

Capítol 5. Conclusions

- El substracte de la COX i 5-LOX (àcid araquidònic) així com els seus inhibidors arilacètics, antranílics i arilpropionics tindrien una flexibilitat conformacional dels grups químicament actius: carboxílic (0° - 360°), carbonil/amino (35° - 60° i 315° - 340°) i anells aromàtics (0° - 360°). Aquesta flexibilitat conformacional els permetria una adaptació en el locus del receptor que faria possible el procés de transferència electrònica necessari per l'adequada inhibició dels enzims.
- Després de l'etapa de fixació el grup carboxílic a l'enzim COX (COX-1 i COX-2) els derivats fenilacètics podrien adoptar quatre conformacions de mínima energia: dues conformacions *fenil-up* i dues *fenil-down* respecte al pla del primer anell aromàtic. La superposició d'aquestes estructures de mínima energia amb la forma desplegada de l'àcid araquidònic (que és la més estable) indica que la conformació possiblement bioactiva d'aquests inhibidors seria la conformació *fenil-down*. Posteriors estudis cristal·logràfics [1] del complex COX-1-àc. araquidònic han corroborat que efectivament la conformació desplegada de l'àcid araquidònic és la bioactiva ($\Delta^{5,6}/\Delta^{8,9}$ 125°).
- L'activitat antiinflamatòria *in vivo* (expressada com disminució del volum d'edema provocat per injecció de carragenina) dels compostos fenilacètics, fenàmics i arilpropionics depèn de la distribució de càrrega electrònica entre els dos anells aromàtics. Existint una correlació entre la càrrega electrònica dels orbitals π -HOMO i l'activitat antiinflamatòria, de forma que aquesta augmenta a major disminució de la densitat de càrrega en el 1r. anell aromàtic i a major augment en el 2n. anell aromàtic, fet que suggereix l'existència d'un procés de transferència de càrrega entre ambdós anells aromàtics i el receptor d'acord amb la següent equació:

$$p\Delta V = 1.524 (\pm 0.04) (\pi_B) + 0.201 (\pm 0.05)$$

$$n = 20, r = 0.855, s = 0.213, F = 49.02$$

Aquesta conclusió ha estat aplicada i corroborada per altres autors amb posterioritat a aquest estudi [2].

- La polaritat molecular conferida per la relació entres les densitats electròniques en els dos anells aromàtics dels fenamats és un factor decisiu tant pel primer reconeixement de l'inhibidor per part de l'enzim COX com per la seva inhibició per transferència de càrrega electrònica que correlaciona amb l'activitat antiinflamatòria *in vivo* (expressada com la disminució del volum d'edema provocat per carragenina $p\Delta V$)

$$p\Delta V = 2.17 (\pm 0.04) (\pi_A - \pi_B) + 3.73 (\pm 0.07)$$

$$n = 8, r = 0.916, s = 0.181, F = 29.16$$

Segons la distribució de càrrega electrònica entre els dos anells aromàtics el mecanisme d'inhibició pot ser temps dependent o temps independent. Sent a més un factor important l'angle entre els dos anells aromàtics i la llibertat de gir entre ells per la possible adaptabilitat amb el receptor.

- La distribució del PEM amb la base *ab initio* HF/3-21G ha permès diferenciar els inhibidors de la COX que actuen amb un mecanisme temps dependent dels que són temps-independents. Els inhibidors temps-dependents (diclofenac, indometacina, àcid meclofenàmic, flurbiprofén, ketoprofén i piroprofén) presenten una distribució de PEM de -50 Kcal/mol exclusiva sobre el primer anell aromàtic amb forma cònica i amb el vèrtex localitzat sobre el grup carboxílic, sent l'angle entre els anells aromàtics de 60°-80° obertura que facilita un possible atac electròfil que no tindria lloc els inhibidors temps-independents (Àc. dimetil-acridan carboxílic, àc. mefenàmic, àc. flufenàmic, àc. niflúmic, ibuprofén i naxoprén) ja que aquests derivats presenten una distribució del PEM (-30 Kcal/mol) sobre el 2n anell aromàtic amb un angle més tancat que impossibilitaria l'atac electròfil.

- La base *ab initio* HF/3-21G constitueix un mètode computacional eficient i precís per descriure l'entorn electrostàtic molecular dels compostos estudiats. Així els resultats obtinguts en quant a càrregues electrostàtiques i representació dels mapes de PEM en aquesta base serien comparables al d'altres bases més complexes (6-31G**, amb un coeficient de correlació $r = 0,992-0,972$) amb l'avantatge d'un cost computacional sensiblement inferior.
- Aquest procés de transferència de càrrega electrònica i d'inhibició temps dependent / temps independent s'ha confirmat per tècniques de modelització molecular dels complexes de la COX-1 i COX-2 amb compostos de les famílies d'Arilacètics, Antranílics i Arilpropionics que seguirien un mecanisme d'inhibició competitiva amb el substrate (àc. araquidònic) i que comportaria una unió multipolar: primer la formació d'un pont salí entre el grup carboxílic i l'Arg¹²⁰, segon al grup amino o carboxil unit al 1r. anell aromàtic que en funció si es produeix un atac electròfil o no amb les Ser⁵³⁰ i Ser³⁵³ el mecanisme podria ser seria temps dependent o independent.
- La distribució electrostàtica dels compostos temps dependents estabilitza la presència d'una xarxa de molècules d'aigua en una posició localitzada a l'entrada del locus de la COX entre els residus l'Arg¹²⁰ i Tyr³⁵⁵, que afavoririen la formació de ponts d'hidrogen entre els residus Glu⁵²⁴-Arg⁵¹³ i Arg¹²⁰-Tyr³⁵⁵ i d'aquests amb les molècules d'aigua, fet que explicaria que aquests compostos temps dependents romanguessin més temps en el centre actiu de l'enzim, podent establir així unions complementàries amb residus específics (Val⁵²³, Tyr³⁸⁵, Trp³⁸⁷, Leu³⁸⁴, Ser⁵³⁰). Aquesta conclusió seria consistent amb el mecanisme dinàmic d'inhibició de la COX de Marnett [3] que postula que la unió dels AINEs amb la COX podria ser en un procés en varies etapes i amb els resultats de So [4] que postula la formació de ponts de hidrogen en el locus de la COX.
- Els resultats de l'anàlisi conformacional dels derivats del DTBP indiquen que en aquests compostos en el substituent en posició *para* és permesa la lliure rotació i que els compostos amb un grup carbonil, metil o amino en aquesta posició lligat a un segon

nucli aromàtic poden presentar quatre conformacions de mínima energia: cis- α , trans- α , cis- β i trans- β . Aquestes quatre conformacions mostren un correcte ajustament amb les quatre conformacions del compost dual tebufelona. La relació entre la llibertat conformacional i les activitats inhibidores COX/5-LOX indica que el lliure gir en el substituent en posició *para* permetria un millor anclatge en els centres actius dels enzims.

- La formació del radical fenòxid i di-*tert*-butilfenòxid pel mètode de la coordenada de reacció indica que la via més probable per la formació d'aquests radicals és la via UHF-singlet, tanmateix l'estabilitat del radical es veu afavorida per la presència de grups electrodonadors localitzats preferentment en les posicions *orto* i *para* de l'anell fenòlic. Per al contrari la presència de grups electronatreients dificulta la formació del radical per disminució de la densitat electrònica en el punt crític de l'enllaç O-H. Aquest resultat ha estat corroborat per altres investigadors amb posterioritat a aquest estudi [5].
- Els derivats fenòlics inhibeixen a la COX a través d'un mecanisme antioxidant de neutralització radicalària. Els compostos amb major activitat antiinflamatòria presenten una major facilitat de formació del radical fenòxid i aquest és més estable en comparació amb el corresponent radical dels derivats menys actius. La facilitat de formació del radical fenòxid i la seva posterior estabilitat poden quantificar-se respectivament a través dels paràmetres termodinàmics entalpia de reacció (ΔH_r) i entalpia de formació (ΔH_c) ambdós paràmetres correlacionen amb les activitats antiinflamatòries dels compostos estudiats, podent relacionar les activitats antiinflamatòries *in vitro* expressades com I_{50} dels derivats fenòlics d'acord amb l'equació:

$$\log 1/I_{50} = -0.631 \Delta H_r (\pm 0.12) + 14.05 (\pm 3.07)$$

$$n=15, r=0.950, s=0.242, F=121.53$$

Amb posterioritat a aquesta conclusió, altres autors [6] l'han aplicada a l'estudi de la citotoxicitat dels radicals dels derivats de l'eugenol, amb resultats molt coherents amb els nostres.

- Aquest procés seria consistent amb els resultats de modelització molecular obtinguts per la unió dels derivats fenòlics amb la COX2 humana, on el grup fenòlic es localitzaria en un locus polar interaccionant per donació d'un hidrogen amb la Ser⁵³⁰ o la His³⁵¹, sent també possible amb l'oxigen carbonil de la Phe⁵⁸⁰. Els compostos actius presenten una

extensa àrea hidrofòbica localitzada sobre l'anell aromàtic que encaixaria amb una cavitat formada per residus apolars de Leu³⁵², Phe¹⁹⁸, Phe³⁸¹ i Phe⁵⁸⁰. Fet que corroboraria la relació quantitativa entre el ClogP i la inhibició de la COX-2 per una bona accessibilitat al locus d'unió.

- Els derivats DTBP tenen capacitat dual per inhibir als enzims COX i 5-LOX amb un mecanisme antioxidant de formació del radical di-*tert*-butil-fenòxid. La facilitat de formació d'aquest radical depèn de la distribució de càrrega electrònica en l'anell fenòlic preferentment en les posicions *meta* i oxigen fenòlic, aquesta distribució electrònica en combinació amb un paràmetre de lipofilia ClogP correlaciona amb l'activitat COX segons l'equació:

$$\text{pIC}_{50}(\mathbf{COX}) = -1.11 \text{ Qt} (\pm 0.29) + 0.37 (\pm 0.07) \text{ CLogP} + 3.02 (\pm 0.32)$$

n=14 r=0.919 s=0.405 F=29.81

A més el radical di-*tert*-butil-fenòxid format inhibiria a la 5-LOX amb un procés de reducció de l'àtom de Ferro del centre catalític de l'enzim d'estat fèrric a ferros. L'energia d'interacció amb l'àtom de ferro en estat fèrric obtinguda a partir del programa GRID és un paràmetre QSAR que permet relacionar-la amb l'activitat antiinflamatòria *in vitro* expressada com concentració de fàrmac que redueix en un 50 % l'activitat de la 5-LOX d'acord amb l'equació:

$$\text{pIC}_{50}(\mathbf{LOX}) = -0.13 (\pm 0.02) \text{ Fe}3^+ + 2.79 (\pm 0.34)$$

n=14 r=0.907 s=0.440 F=55.88

Aquestes dues equacions podrien explicar la dualitat dels derivats del DTBP per inhibir els enzims COX/5-LOX a través d'un mecanisme antioxidant.

[1] Malkowski, M.G., Ginell, S., Smith, W.L. i Garavito, R.M. The X-ray crystal structure of prostaglandin endoperoxide H synthase-1 complexed with arachidonic acid. *Science*, 289, 1933-1937 (2000).

[2] Zoete, V., Maglia, F., Rougée, M., i Bensasson, R.V. Mechanism of action in a 4,5-diarylpyrrole series of selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors. *Free Radical biology & Medicine*, 28, 1638-1641 (2000).

- [3] Marnett, L.J. Recent developments in cyclooxygenase inhibition. *Prostaglandins & other Lipid Mediators*, 68-69, 153-164 (2002).
- [4] So, O.Y., Scarafia, L.E., Mak, A.Y., Callan, O.H., Swinney, D.C. The dynamics of prostaglandin-H synthases. *J. Biol. Chem.*, 273, 5801-5807 (1998).
- [5] Vaz, r.J., Edwards, M., Shen, J., Pearlstein, R.i Kominos, D. Use of electron densities in comparative molecular field analysis (CoMFA): O-H bond dissociation energies in Phenols. *Int. J. Quantum. Chemistry*, 75, 187-195 (1999).
- [6] Fuisawa, S., Atsumi, T., Kadoma, Y. i Sakagami, H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. *Toxicology*, 177, 39-54 (2002).