] Calopa, A. La Malaltia d'Alzheimer. *Circular Farmacéutica.* 59, 205-211 (2001).
- [30] Pasinetti, G.M. Cyclooxygenase and Inflammation in Alzheimer's Disease: Experimental Approaches and Clinical Interventions. *Journal of Neuroscience Research.* 54, 1-6, (1998).
- [31] Ho, L., Pieroni, C., Winger, D., Purohit, D., Aisen, P.S. i Pasinetti, G.M. Regional distribution of cyclooxygenase-2 in the hippocampal formation in Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.*, 57, 295-303, 1999.
- [32] Lutterman, J.D., Haroutunian, V., Yemul, S., Ho, L., Purohit, D., Aisen, P.S., Mohs, R. i Pasinetti, G.M. Cytokine gene expression as a function of the clinical progression of Alzheimer's disease dementia. *Arch. Neurol.*, 57, 1133-1160 (2000).
- [33] Ho, L., Purohit, D., Haroutunian, V., Lutterman, J.D., Willis, F., Naslund, J., Buxbaum, J.D., Aisen, P.S. i Pasinetti, G.M. Neuronal cyclooxygenase-2 expression in the hippocampal formation as a function of the clinical progression of Alzheimer's disease dementia. *Arch. Neurol.*, 58, 487-492 (2001).
- [34] Pasinetti, G.M. Cyclooxygenase-2 expression is increased in frontal cortex of Alzheimer's disease brain. *Neuroscience.* 87, 319-324 (1998).
- [35] Lukiw, W.J. i Bazan, N.G. Cyclooxygenase-2 RNA message abundance stability and hypervariability in Alzheimer neocortex. *J. Neurosci. Res.*, 50, 937-945 (1997).
- [36] Fiebich, B.L., Hull, M., Lieb, K., Gyufko, K., Berger, M. i Bauer, J. Prostaglandin E2 induces interleukin-6 synthesis in human astrocytoma cells. *J. Neurochem.* 68, 704-709 (1997).

- [37] Pasinetti, G.M. Cyclooxygenase and Alzheimer's disease: implications for preventive initiatives to slow the progression of clinical dementia. *Arch. of Gerontology and Geriatrics*. 33, 13-28 (2001).
- [38] Lim, G.P., Yang, F., Chu, T., Gahtan, E., Ubeda, O., Beech, W., Overmier, J.B., Hsiao-Ashe, K., Frautschy, S.A. i Cole, G.M. Ibuprofen effects on Alzheimer's pathology and open field activity in APPsw transgenic mice. *Neurobiology of Aging*, 22, 983-991 (2001).
- [39] Lim, G.P., Yang, F., Chu, T., Chen, P., Beech, W., Teter, B., Tran, T., Ubeda, O., Ashe, K.H., Frautschy, S.A i Cole, G.M. Ibuprofen suppresses plaque pathology and inflammation in a mouse model for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.*, 20, 5709-5714 (2000).
- [40] Zandi, P.P. i Breitner, C.S. Do NSAID's prevent Alzheimer's disease? And, if so, why? The epidemiological evidence. *Neurobiology of Aging*, 22, 811-817, (2001).
- [41] Frautschy, S.A., Hu, W., Kim, P., Miller, S.A., Chu, T., Harris-White, M.E. i Cole, G.M. Phenolic anti-inflammatory antioxidant reversal and neuropathology. *Neurobiology of Aging*. 22, 993-1005, (2001).
- [42] Wiss-Coray, T. and Mucke, L. Ibuprofen, inflammation and Alzheimer's disease. *Nat. Med.* 6, 973-974, (2000).
- [43] Jantzen, P.T., Gordon, M.n., Connor, K.E, DiCarlo, G. i Morgan, D.G. Modification of microglial reactivity using NCX-2216 (nitroflurbiprofen). *Society for Neuroscience*. 26, 1061-74, (2000).
- [44] Broe, G.A, Grayson, D.A, Creasey, H.M., Waite, L.M., Casey, B.J. i Bennett, H.P. Anti-inflammatory drugs protect against Alzheimer's disease. *Arch. Neurobiology*. 57, 1586-91, (2000).
- [45] Manev, H., H., Uz, T., Kiminobu, S. And Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J. i Qu, T. Putative role of neuronal 5-lipoxygenase in an aging brain. *FASEB Journal*, 14, 1464-1469, (2000).
- [46] Manev, H., Uz, T. i Qu, T. Early upregulation of hippocampal 5-lipoxygenase. *Restor. Neurol. Neurosci.*, 23, 533-544, (1997).
- [47] Akiyama, H., Barger, S., Barnum, S., Bradt, B., Bauer, J. i Cole, G.M. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*. 21, 383-421, (2000).
- [48] Behl, Ch. i Moosmann, B. Antioxidant neuroprotection in Alzheimer's disease as preventive and therapeutic approach. *Free Radical. Biology & Medecine*, 33, 182-191 (2002).
- [49] Dannhardt, G. i Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors: current status and future prospects. *Eur. J. Med. Chem.*, 36, 109-126 (2001).
- [50] Arena i Gou, M.T. Dos nous inhibidors de la COX2: Celecoxib i Rofecoxib. *Circular Farmacèutica*. 58, 74-78 (2000).
- [51] Hinz, B. i Brune, K. Cyclooxygenase-2 10 years later. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300, 367-375 (2002).
- [52] Young, R.N. Inhibitors of 5-lipoxygenase: a therapeutic potential yet to be fully realized? *Eur. J. Med. Chem.*, 34, 671-685, 1999.
- [53] Swingle, K.F.; Bell R.L.; Moore, G.G.I. Anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs. Rainsford Ph.D. K.D.; Path, M.R.C., eds. *Anti-inflammatory and anti-rheumatic drugs*. Florida: C.R.C. Press, Inc.; Cap.3, pp. 105 –126 (1989).

- [54] Dyer, R.D. i Connor, D.T. Dual inhibitors of prostaglandin and leukotriene biosynthesis. *Current Pharmaceutical Design*. 3, 463-472 (1997).
- [55] Argentero, D.C., Ritchie, D.M., Ferro, M.P., Kirchner, T., Wachter, M.P. i Anderson, D.W. Tepoxalin: a dual cyclooxygenase/5-lipoxygenase inhibitor of arachidonic acid metabolism with potent anti-inflammatory activity and favorable gastrointestinal profile. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 271, 1399-1408 (1994).
- [56] Fiorucci, S., Meli, R., Bucci, M. i Cirino, G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy. *Biochem. Pharmacol.*, 62, 61433-61438 (2001).
- [57] Kramer, J.B., Capiris, T., Sircar, J.C., Connor, D.T., Bornemeier, D.A., Dyer, R.D., Kuipers, P.J., Kennedy, J.A., Wright, C.D. i Okonkwo, G.C. Hydroxylamine analogs 2,6-di-*tert*-butylphenols: dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase or selective 5-lipoxygenase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.*, 3, 403-410 (1995).
- [58] Horioe, T., Nagakura, N., Chiba, K., Shirota, H., Shirota, H., Shinoda, M., Numata, H., Kobayashi, S. i Abe, C. ER-34122, a novel dual 5-lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitor. *Inflamm. Res.*, 48, 432-446 (1999).
- [59] Inagaki, M., Tsuru, T., Jyoyama, H., Ono, T., Yamada, K., Kobayashi, M., Hori, Y., Arimura, A., Yasui, K., Ohno, S., Kakudo, S., Koizumi, K. i Matsumoto, S. Novel antiarthritic agents dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. *J. Med. Chem.*, 43, 2040-2048 (2000).
- [60] Celotti, F. i Laufer, S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face and old problem: The dual inhibition concept. *Pharmacology Research*. 43, 429-436 (2001).
- [61] Mackenzie, I. i Muñoz, D.G. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and Alzheimer-type pathology in aging. *Neurology*. 50, 986-990 (1998).
- [62] McGeer, P.L., Schulzer, M., McGeer, E.G. Arthritis and anti-inflammatory agents as possible protective factors for Alzheimer's disease: a review of 17 epidemiological studies. *Neurobiology*. 47, 425-432 (1996).
- [63] Asanuma, M., Nishibayashi-Asanuma, S., Miyazaki, I., Kohno, M. i Ogawa, N. Neuroprotective effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs by direct scavenging of nitric oxide radicals. *J. of Neurochem.*, 76, 1895-1904 (2001).
- [64] Aisen, P.S., Schafer, K. i Grundman, M. Effects of rofecoxib or naxopren vs placebo on Alzheimer's disease. *JAMA*, 289, 2819-2826 (2003).
- [65] Tanabe, T. i Tohnai, N. Cyclooxygenase isoenzymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 68, 95-114 (2002).
- [66] Garavito, R.M., Malkowski, M.G. i DeWitt, D.L. The structures of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 68, 129-152 (2002).
- [67] Smith, W.L. i Song, I. The enzymology of prostaglandin endoperoxide H synthases-1 and -2. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 68, 115-128 (2002).
- [68] Marnett, L.J. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 68, 153-164 (2002).

